

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA PREPARO DA AMOSTRA E DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE SULFONAMIDAS EM MEL***

São Luís
2012

THIESSA MARAMALDO DE ALMEIDA OLIVEIRA

***OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA PREPARO DA AMOSTRA E DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE SULFONAMIDAS EM MEL***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel

São Luís
2012

Oliveira, Thiessa Maramaldo de Almeida.

Otimização e validação de método analítico para preparo da amostra e determinação simultânea de sulfonamidas em mel / Thiessa Maramaldo de Almeida Oliveira – São Luís, 2012.

111 f.

Impresso por computador (fotocópia).
Orientador: Adeilton Pereira Maciel.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, 2012.

1. Química analítica qualitativa – mel. 2. Sulfonamidas. I. Título.

CDU 543.061:638.16

THIESSA MARAMALDO DE ALMEIDA OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA PREPARO DA AMOSTRA E DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE SULFONAMIDAS EM MEL**

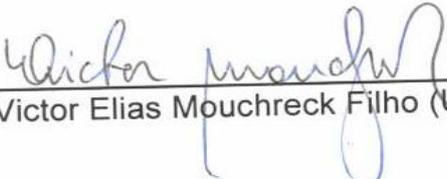
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 01/10/2012

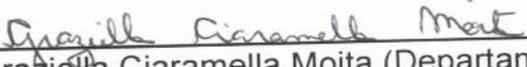
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel (Orientador UFMA);



Prof. Dr. Victor Elias Mouchreck Filho (UFMA);



Prof.^a. Dr.^a. Graziella Ciaramella Moita (Departamento de Química-UFPI);

Aos meus pais, Hilda Maramaldo e Francisco Pedro Muniz, aos meus irmãos Diego e Higor e a toda minha família que sempre me incentivaram nesta jornada e me deram muito amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me levantar quando várias pedras no caminho apareciam e me faziam cair.

À professora Teresa por todos os ensinamentos durante os seis anos de trabalhos no NARP, pelas discussões técnicas, por ter me ensinado a ser mais forte apesar de todas as adversidades, pela confiança depositada e por ser minha segunda mãe.

A todos os amigos do Núcleo de Resíduos e de Pesticidas (NARP): Heloana, Virgínia, Marcelle, Lia Gracy, Camila, Marconiel, Raphael, Crediciomar, Raquel, Gladson e Ilmar pelo apoio nos momentos de tristeza, pelas discussões técnicas, pela amizade e pelo carinho. Aos novos NARPIANOS: Francisco, Tainá, Fernanda, Vanessa, Max, Ilmo, Natália, Elilton, Ricardo por contribuírem no processo de término do mestrado.

Ao professor Adeilton por aceitar ser meu orientador, pelos ensinamentos e discussões técnicas durante os dois anos de convívio.

Ao Jonas, a Dona Leny, ao Ricardo e todos seus familiares por terem significado de família, aconchego e carinho. Em especial agradeço ao meu namorado Jonas por ter incentivado a prosseguir na carreira acadêmica, além da força e do amor.

A todos os amigos de graduação. À Karlene e à Natividade pela amizade. A todos do laboratório Biodiesel, em especial ao Neto que sempre contribuiu com meu trabalho.

À associação TURIMEL por nos fornecer mel para os estudos dispostos na dissertação e por nos disponibilizarem todos os materiais para coleta de quadros no pasto apícola.

À FAPEMA pela bolsa de estudo concedida e ao SEBRAE / FINEP pelo financiamento do projeto COMMEL, além do incentivo dado à apicultultra através de suporte e dos encontros que nos ajudam a compartilhar informações e buscar melhorias para a o desenvolvimento da atividade.

“As dificuldades devem ser usadas para crescer, não para desencorajar. O espírito humano cresce mais forte no conflito.”

William Ellery Channing

RESUMO

Este trabalho apresenta e discute os resultados da validação de um método para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel de abelhas africanizadas da região do Alto Turi - MA. No preparo das amostras de méis, utilizou-se hidrólise ácida e empregou-se um sistema de extração em fase sólida em cartucho ABS - ELUT Nexus. O eluato foi analisado por cromatografia líquida com detecção por arranjos de diodos. Para determinação dos limites de detecção e quantificação, foram construídas curvas analíticas com soluções em concentrações de 0,025 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o método mostrou-se linear nessa faixa. Os coeficientes de correlação obtidos variaram de 0,9994 a 0,9999 para as sulfonamidas em estudo. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados conforme procedimentos estatísticos convencionais e os resultados considerados satisfatórios para o propósito do método. As recuperações foram obtidas em intervalo de 63 a 98%, com coeficiente de variação entre 0,4 - 9,9%, que para matrizes complexas é satisfatório. O limite máximo de resíduos de sulfonamidas em mel é 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, no entanto devido a complexidade da amostra a quantificação só foi possível na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Também foi feita a caracterização físico-química das amostras de méis utilizando-se metodologia baseada no CODEX Alimentarius e Association of Official Analytical Chemists, nas quais se verificou que todas as amostras analisadas encontraram-se dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira no que se refere a índice de diástase, minerais, cor e hidroximetilfurfural. No referente à acidez, 71% das amostras tiveram valores elevados, quanto ao teor de umidade e sólidos insolúveis, apenas duas amostras, tiveram valores superiores aos recomendados pela Instrução Normativa nº11 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Palavras-chave: Mel. Análise físico-química. HPLC. Validação. Sulfonamidas.

ABSTRACT

This work presents and discusses the results of the validation of a method for determination of sulfonamide residues in honey bees africanized of the Alto Turi - MA. In preparation of the honey samples, was used acid hydrolysis and employed a system of solid phase extraction in cartridge ABS - Elut Nexus. The eluate was analyzed by liquid chromatography with diode array detection. To determine the limits of detection and quantification, standard curves were constructed with solutions in concentrations ranging from 0.025 to 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the method was linear in this range. The correlation coefficients obtained ranged from 0.9994 to 0.9999 for the study sulfonamides. The limits of detection and quantification were calculated according to conventional statistical procedures and results were considered satisfactory for the purpose of the method. The recoveries were obtained in the range from 63 to 98%, with a coefficient of variation from 0,4 to 9,9%, which is satisfactory for complex matrices. The maximum sulfonamide residues in honey is 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, however due to the complexity of the sample for quantification was possible only at a concentration of 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. It was also made the physicochemical characterization of the honey samples using a method based on CODEX Alimentarius and Association of Official Analytical Chemists, in which it was found that all samples were within the standards established by the Brazilian legislation regarding the index diastasis, minerals, color and hydroxymethylfurfural. Regarding the acidity, 71% of the samples had high values, already on the moisture content and insoluble solids, only two samples were higher than those recommended by Instruction n^o11 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.

Keywords: Honey. Physicochemical analysis. HPLC. Validation. Sulfonamides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura física da Associação Turimel	22
Figura 2: Equipamentos da associação Turimel - decantadores e centrifugas	23
Figura 3: Comparação da mata nativa em diferentes anos e estudo da densidade de apiários, onde triângulos vermelhos sinalizam apiários e bolas amarelas as residências dos apicultores.....	24
Figura 4: Apiários localizados em mata nativa	29
Figura 5: Sintomas da Cria Pútrida Americana - (a) consistência viscosa da cria (teste do palito e restos de crias mortas) e (b) ressecadas colados nas paredes do alvéolo.....	32
Figura 6: Semelhança estrutural entre sulfonamidas e o ácido p-aminobenzóico (PABA)	43
Figura 7: Estrutura química das sulfonamidas em estudo.....	44
Figura 8: Mapa do Maranhão com destaque da região do Alto Turi.....	46
Figura 9: Espectros UV, obtidos no sistema HPLC/DAD Varian ProStar	64
Figura 10: Cromatograma das sulfonamidas 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – fase móvel ACN/H ₂ O teste 6 (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)	67
Figura 11: Cromatograma das sulfonamidas 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – fase móvel ACN/tampão teste 1 (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)	68
Figura 12: Cromatograma das sulfonamidas em 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – fase móvel ACN/tampão teste 5 (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)	68
Figura 13: Fluxograma do procedimento experimental 1 para otimização da extração em fase sólida.....	71
Figura 14: Cromatograma do extrato das sulfonamidas fortificado com 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e análise cromatográfica com fase móvel ACN/H ₂ O (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)	71
Figura 15: Cromatograma do extrato do branco do mel com massa de 5 g diluído em solução de água com pH ajustado para 4,5 e análise cromatográfica com fase móvel ACN/H ₂ O	72

Figura 16: Cromatograma do branco (A) e da amostra fortificada (B) com 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)	74
Figura 17: Fluxograma do procedimento experimental 2 para otimização da extração em fase sólida.....	75
Figura 18: Cromatograma do extrato do branco de méis utilizando metodologia descrita por Bonta (2009) e usando como fase móvel ACN/tampão	76
Figura 19: Fortificações das sulfas em concentração de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)	76
Figura 20: Fluxograma do procedimento experimental 3 para otimização da extração em fase sólida.....	77
Figura 21: Cromatograma do extrato do branco do mel, utilizando fase móvel ACN/água conforme Teste 6	78
Figura 22: Cromatograma do extrato do branco do mel, utilizando fase móvel ACN/tampão conforme Teste 1	79
Figura 23: Cromatograma do extrato do branco do mel, utilizando fase móvel ACN/tampão conforme Teste 5	79
Figura 24: Etapas do método de extração utilizado no preparo das amostras de méis	79
Figura 25: Cromatograma da solução padrão <i>mix</i> das sulfonamidas (1 – sulfadiazina, 2 – sulfatiazol, 3 – sulfametazina, 4 – sulfacloropiradazina, 5- sulfadimetoxina)	81
Figura 26: Comparação dos cromatogramas do extrato do branco (A) e do mel fortificado com sulfonamidas na concentração 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B) (1-sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina) .	83
Figura 27: Curva de linearidade da sulfadiazina variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$	84
Figura 28: Curva de linearidade da sulfatiazol variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$	85
Figura 29: Curva de linearidade da sulfametazina variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$	85
Figura 30: Curva de linearidade da sulfacloropiradazina variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$	85
Figura 31: Curva de linearidade da sulfadimetoxina variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$	86

Figura 32: Curvas analíticas da sulfadiazina, do sulfatiazol, da sulfametazina, da sulfaclopiradazina e da sulfadimetoxina variando de 0,025 – 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.. 87

Figura 33: Cromatograma da amostra 4 referente a cidade de Santa Luzia do Paruá 92

Figura 34: Cromatograma da amostra 11 referente à cidade de Nova Olinda do Maranhão 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de mel exportado pelo Brasil e seus principais estados exportadores nos anos de 2001 a 2006 (kg)	20
Tabela 2: Padrões de sulfonamidas usadas no desenvolvimento do método ..	53
Tabela 3: Caracterização físico-química para méis da região do Alto Turi –MA	60
Tabela 4: Avaliação de parâmetros físico-químicos em méis da região do Alto Turi –MA.....	61
Tabela 5: Comparação entre as colunas Zorbax, Vertical e Phenomenex para estabelecimento das condições cromatográficas	63
Tabela 6: Avaliação dos comprimentos de onda através análise das áreas das sulfas	65
Tabela 7: Estudo das proporções e da fase móvel para detecção das sulfonamidas, com fluxo constante de 1 mL min ⁻¹	66
Tabela 8: Estudo das proporções e da fase móvel (ACN/H ₂ O) para detecção das sulfonamidas, com fluxo constante de 1 mL min ⁻¹	67
Tabela 9: Comparação das recuperações com e sem aquecimento preparados com tampão e de extratos preparados com água na concentração 1.000 µg kg ⁻¹ , com proporções conforme teste 6	72
Tabela 10: Recuperações em 500 µg kg ⁻¹ para o 1º e 2º procedimento, ambos utilizando fase móvel ACN/tampão, segundo proporções do teste1 e método descrito por Bonta (2009)	76
Tabela 11: Condições cromatográficas otimizadas para análise de sulfonamidas em mel.....	80
Tabela 12: Tempos de retenção (TR) obtidos para cada sulfonamida na análise cromatográfica de uma mistura de padrões de sulfonamidas	81
Tabela 13: Avaliação do desempenho do sistema cromatográfico sob análise dos parâmetros de resolução, número de pratos teóricos e assimetria do pico	82
Tabela 14: Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas para sulfonamidas	86
Tabela 15: Resultados da sensibilidade, do limite de detecção e de quantificação do método para detecção de sulfonamidas.....	88

Tabela 16: Resultado da exatidão do método para detecção de sulfonamidas em 100, 500 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	89
Tabela 17: Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método cromatográfico para determinação de sulfonamidas	90
Tabela 18: Análise de resíduos de sulfonamidas em amostras de méis coletadas na região do Alto Turi -MA	91

LISTA DE ABREVIações

ACN	Acetonitrila
AFB	Cria Pútrida Americana
ATF	Ácido trifluoracético
FA	Ácido Fórmico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PI	Padrão interno
HPLC–DAD	Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector por arranjos de diodos
HPLC–FL	Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector por fluorescência
HPLC–UV	Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector por UV visível
HPLC–MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector por espectrometria de massas
REC	Recuperação
SAD	Sulfanilamide
SCP	Sulfacloropiridazina
SCT	Sulfacetamida
SDM	Sulfadimetoxina
SDX	Sulfadoxina
SDZ	Sulfadiazina
SID	Sulfisomidina
SIX	Sulfisoxazol
SME	Sulfameter
SMP	Sulfametoxipiridazina
SMR	Sulfamerazina
SMTX	Sulfametoxazol
SMTZ	Sulfametizol
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SQX	Sulfaquinoxalina
STZ	Sulfatiazol
SPE	Extração em Fase Sólida
TA	Tampão Acetato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Geral	18
1.1.2 Específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Apicultura no Brasil	19
2.2 Apicultura em Santa Luzia do Paruá –MA	21
2.3 Mel e sua composição	25
2.4 Mel orgânico	26
2.5 Doença das abelhas	30
2.5.1 Cria pútrida americana.....	31
2.6 Avaliação da qualidade dos méis	33
2.6.1 Análise dos parâmetros físico-químicos	33
2.6.2 Parâmetros físico-químicos	35
2.7 Análise de resíduos em mel	41
2.7.1 Sulfonamidas	42
2.7.2 Métodos de análises de sulfonamidas em mel	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 Amostragem	46
3.2 Análise físico-química	47
3.2.1 Cor	47
3.2.2 Umidade	48
3.2.3 Sólidos insolúveis	49
3.2.4 Minerais ou cinzas	49
3.2.5 Hidroximetilfurfural	50
3.2.6 Acidez livre	50
3.2.7 Atividade diastásica	51
3.3 Análise cromatográfica	52
3.3.1 Instrumentação	52
3.3.2 Reagentes, solventes e materiais para a análise cromatográfica	52
3.3.3 Padrões	53
3.3.4 Condições cromatográficas	54

3.3.5 Extração de sulfonamidas em mel	55
3.3.6 Validação do método	56
3.3.7 Aplicação do método	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Análises físico-químicas	60
4.2 Estabelecimento das condições cromatográficas	63
4.2.1 Escolha da coluna.....	63
4.2.2 Escolha do comprimento de onda.....	64
4.2.3 Estudo da fase móvel	65
4.3 Estabelecimento das condições de extração das sulfonamidas	69
4.3.1 Etapas de extração com condições cromatográficas do teste 6	70
4.4 Condições cromatográficas otimizadas	79
4.5 Validação do método	81
4.5.1 Adequação do sistema	82
4.5.2 Seletividade	83
4.5.3 Linearidade e sensibilidade	84
4.5.4 Limites de detecção e quantificação	88
4.5.5 Exatidão / Recuperação.....	88
4.5.6 Precisão.....	89
4.5.7 Aplicação do método	91
5 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXO.....	107

1 INTRODUÇÃO

Mel é um alimento produzido pelas abelhas a partir do néctar recolhido de flores e processado pelas enzimas digestivas desses insetos. É armazenado em favos em suas colméias para servir-lhes de alimento em período de pouca fartura de néctar (BRASIL, 2000).

Existe uma grande diversidade de méis, que variam segundo a floração, condições do solo e do clima da região em que foram produzidos e/ou ainda segundo às técnicas de coleta.

Devido às propriedades nutritivas, medicinais, cicatrizantes e antissépticas, o mel tem valor comercial amplamente reconhecido, que implica na necessidade de garantir a qualidade do produto e também justifica a vasta utilização como fonte de variados estudos científicos e tecnológicos.

A produção brasileira de mel saltou de 38 mil toneladas em 2009 para 50 mil toneladas em 2010, o que colocou o País na 11ª posição no *ranking* dos produtores mundiais. Atualmente o país é o quinto maior exportador do produto. De acordo com o Ministério da Agricultura (2011), programas de incentivo à produção apícola e capacitação de agricultores envolvidos com a cadeia produtiva são os responsáveis pelo destaque do setor nos últimos anos.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro, é necessário que este esteja em conformidade com normas nacionais e internacionais para que possa ser comercializado no mercado interno e externo. Para isto, o produto deve cumprir as exigências do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (Instrução Normativa nº 11, de 20/10/2000, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) e também cumprir os critérios de qualidade estabelecidos no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), especificamente o Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM.

No que se refere a resíduos, um dos problemas que assolam a apicultura é a contaminação do mel por substâncias utilizadas na agricultura ou, ainda, por substâncias utilizadas na prevenção e controle de doenças nas colméias. A exemplo disso, as sulfonamidas são as substâncias mais utilizadas

na atividade apícola e a consequência desta prática é a presença de resíduos desse composto no mel.

O Maranhão ainda não dispõe de laboratórios especializados em análise de resíduos em mel, que tem levado pesquisadores a atuarem nessa área, buscando financiamentos que têm proporcionado desenvolvimento de metodologias para análise de resíduos em mel e a capacitação de recursos humanos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Estabelecer metodologia para análise de resíduos de sulfonamidas em méis de abelhas, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e extração em fase sólida.

1.1.2 Específicos

- Otimizar método analítico utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência para determinação de agentes antimicrobianos usados em abelhas e possíveis contaminantes do mel;
- Avaliar a eficiência da extração em fase sólida na quantificação de sulfonamidas em amostras de méis, através de ensaios de recuperação e detecção em HPLC-DAD;
- Validar método analítico para detecção e quantificação de sulfonamidas em méis;
- Caracterizar físico-quimicamente méis de abelha africanizada produzido na região do Alto Turi – MA;
- Aplicar método analítico otimizado em méis de abelha africanizada utilizando HPLC-DAD para detecção das sulfonamidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Apicultura no Brasil

A apicultura é a criação de abelhas em confinamento, sob controle do homem, alojadas em colméias artificiais, utilizando-se métodos e equipamentos desenvolvidos para melhor explorar as capacidades naturais desses insetos (PERUCA et al., 2002).

No Brasil, o padre Antônio Carneiro foi responsável pela introdução de abelhas *Apis mellifera* no Rio de Janeiro, dando início a apicultura brasileira. Nos anos seguintes, outras abelhas européias foram trazidas ao Brasil.

O marco da apicultura ocorreu em 1956 quando o pesquisador Warwick Estevam Kerr trouxe para o país a abelha *Apis mellifera scutellata*, chamada vulgarmente de abelha africana. Segundo informações de pesquisadores da EMBRAPA (PEREIRA; LOPES; CAMARGO, 2003), tais abelhas são muito agressivas e produzem maior quantidade de mel do que as abelhas européias.

O principal objetivo do pesquisador Kerr era obter uma raça produtiva em um programa de melhoramento genético (SEBRAE, 2007). No entanto, acidentalmente as abelhas africanas fugiram e passaram a se acasalar com as abelhas européias dando origem a um híbrido conhecido como abelha africanizada, com várias características importantes, destacando-se sua eficiência na polinização de diversas culturas, produção de mel e resistência a doenças (COUTO & COUTO, 2006).

Em contraposição à alta produtividade de mel, a acentuada agressividade das abelhas africanizadas impossibilitou, por muito tempo, a criação racional dessas abelhas. Só após desenvolvimento de técnicas adequadas foi possível a criação e o conseqüente aumento da produção de mel no Brasil.

A procura pelo mel brasileiro teve seu ápice em 2001. Nesse ano, os maiores produtores de méis, China e Argentina, tiveram seus méis embargados devido à contaminação por antibióticos. Isso fez com que a procura por mel e os preços aumentassem e, países com menores expressões nas exportações

de méis, como o Brasil, começaram, então, a aumentar suas vendas no mercado externo (PAULA, 2008).

Como mostrado na Tabela 1, às exportações do mel brasileiro cresceram até 2004 e, a partir de 2006, houve diminuição devido à volta da China ao mercado e também devido ao embargo do mel brasileiro pela União Européia. Segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA), a decisão foi baseada na circular de 21 de fevereiro da Federação Europeia de Comércio de Produtos do Agronegócio, que recomendava a proibição da importação de mel do Brasil em consequência da persistência de falhas no sistema de monitoramento de resíduos de antibióticos no mel brasileiro também já apontadas por outra missão técnica em 2003 (PEREZ, 2006).

Tabela 1: Quantidade de mel exportado pelo Brasil e seus principais estados exportadores nos anos de 2001 a 2006 (kg)

Estado/ Ano	2001	2002	2003	2004	2005	2006
São Paulo	197.361	5.387.041	6.336.670	8.555.013	6.051.598	4.754.258
Ceará	244.479	1.965.622	2.342.318	2.385.459	2.341.794	2.723.024
Santa Catarina	1.814.498	2.717.836	4.036.393	4.183.153	2.261.980	2.002.029
Piauí	0	741.304	3.009.844	1.747.586	2.503.026	1.939.923
Rio Grande do Sul	314	77.092	555.087	1.691.229	588.783	1.483.807
Paraná	122.896	848.659	1.911.613	1.735.004	332.821	898.496
Brasil	2.488.671	12.640.487	19.273.148	21.029.045	14.438.569	14.599.720

Fonte: ALICEWEB / MDIC / SECEX / UAGRO, 2006 (apud SEBRAE, 2007)

O embargo ao mel brasileiro acabou em 2008, quando a União Européia aprovou o Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Brasil. Após esse período, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2011), a produção saltou de 38 mil toneladas em 2009 para 50 mil toneladas em 2010, sendo o Brasil o quinto maior exportador de mel.

Apesar de o Brasil estar entre os doze maiores produtores de mel, a população brasileira consome pouco esse alimento. Segundo dados do IBGE (2010), o consumo per capita anual de mel é de 0,048 kg/ano. Tão baixo

consumo faz com que a produção brasileira dependa do mercado externo, para escoar sua produção.

Diante disso, a Confederação Brasileira de Apicultura (CBA) e o SEBRAE, juntamente com a Fundação do Banco do Brasil, tem incentivado o consumo interno. Um exemplo disso foi a campanha intitulada “Meu dia pede mel”, criada para incentivar o consumo do mel de abelha e, conseqüentemente, fortalecer o mercado interno (AGROLINK, 2012). A campanha tem como objetivo mostrar a população os benefícios no consumo do mel, como alimento saudável, energético, natural e que pode ser utilizado para diversos fins (APACAME, 2012). Muitos estados brasileiros incluíram o mel na merenda escolar para estudantes da rede pública e estadual, como contribuição à campanha.

2.2 Apicultura em Santa Luzia do Paruá – MA

Santa Luzia do Paruá (MA), situada na Pré-Amazônia, na região do Alto Turi tem uma posição privilegiada, pois é a principal via de acesso do Maranhão às Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país. Isso favoreceu a migração de grandes proprietários de alto poder aquisitivo, que percebiam a pecuária como grande geradora de renda. Entretanto, a renda ficou concentrada nas mãos de uma minoria. Com isso, a população local teve dificuldade de acesso às condições do solo que, aliada à falta de infra-estrutura básica e a pouca tradição de cultivo agrícola, contribuíram para a emigração ao Pará, cuja principal fonte de renda era o trabalho no garimpo (DUARTE, 2006).

Segundo Duarte (2006) a venda das propriedades dos colonos aos imigrantes fizeram com que muitas áreas de mata virgem fossem desmatadas e usadas para a criação de gado e para as lavouras. Tais atividades econômicas, na visão dos colonos, não promoveram a distribuição de riquezas, apenas estimulou o crescimento populacional, a concentração fundiária e o aumento da pobreza.

Sabendo disso, o governo e a própria população buscaram alternativas que pudessem melhorar a qualidade de vida na região. Partindo dessa premissa, deu-se início em 1993 a atividade apícola impulsionada pelo padre José Ribamar Abas Filho, da paróquia de Santa Luzia do Paruá, que geraria

além de renda a diminuição das queimadas e do desmatamento (SEBRAE, 2006).

Num primeiro momento a produção foi pequena e desmotivou os produtores. Surgiu, então, a necessidade de organização das famílias por meio do associativismo. Desse movimento surgiu a Associação dos Apicultores do Alto Turi (Turimel). A partir daí, a produção vem aumentando no decorrer dos anos e consolidou a região do Alto Turi como uma das maiores produtoras de mel (SEBRAE, 2006).

No entanto, muitos desafios vêm surgindo como, por exemplo, a obtenção do Selo de Inspeção Federal (SIF) nacional e internacional. Para a aquisição de ambos é necessária que o mel apresente conformidade com critérios estabelecidos por lei como, por exemplo, os parâmetros das análises físico-químicas e análises de resíduos de pesticidas e antibióticos.

A procura por melhorias na produção e na administração da associação Turimel, fez com que houvesse a busca por parceiros importantes como: SEBRAE, UFMA, BNB, UEMA, dentre outros. Com auxílio desses parceiros a Turimel conseguiu melhorar sua estrutura física e atualmente conta um número razoável de apicultores associados, em Santa Luzia do Paruá especificamente, são aproximadamente 32 apicultores, com 975 colméias (BRITO, 2009). Na Figura 1 é mostrado o entreposto da Turimel.

Figura 1: Estrutura física da Associação Turimel



Fonte: Arquivo pessoal

Na Figura 2, é mostrada a parte interna da Turimel e alguns equipamentos usados na extração das amostras de mel. Os decantadores e as centrifugas são de aço inoxidável seguindo, assim, o recomendado pelas normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para o mel, designadas pelo MAPA (1985).

Figura 2: Equipamentos da associação Turimel - decantadores e centrifugas

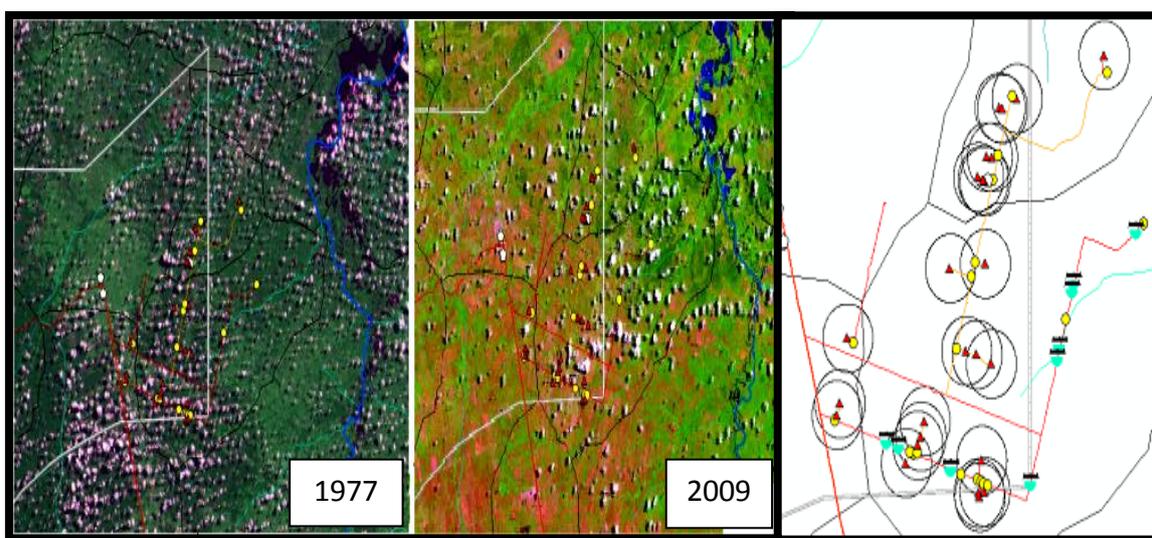


Fonte: Arquivo pessoal

Apesar do empenho dos parceiros e dos apicultores em transformar a apicultura numa atividade rentável, ainda existem empecilhos que dificultam a exportação do mel e o crescimento da produção. Um dos problemas enfrentados pelos apicultores é que durante muito tempo não havia a preocupação com o ambiente, dando-se prioridade à criação de gado. Então extensas áreas de mata virgem foram queimadas, derrubadas para conseguinte plantação da braquiária (*Brachiária*), que é um tipo de vegetação que impede o desenvolvimento das gramíneas nativas e sufoca o desenvolvimento dos campos nativos. Sendo assim, o aumento dessas atividades altera o espaço percorrido pelas abelhas, fazendo com que voem cada vez mais longe em busca de alimento aumentando assim, a probabilidade de contaminação por agrotóxicos usados em plantações distantes da área do apiário (BRITO, 2009).

A concentração de apiários numa pequena região também é resultado de produção menor do que esperado de mel, pois as abelhas têm que competir por alimento ou buscar os mesmos em outros locais, o que recai na problemática anterior (BRITO, 2009). Na Figura 3, é mostrada a densidade dos apiários numa região, onde também é possível se verificar os efeitos do desmatamento no decorrer dos anos.

Figura 3: Comparação da mata nativa em diferentes anos e estudo da densidade de apiários, onde triângulos vermelhos sinalizam apiários e bolas amarelas as residências dos apicultores



Fonte: BRITO, 2009

As queimadas também são motivo de reclamação por parte dos apicultores, pois estas são feitas com descaso, sem nenhuma preocupação com o ambiente, gerando muita poluição, queima de muitas colméias, além de dificultar a visibilidade nas estradas podendo ocasionar acidentes graves. Sendo assim, durante os períodos de queimadas, fica quase impossível produzir mel na região. A solução tem sido a apicultura migratória que, entretanto, altera características do mel e pode comprometer a qualidade do produto apícola (BRITO, 2009).

Apesar das dificuldades, o mel da região do Alto Turi tem-se mostrado de excelente qualidade, indicando, assim, potencial para comercialização no mercado externo desde que atendidas às exigências de qualidade que incluem, além das análises físico-químicas, o controle de resíduos.

2.3 Mel e sua composição

O mel é resultado da desidratação e transformação do néctar. A quantidade de mel que pode ser obtida de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar e, ainda, com a concentração e proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar, dentre outros fatores (CRANE, 1975).

Quimicamente falando, o mel é altamente higroscópico e muito concentrado. Como amostra para análise, é considerada uma matriz muito complexa (KUJAWSKI, 2008). A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar da espécie vegetal produtora e da espécie de abelha que o produz, conferindo-lhe características específicas, enquanto que as condições edafo-climáticas e o manejo do apicultor têm menor influência na composição (WHITE JÚNIOR, 1978).

O mel apresenta-se, em condições normais, como uma solução líquida com baixo teor de água (entre 13 a 20%) e alta concentração de matéria seca. Possui grande quantidade de açúcares simples (média de 32% de glicose e 38% de frutose) e pequenas quantidades de outros açúcares (sacarose, maltose e outros dissacarídeos), sais minerais (potássio, sódio, cloro, enxofre, cálcio, fósforo, silício, ferro e magnésio), aminoácidos e enzimas (NOGUEIRA COUTO & COUTO, 2006).

O mel é um alimento rico em vitaminas D, E e do complexo B; possui ainda teores consideráveis de substâncias anti-oxidantes, por exemplo, os flavonoides, dentre outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos do organismo humano (REVISTA RURAL, 2008).

Os componentes encontrados nos méis e a interação entre eles fazem com que o este seja um alimento altamente nutritivo e possa ser utilizado de forma medicinal. Dentre as propriedades terapêuticas do mel pode-se citar: atividade antimicrobiana, propriedades antioxidantes, propriedades prebióticas. Além de poder ser usado como: cicatrizante, promotor de epitelização das extremidades de feridas, promotor no tratamento de úlceras e problemas respiratórios, têm propriedades antianêmica, é emoliente, antiputrefante,

digestivo, laxativo e diurético, entre outros (PEREIRA; LOPES; CAMARGO, 2003).

Sua atividade antimicrobiana talvez seja seu efeito medicinal mais ativo (SATO et al., 2000). Conforme Manyi-Loh e colaboradores (2010), a atividade antimicrobiana tem importância terapêutica, em especial nos casos em que a resposta do organismo é insuficiente para limpar a infecção. A interação entre vários fatores é responsável pela atividade antimicrobiana. A reação enzimática glicose-oxidase e algumas de suas propriedades físicas são consideradas os principais fatores (SILVA, 2006a). De acordo com Taormina (2001) citado por Silva (2006a) outros fatores que podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do mel são: elevada pressão osmótica/baixa atividade de água, baixo pH/meio ácido, baixo conteúdo protéico, baixo potencial redox devido ao alto teor de açúcares redutores, a viscosidade que limita a solubilidade do oxigênio e outros agentes químicos e fitoquímicos.

Segundo Pittella (2009), devido aos benefícios trazidos pelo mel, ele torna-se um produto muito valorizado no mercado externo e seu preço oscila em níveis altos, se comparado com outros produtos. Por isso, a busca por rigorosos padrões de qualidade torna-se necessária para atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente.

2.4 Mel orgânico

O conceito de consumo sustentável tem crescido muito nos últimos anos, com isso o mercado procura metodologias, produtos que estejam engajados em algum tema social e ambiental ou melhor que sigam essa nova visão dos consumidores. Um dos produtos que se pode citar nesse conceito de sustentabilidade são os produtos orgânicos. De acordo com Mandail e colaboradores (2011), o aumento da produção e do consumo de produtos orgânicos foi impulsionado pela aquisição da consciência dos malefícios das substâncias químicas para a saúde do consumidor, do produtor, dos animais e do meio ambiente.

Segundo o Ministério da Agricultura e Abastecimento, alimentos orgânicos são aqueles que em sua produção adotam técnicas específicas,

mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

Nesse contexto de alimentos orgânicos, pode-se inserir a apicultura, por se tratar de uma atividade que está pautada no tripé da sustentabilidade: o econômico, porque gera renda aos agricultores, o social, porque utiliza a mão-de-obra familiar no campo, diminuindo o êxodo rural, e por ser essencialmente ecológica, já que é uma atividade conservadora das espécies, através da polinização promovida pelas abelhas e por não gerar resíduos tóxicos (GUIMARÃES, 1989).

No Brasil, a apicultura orgânica tem mostrado seu potencial devido às características do mel brasileiro que o enquadram, naturalmente, como mel orgânico. Segundo Camargo (2012), isso se deve à utilização de abelha africanizada que, por ser um animal híbrido, apresenta peculiaridades que permitem uma produção apícola intensiva sem qualquer utilização de medicamentos ou drogas veterinárias, o que propicia produção de mel livre de resíduos de tais substâncias. Além disso, segundo o mesmo autor, os pastos apícolas estão situados em áreas naturais e de espécies vegetais nativas, que ocorrem em regiões de baixa atividade agrícola intensiva, com predominância da agricultura de subsistência, ou em vastas áreas naturais, sem a proximidade de áreas agriculturáveis com a aplicação de diversos produtos agrícolas, não apresentando risco de contaminação pelo uso intenso desses agroquímicos, tão usuais na agricultura mecanizada.

Apesar das vantagens do mel brasileiro em relação aos dos grandes produtores, o mesmo ainda é comercializado sem diferenciações, a preços inferiores ao valor real. Grandes compradores aproveitam a falta de organização dos produtores para lucrarem. Por isso, é importante a avaliação das características dos méis brasileiros para a obtenção de preços

diferenciados e, conseqüentemente, a obtenção de maior lucratividade como ocorreu com o mel de manuka da Nova Zelândia que teve suas características tipificadas e que por isso são vendidos em nichos de mercado, como produtos exóticos ou terapêuticos, com valores diferenciados e muito acima dos pagos aos méis convencionais (CAMARGO, 2012).

A agregação de valor do mel brasileiro pode ser feito através de certificações do produto apícola como orgânico. As principais exigências feitas pelas certificadoras são (SALOMÉ, 2007):

- O pasto apícola deve ser ou estar instalado em propriedades sob manejo orgânico ou em áreas de mata nativa;
- Os apiários devem estar localizados a uma distância de, no mínimo, 3 km de áreas com manejo agrícola convencional e fontes contaminantes;
- A utilização de alimentação suplementar nos apiários, se utilizada deve ser feita com produtos orgânicos e em época apropriada;
- Deverá haver água de boa qualidade e de fácil acesso às abelhas;
- A origem da cera, dos enxames, das rainhas (em possível trabalho de seleção) e do material combustível utilizado no fumegador devem ser provenientes de apiários orgânicos certificados e/ou de regiões sem possibilidade de contaminação;
- Na limpeza e fabricação das colméias não devem ser utilizados produtos tóxicos às abelhas, para o meio ambiente ou que possam comprometer a integridade orgânica do mel.
- Quanto à unidade de extração/processamento, o mel não pode ser aquecido a mais de 37,5 °C ou filtrado sob pressão. A extração, manuseio e processamento de produtos apícolas deverão ser feitos usando material inoxidável lavado com água quente;
- O uso de medicamentos não autorizado é proibido. Se houver necessidade de tratamento, os homeopáticos e naturais devem ser priorizados;
- As embalagens devem ser aprovadas por órgão competentes e homologadas pelas certificadoras.

Além disso, o processo de certificação orgânica ultrapassa a área comercial, pois considera não apenas os sistemas de obtenção de produtos isolados e sim processos mais sustentáveis ecologicamente e socialmente. (SEBRAE, 2008)

Apesar do aumento da produção de mel orgânico no Brasil, tanto em níveis de produção como de exportação, o processo de certificação, segundo Pacheco Filho (2005), ainda tem um custo alto dificultando, assim, uma maior adesão de produtores, apesar do selo agregar valor ao produto.

Santa Luzia do Paruá – MA, localizada na mesorregião do oeste maranhense e situada na região Pré – Amazônica, possui potencial de produzir mel orgânico, visto que nessa cidade a atividade apícola é desenvolvida em mata nativa (Figura 4) e tem uma flora bastante diversificada que possibilita sabor peculiar ao mel dessa região. Segundo Marques et al. (2011) as principais famílias utilizadas por *Apis mellifera* em Santa Luzia do Paruá são: Amaranthaceae, Arecaceae, Asteraceae, Urticaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Fabaceae-Mimosoideae, Flacourtiaceae, Myrtaceae, Poaceae, Rubiaceae, *Mimosa pudica*, *Borreria*, *Hyptis* e *Euterpe*.

Além disso, em Santa Luzia do Paruá, faz-se uso da abelha africanizada na produção de mel, que é uma espécie de abelha bastante resistente a doenças. E a incidência do uso de agrotóxicos ainda é minimizada, devido à produção ser de pequeno porte. Não se tem histórico do uso de agrotóxicos em regiões próximas ao pasto apícola.

Figura 4: Apiários localizados em mata nativa



Fonte: arquivo pessoal

Somando-se a tais fatores, no final de 2009, foi feito um levantamento da atividade apícola em Santa Luzia do Paruá, através do plano piloto de georreferenciamento, o qual teve como objetivo juntar parceiros na metodologia SIG-PNGEO (Sistema de Informações Geográfica - Programa Nacional de Georreferenciamento e Cadastro de Apicultores) da Confederação Brasileira de Apicultores a fim de fazer georreferenciamento de toda a região do Alto Turi – MA. Com o trabalho foi possível identificar os fatores de vulnerabilidade da atividade apícola visando a aplicação de medidas preventivas, garantindo assim a viabilidade econômica à atividade e segurança alimentar (BRITO, 2010).

Os dados obtidos são importantes ferramentas para aplicação na apicultura orgânica. Segundo Miranda (2004), os dados servem para determinar a localização exata dos apiários, de forma a evitar a concentração de abelhas em espaços inadequados. Mediante o uso do sistema é possível monitorar o raio de ação das abelhas de cada apiário, possibilitando a produção de mel orgânico. Caso haja algum lugar onde as abelhas estejam coletando pólen com interferência humana, é possível fazer o remanejamento da colméia.

Todos os fatores citados mostram que Santa Luzia do Paruá tem possibilidades de produzir mel orgânico de qualidade, seguindo as recomendações dos órgãos de certificações e das normas do regulamento técnico de identidade do mel.

2.5 Doença das abelhas

A apicultura, assim como em todas as atividades agropecuárias, está sujeita a perda de lucro e de produtividade provocados por doenças que atingem os apiários.

De acordo com De Jong (2012), a apicultura, através dos anos, tem encontrado vários tipos de obstáculos para manter as abelhas saudáveis, entretanto, as perdas aumentaram muito em anos recentes e os novos sintomas afetam seriamente a apicultura e as culturas que dependem das abelhas para a polinização.

A averiguação da saúde das abelhas é uma ferramenta importante para prevenir e tratar as doenças. A saúde desses insetos está ligada a fatores de várias naturezas (bacteriana, viral, parasitária, e outros), a disponibilidade de tratamentos adequados, as espécies invasivas e as mudanças ambientais. Outro fator a se considerar, é a utilização de agrotóxicos na agricultura que também podem influenciar a saúde das mesmas (COMISSÃO EUROPEIA, 2010).

A Comissão Europeia (2010) relata ainda que há provas científicas cada vez maiores de que as abelhas que têm acesso a uma mistura de pólen de plantas diferentes são mais saudáveis do que as que se alimentam apenas de um tipo de pólen.

As doenças podem atingir as abelhas tanto em fase de cria como na fase adulta. As principais doenças que atingem as abelhas na fase de cria são: cria pútrida americana, cria pútrida europeia e cria ensacada. Na fase adulta pode-se citar a nosemose, acariose, paralisia, amebíase, septicemia e varroase. Segundo pesquisa realizada por Pereira e colaboradores (2003), doenças em crias geralmente causam maiores prejuízos do que em abelhas adultas. Sabendo disso, deu-se ênfase ao estudo da cria pútrida americana.

2.5.1 Cria pútrida americana

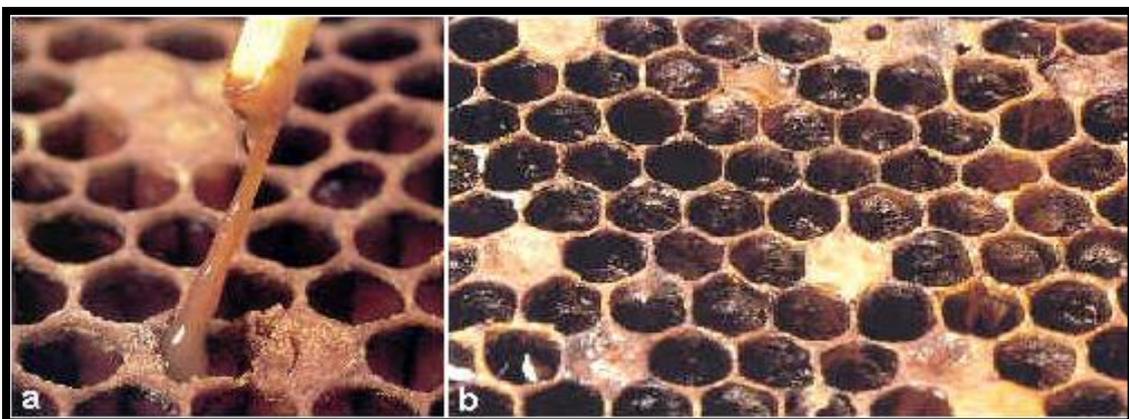
A cria pútrida americana (AFB) é responsável por sérios danos causados à apicultura mundial nos últimos anos. Ela é uma doença bacteriana produzida pelo bacilo *Paenibacillus Larvae* e que atinge as abelhas no estado de larva e pupa. A contaminação ocorre através da ingestão de alimento contaminado com esporos desta bactéria.

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (2007), tal bactéria pode produzir mais de um bilhão de esporos em cada larva infectada. Os esporos sobrevivem por longo tempo e são extremamente resistentes ao calor e agentes químicos. Apenas os esporos são capazes de causar a doença. Os alvéolos de apiários infectados podem apresentar sinais clínicos característicos que permitem o diagnóstico da doença.

Sabendo disso, é importante que o apicultor esteja atento às mudanças que ocorrem nas colméias verificando, de acordo com as orientações do SEBRAE (2007) e de pesquisadores da EMBRAPA (PEREIRA; LOPES; CAMARGO, 2003):

- A ocorrência de favos falhados com opérculos perfurados, escurecidos e afundados;
- As larvas mortas apresentam consistência viscosa e coloração marrom-escura, como mostrado na Figura 5a;
- Pré-pupas ou pupas com mudança de cor em toda extensão do corpo;
- Cheiro pútrido;
- Presença de escamas ao longo da parede lateral do alvéolo (restos da cria já seca e muito escura), normalmente de difícil remoção como mostrado na Figura 5b. Entre outros sintomas característicos da doença.

Figura 5: Sintomas da Cria Pútrida Americana - (a) consistência viscosa da cria (teste do palito), restos de crias mortas e (b) ressecadas coladas nas paredes do alvéolo



Fonte: EMBRAPA, 2003

Por se tratar de uma doença que pode dizimar enxames é necessário que o apicultor tome todas as medidas cabíveis na proteção de suas colméias. Esse cuidado vai desde a compra de alimento para as abelhas, até a compra de rainhas e novos enxames. Apesar da doença não se manifestar em abelhas adultas, as mesmas podem servir de veículo para transmissão da doença para as crias.

No Brasil, o primeiro foco da contaminação das abelhas pela cria pútrida americana, foi registrado em 2006 no município de Quatro Barras, estado do Paraná, como resultado da compra de alimento importado para as abelhas (mel e pólen) que estavam contaminados com a bactéria *Paenibacillus larvae*. Conforme Silva (2010) um programa de contingenciamento foi deflagrado pelo Comitê Consultivo Científico em Sanidade Apícola do MAPA visando controlar o foco.

Apesar do controle do primeiro foco da AFB no Brasil, Gramacho (2004) relata que ainda não há política adequada no país no que se diz respeito ao controle da entrada de mel e produtos apícolas estrangeiros, podendo a importação servir como entrada da doença em nosso país.

Muitas pesquisas têm sido realizadas com intuito de se conseguir um híbrido ainda mais resistente que a abelha africanizada no combate a AFB. Para isso Taber (1982) comenta, ao analisar os resultados descobertos por Rothenbuhler (1964a, b), que os dois genes descritos para o comportamento higiênico (r= removedor e d= desoperculador) conferem às abelhas uma resistência a todas as doenças de crias (GRAMACHO, 2004). Então essa é uma alternativa para controle da AFB em vários países, visto que o tratamento por antibiótico, além de gerar resíduos ao mel, não é eficaz, pois as bactérias são resistentes a esse tratamento e também a agentes químicos.

2.6 Avaliação da qualidade dos méis

2.6.1 Análise dos parâmetros físico-químicos

Segundo Marchini (2001), a produção de mel depende, dentre outras, da abundância e da qualidade das flores existentes no raio de ação das abelhas. Desta forma, como a flora brasileira é bastante diversificada, em consequência da extensão territorial do país e da variabilidade climática existente, é fundamental a caracterização regional dos méis e o estabelecimento de padrões, levando-se em consideração a grande diversidade botânica e variações climáticas de cada região.

No entanto, apesar da variação dos méis, o Ministério da Agricultura e Abastecimento através da Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000,

definiu algumas análises necessárias a fim de assegurar condições igualitárias e total transparência na elaboração e comercialização do mel (BRASIL, 2000). Existe, portanto, uma padronização indicando assim possíveis fraudes e/ ou a identidade dos méis de uma região.

Parâmetros sensoriais e físico-químicos são utilizados como requisitos na determinação da condição de qualidade do mel, além das análises de resíduos de agrotóxicos e drogas veterinárias no mesmo.

2.6.1.1 Parâmetros sensoriais

2.6.1.2 Cor

A cor do mel é um fator determinante no mercado mundial de acordo com Carvalho (2005). Segundo o mesmo autor, há uma tendência dos méis claros serem preferidos pelos consumidores, conseqüentemente, têm maior valor comercial que os escuros. Existe uma relação imperfeita entre a cor e o sabor, pois se acredita que méis com sabor agradável são sempre claros, enquanto que méis escuros têm, normalmente, um sabor forte.

De acordo com González (2002) citado Silva (2006b), a cor do mel está ligada a diversos fatores:

- ✓ Origem floral e a composição físico-química do produto: o mel escuro possui maior acidez, conteúdo mineral e são mais ricas em dextrinas, enquanto que o de cor clara contém mais glicose e frutose;
- ✓ Características climatológicas e ambientais: o mel colhido na primavera, em ambientes úmidos, tem cor mais clara de que méis do final de temporada;
- ✓ Presença de pigmentos: carotenos, xantofilas, elementos minerais e polifenóis;
- ✓ Maturação; presença de impurezas e aquecimento inadequado.

A cor do mel é classificada de branco d'água a âmbar escuro (BRASIL, 2000). No mercado internacional a preferência é por méis com classificação entre extra-branco e extra âmbar claro (MOURA, 2006).

2.6.1.3 Sabor e aroma

O sabor e o aroma do mel são influenciados por vários fatores: origem floral, cor, condições de armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo do néctar, técnicas de preparação e presença de microrganismos como leveduras (BASTOS, 2002; SEEMANN & NEIRA, 1988).

O aroma e o sabor característico são conferidos aos alimentos pela presença dos compostos voláteis (BASTOS et al., 2002). A composição desses voláteis em um alimento é muito complexa, pois consiste em um grande número de substâncias orgânicas (FACUNDO, 2009). Em geral, os compostos voláteis mais agradáveis do mel são aqueles com menor ponto de ebulição. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-lo dos favos. O envelhecimento do mel leva a uma perda de seu aroma característico, devido ao aparecimento de compostos como alcoóis superiores, quando ocorre contaminação microbiológica, e de compostos furânicos, relacionados à degradação de açúcares presentes no mel (CHERCHI, 1997; BASTOS et al., 2002)

2.6.2 Parâmetros físico-químicos

2.6.2.1 Maturidade

2.6.2.1.1 Umidade

A água é o segundo componente em quantidade na composição do mel variando, geralmente, de 15 a 20%. Normalmente, quando o mel se encontra maduro tem menos de 18,5% de umidade (SEEMANN & NEIRA, 1988). Schweitzer (2001), afirma que acima desse valor, o risco de fermentação é elevado, pois de acordo com White Júnior (1978), certos microrganismos tolerantes ao açúcar, quando presentes no mel, multiplicam-se com o aumento da umidade. Estes microrganismos estão presentes nos

corpos das abelhas, no néctar, no solo, nas áreas de extração e armazenamento do mel.

Crane (1998) relata que estudos realizados na Universidade de Michigan, USA, mostraram que mel armazenado em ambiente com umidade relativa do ar superior a 60% absorve água, e, quando a estocagem é feita em ambiente com umidade relativa do ar inferior a 60%, ele libera umidade. Portanto, cuidados durante a etapa de extração, centrifugação, envase e armazenamento do mel devem ser tomados.

Segundo a Pereira e colaboradores (2003) a etapa de centrifugação, por exemplo, é crítica visto que a centrífuga pulveriza o mel em micro partículas, favorecendo a absorção de água pela formação de uma grande superfície em relação ao volume. Por isso, recomenda-se que a sala de centrifugação seja equipada com desumidificador de ambiente.

A umidade pode ser influenciada pela origem botânica da planta, por condições climáticas e geográficas ou pela colheita do mel antes da sua completa maturidade. A umidade é uma das características mais importantes, por influenciar na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade (SEEMANN E NEIRA, 1988; SILVA, 2005).

De acordo com a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2000), é estipulado como teor máximo de umidade 20%. Acima desse valor, processos fermentativos são favorecidos.

2.6.2.1.2 Açúcares Redutores e Sacarose Aparente

Os carboidratos representam a maior porção de matéria seca do mel, sendo responsável por suas qualidades e propriedades físicas: viscosidade, propriedades térmicas, higroscópicas, granulométricas, valor energético e a atividade antibacteriana (CRANE, 1975, 1990; WHITE JÚNIOR, 1979; ARRUDA, 2003).

Segundo Moreira & De Maria (2001), o mel é uma solução concentrada de dois monossacarídeos: D-frutose e D-glicose. As proporções em que cada um dos açúcares se encontram nos méis variam muito, dependendo das flores de onde as abelhas foram em busca do néctar e também, de certa forma, da

atividade da invertase. A invertase, formada provavelmente nas glândulas das abelhas, atua como agente catalítico transformando qualquer quantidade de sacarose, que já se encontra no néctar, em produtos hidrolisados, glicose e frutose (ROOT, 1973; STONOGA e FREITAS, 1991).

De modo geral, há predominância de frutose sobre a glicose (MOREIRA & DE MARIA 2001; CRANE, 1976). Casos raros de méis com mais glicose que frutose são encontrados e como esses apresentam cristalização mais rápida, são menos aceitos pelos consumidores. De acordo com entrevista feita por Zamberlan e Santos (2010), 46% dos consumidores de méis desconfiam da qualidade do produto quando este está cristalizado.

Os demais açúcares do mel são representados por dissacarídeos e trissacarídeos (WHITE JÚNIOR, 1979). Dentre os dissacarídeos, a sacarose representa em média 2 a 3% dos carboidratos para os méis de *Apis* e quando superior a este valor, geralmente indica um mel verde ou adulterado. (CARVALHO, 2005; SILVA, 2005). A legislação vigente aceita como percentual máximo de sacarose aparente 6% para méis florais.

A análise de açúcares redutores em mel é importante, visto que os açúcares desempenham um papel importante na conservação do mel, a pressão osmótica que exercem impedem o desenvolvimento de leveduras e outros microorganismos (SILVA, 2006b). Teores altos de açúcares podem indicar adulterações com açúcar comercial (ARAÚJO, 2006).

A legislação determina 65% como mínimo de açúcares redutores em méis florais.

2.6.2.2 Pureza

2.6.2.2.1 Sólidos Insolúveis

Os sólidos insolúveis são as partículas do mel maiores que 15,40 µm e que não são solúveis em água a 80 °C. Grãos de areia, restos vegetais e madeira que não atendem a essa determinação significam falhas na execução das Boas Práticas Apícolas (BPA) em todo o processo produtivo (SENAI, 2009b; MOURA, 2010).

Sendo assim, o teor de sólidos insolúveis determina se os méis em estudo apresentam bons índices de pureza, e também, trata-se de uma análise que permite saber as condições higiênico-sanitária às quais os méis foram submetidas.

De acordo com a legislação vigente estabelecida pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2000), o teor máximo permitido de sólidos insolúveis em água no mel é de 0,1%, exceto em mel prensado, em que se tolera até 0,5%, unicamente em produtos acondicionados para sua venda direta ao consumidor.

2.6.2.2.2 Minerais ou Cinzas

O teor de cinzas expressa os minerais presentes no mel, sendo bastante utilizado na verificação da qualidade do produto (CARVALHO et al., 2005). Nesta análise, é possível verificar irregularidades nos méis, como por exemplo, a falta de higiene e a não decantação e/ou filtração no final do processo de retirada do mel pelo apicultor (VILHENA; ALMEIDA-MURADIAN, 1999; EVANGELISTA-RODRIGUES, 2005).

A proporção de minerais pode ser alterada em função de diversos fatores como a origem floral, região, espécie de abelhas e tipo de manejo (LASCEVE & GONNETE, 1974). Influem diretamente na coloração do mel, estando presentes em maior concentração nos méis escuros, em comparação com os claros (ORTIZ-VALBUENA, 1989). Já foram identificados no mel inúmeros elementos químicos: K, Na, Ca, Mg, Mn, Ti, Co, Mo, Fe, Cu, Li, Ni, Pb, Sn, Zn, Os, Ba, Ga, Bi, Ag, Au, Ge, Sr, Be, Va, Zn (WHITE JÚNIOR, 1979).

2.6.2.3 Deteriorização

2.6.2.3.1 Acidez Livre

Os ácidos contidos nos méis podem ser provenientes de diversos fatores entre eles as diferentes fontes de néctar, atividade enzimática da glicose-oxidase que origina o ácido glucônico, ação das bactérias durante a

maturação e aos minerais presentes na sua composição (WHITE, 1975; HORN et al., 1996).

Dentre esses ácidos, o ácido glucônico é o que se apresenta em maior quantidade nos méis. Em menores quantidades, pode-se encontrar os ácidos: acético, butírico, láctico, oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, butiricolático, tartárico, maléico, piroglutâmico, alfa-cetoglutárico, 2- ou 3-fosfoglicérico, alfa- ou beta-glicerofosfato e vínico (WHITE, 1975; PEREIRA et al., 2003).

Segundo o Instituto Adolfo Lutz (1985) num processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, a concentração dos íons de hidrogênio apresenta-se quase sempre alterada, revelando assim, na medição dessa concentração, seu estado atual de conservação. Sendo assim, a acidez pode ser utilizada como parâmetro para determinação da qualidade dos méis.

Segundo a Legislação vigente estabelecida pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2000), o teor máximo permitido de acidez no mel é de 50 meq kg⁻¹.

2.6.2.3.2 Atividade Diastásica

A diastase (α -amilase) é uma das enzimas presentes no mel, formada principalmente pelas glândulas hipofaringeanas das abelhas, sendo encontrada também, em baixa proporção, nos grãos de pólen (PAMPLONA, 1989). Sua função é digerir a molécula de amido, estando, possivelmente, envolvida na digestão do pólen. Segundo Vansell & Freeborn (apud CARVALHO, 2005) existe uma perfeita correlação entre a quantidade de pólen no mel e a atividade da diastase.

Segundo Crane (1983), a diastase não está presente nos xaropes de açúcar invertido preparados por aquecimento e inversão ácida de sacarose de cana, e a adição desse tipo de xarope ao mel certamente diminuiria o índice de diástase do produto, na mesma proporção da fraude.

A ausência da diástase reflete procedimentos e/ou adulterações realizadas no mel, tal como uso de temperatura acima de 60 °C durante o

beneficiamento, adição de açúcar invertido, condições de armazenamento inadequadas (tempo de armazenamento acima de seis meses e temperaturas elevadas). A atividade diastásica diminui devido à desnaturação parcial ou total das amilases (AROUCHA et al., 2008).

White Júnior (1994) sugeriu que a atividade diastásica fosse retirada dos parâmetros que definem a qualidade do mel por se tratar de uma análise com resultados variantes em méis recém-colhidos e não aquecidos dependendo, por exemplo, do clima das regiões. Segundo o mesmo autor os méis produzidos em regiões quentes e secas apresentam menor atividade de enzimas do que os de regiões quentes e úmidas.

A Legislação Brasileira define como aceitáveis valores ≥ 8 (BRASIL, 2000).

2.6.2.3.3 Hidroximetilfurfural

A liquefação do mel por meio de aquecimento é uma prática comumente usada por consumidores de méis. Essa prática pode reduzir a umidade e retardar a cristalização, mas é prejudicial, pois além da perda de propriedades nutritivas importantes do mel, forma-se um componente indesejável, o hidroximetilfurfural.

Sabendo disso, a determinação de teores de hidroximetilfurfural em mel indicaria se o mesmo passou por processos de aquecimentos desejáveis (liquefação do mel para melhor vendagem) ou indesejáveis (quando armazenados em locais inapropriados), indicaria o tempo de estocagem visto que em méis frescos, uma pequena quantidade de HMF é encontrada (DURAN et al., 1998) e também se houve adulterações por meio da adição de xaropes.

A formação do 5-hidroximetilfurfural no mel, bem como em vários outros alimentos, deve-se à desidratação das hexoses catalisadas por ácidos (BELITZ; GROSCHE, 1992). A presença no mel de açúcares simples e água em meio ácido fornece condições favoráveis à formação desse composto furânico (NOZAL et al., 2001; SILVA, 2008b).

Segundo Spano e colaboradores (2006) o HMF é um dos principais produtos de degradação no mel sendo o aumento de sua concentração

influenciada pelo baixo pH, acidez total, minerais, origem botânica, umidade e temperatura.

A legislação brasileira estabeleceu como máximo de HMF 60 mg kg⁻¹ em mel.

2.7 Análise de resíduos em mel

Atualmente, a busca por lucros cada vez maiores, a obtenção de retorno de prazo menor na atividade econômica e o aumento na produção de alimento, causado pela abertura ao comércio internacional, vem aumentando o uso de insumos químicos. Tais práticas, no entanto, podem afetar a qualidade dos alimentos, fazendo com que haja necessidade da análise rotineira para avaliar a qualidade dos alimentos frente aos resíduos.

Segundo Kujawski (2008), os benefícios do mel podem ser suprimidos por toxinas, poluentes e contaminantes introduzidos ao mel durante o seu processamento, resultante do ambiente e/ou de práticas agrícolas e apícolas.

Em se tratando de prática apícola, um dos perigos químicos que se destaca é o uso de medicamentos veterinários, que devido à inobservância de boas práticas veterinárias, podem levar a resíduos no mel e, conseqüentemente, prejuízos à saúde do consumidor, não cumprindo portanto com a norma do termo de Segurança Alimentar (ISO 22000), o qual diz-se que deve-se controlar os perigos no processo produtivo, evitando assim qualquer tipo de contaminação do produto e garantindo que o mesmo esteja seguro no momento do consumo (ABNT, 2006).

Além disso, é uma exigência do mercado que o mel seja isento de resíduos de medicamentos veterinários.

No Brasil, o controle de resíduos em mel é feita através do Plano Nacional de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PCRN mais especificamente pelo Programa de Controle de Resíduos em Mel - PCRM. Este direciona suas ações ao conhecimento das violações em decorrência do uso indevido de medicamentos veterinários ou de contaminantes ambientais (BRASIL, 1999).

Os antibióticos fazem parte dos compostos que podem contaminar o mel, devido ao seu uso no combate a doenças que afetam as colméias. Os principais antibióticos que têm sido detectados em mel segundo Bogdanov (2006) são: estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclinas e cloranfenicol.

2.7.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SAs) pertencem à classe dos agentes antimicrobianos e são compostos sintéticos derivados do para-amino-benzeno-sulfonamida (ANVISA, 2007; ALABURDA et al., 2007; SANTOS, 2009).

De acordo com Spinosa (2002), antimicrobianos são substâncias químicas inespecíficas ou específicas que atuam sobre os microrganismos em geral, patogênicos ou não. Pertencem ao primeiro grupo os desinfetantes e anti-sépticos, ao segundo, os quimioterápicos e os antibióticos, que são substâncias sintetizadas em laboratório e produzidas parcial ou totalmente por microrganismos, respectivamente.

O uso de antimicrobianos é justificado por serem utilizados na produção animal para diversos fins (ANADÓN & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999; AARESTRUP, 2005; MAMANI, 2007; e BANDO, 2006):

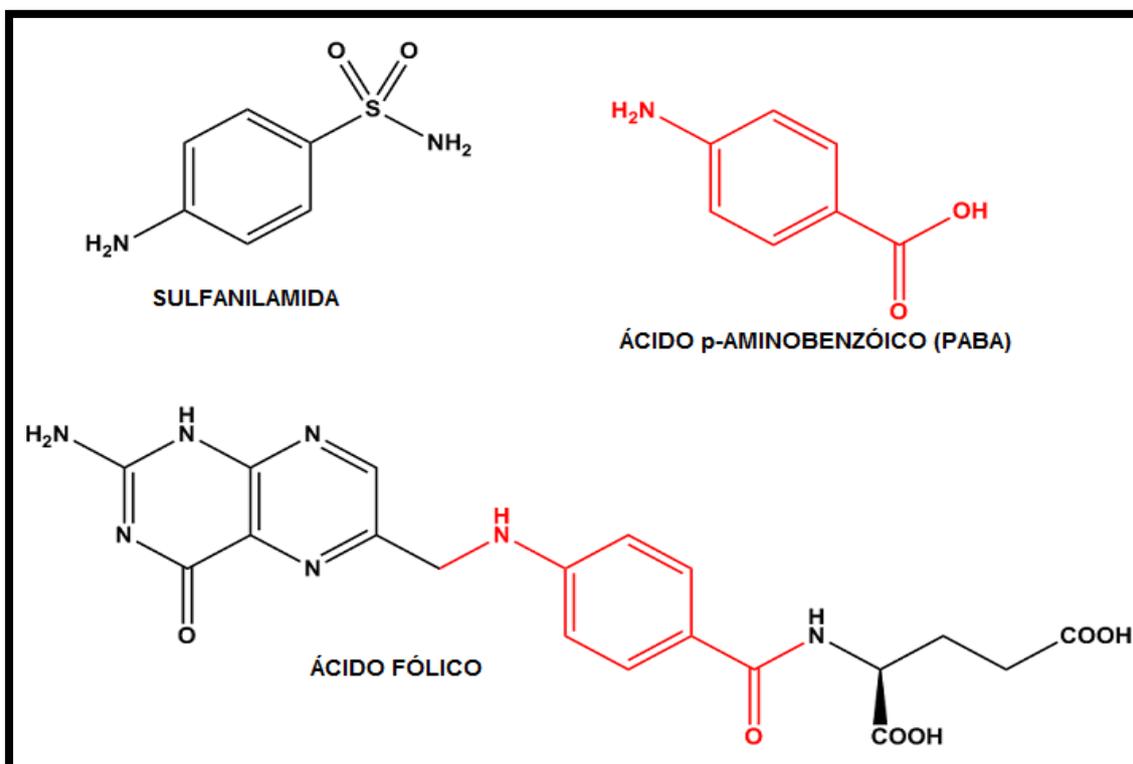
- (a) tratar enfermidades (terapêutico);
- (b) prevenir contra enfermidades (profilático);
- (c) prevenir que animais saudáveis que pertençam ao mesmo rebanho ou cercado dos animais com sinais clínicos sejam contaminados (metafilático);
- (d) melhorar a taxa de crescimento ou conversão alimentar (promotores de crescimento).

Na criação racional das abelhas, as sulfonamidas são utilizadas no tratamento e prevenção das doenças, ou melhor, para fins terapêuticos e profiláticos (ZOTOU & VASILIADOU, 2006). Mas especificamente, elas podem ser usadas no combate à Cria Pútrida Americana, doença provocada pelo *Paenebacillus Larvae*.

Segundo Santos (2009), as sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA), como

mostrado na Figura 6, daí explica-se o mecanismo de ação dessas substâncias. Como relatado por Goodman & Gilman (1990) as sulfonamidas atuam competindo com o ácido p-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico. Elas, então, agem como antimetabólitos, ou seja, as bactérias utilizam as sulfas no lugar do PABA (que é necessário para a síntese do ácido fólico) e, como consequência, o ácido diidrofólico não é formado e nem o material genético bacteriano (MARQUES, 2011).

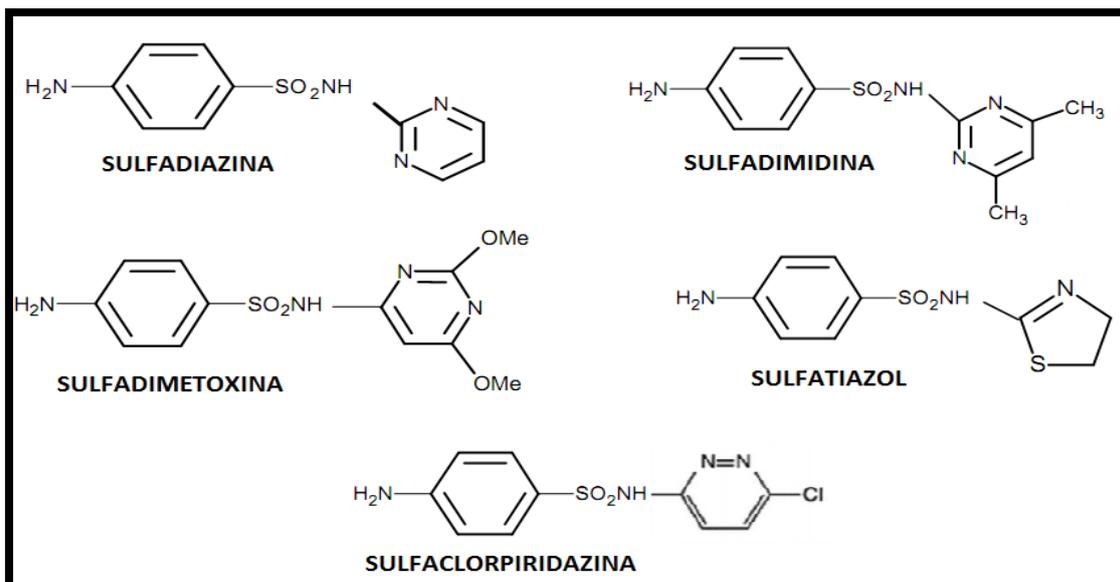
Figura 6: Semelhança estrutural entre sulfonamidas e o ácido p-aminobenzóico (PABA)



Fonte: AFONSO, 2008

Todas as sulfonamidas têm o mesmo núcleo, como mostrado na Figura 7, nestes são adicionados ou substituindo vários grupos funcionais ao grupo amida. Estas alterações originam compostos com diferentes propriedades físicas, químicas, farmacológicas e antibacterianas (MARUGÁN, 2008).

Figura 7: Estrutura química das sulfonamidas em estudo



Em se tratando de propriedades físico-químicas segundo Hoff (2008), as sulfonamidas, como resultado das propriedades indutivas do grupamento SO₂, são compostos que exibem comportamento anfotérico, por possuírem grupamentos químicos com caráter ácido e básico, que permite que em determinadas faixas de pH estas moléculas se comportem como zwitteríons. Este comportamento tem influência na atividade antibacteriana das sulfas.

O uso de sulfonamidas na apicultura pode incorrer em resíduos no mel. A principal razão para a presença de resíduos acima do permitido pela legislação é o uso impróprio de medicamentos, com doses e período de tratamento acima do recomendado, não respeitando, portanto, o período de carência específico ao produto.

Segundo Sversson (apud ALABURDA, 2007) a maioria das sulfas apresenta meia-vida relativamente longa, ocasionando sérios problemas à saúde humana, entre os quais reações alérgicas ou tóxicas. Algumas sulfonamidas são potencialmente carcinogênicas e estima-se ainda que aproximadamente 5% dos pacientes humanos que são tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais (MONTANARO, 1998). Por sua vez, o amplo uso de medicamentos veterinários pode ser responsável pelo aparecimento de cepas de bactérias resistentes.

Sabendo que as sulfonamidas em proporções altas geram riscos aos consumidores de méis, é importante definir um limite no qual esse composto não seja prejudicial à saúde humana. O limite máximo de resíduo (LMR) de sulfonamidas no Brasil é estabelecido pelo Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em mel (PNCRC). Define-se como limite máximo de resíduos de sulfonamidas em mel $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (BRASIL, 2012).

2.7.2 Métodos de análises de sulfonamidas em mel

As abelhas são bioindicadoras de poluição ambiental (BALAYIANNIS & BALAYIANNIS, 2008), sabendo disso é importante verificar a condição de qualidade dos méis comercializados no mercado, pois, como alimento natural não é permitido que no mesmo tenha compostos tóxicos e se o tenham que sejam em quantidades inferiores ao estabelecidos pelas normas.

Em concordância com a informação, muitos trabalhos têm sido feitos para validar metodologias na qual seja possível avaliar a condição de qualidade dos méis tanto em nível de agrotóxicos como também de antibióticos provenientes de práticas de prevenção ou tratamento de doenças das abelhas. Esses trabalhos são importantes, visto que a análise de rotina da qualidade de alimentos tornou-se uma prática constante devido aos graves problemas de poluição.

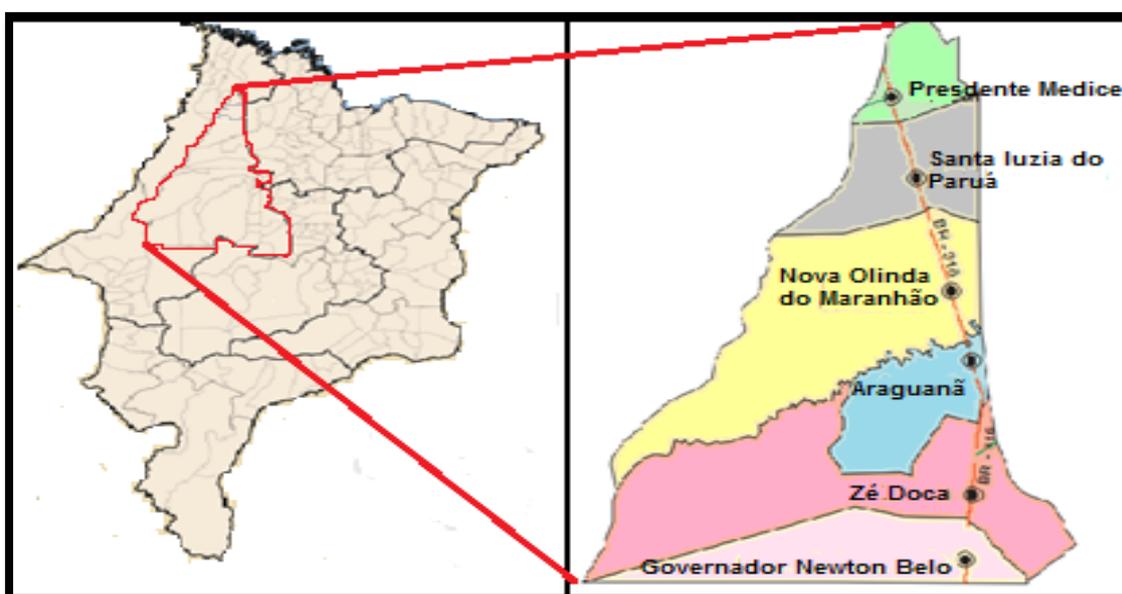
Levando em consideração o foco do estudo, no Quadro A, em Anexo, são apresentados algumas técnicas de validação de metodologias para determinação de sulfonamidas em matrizes de méis e no Quadro B (ANEXO) são mostradas metodologias aplicadas para determinação de sulfonamidas em outras matrizes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

As amostras de mel de abelhas africanizadas, da espécie *Apis Mellifera*, foram coletadas em apiários da Região do Alto Turi - MA, especificamente nas cidades de Nova Olinda do Maranhão e Santa Luzia do Paruá, a noroeste do estado do Maranhão, como observado na Figura 8.

Figura 8: Mapa do Maranhão com destaque da região do Alto Turi



Fonte: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Luzia_do_Paru%C3%A1>>

A amostragem foi feita em três anos consecutivos, no período de novembro/2010 a agosto/2012, como especificado no Quadro 1. A cada amostra foi atribuído um número sequencial de 1 a 18, conforme ordem de recebimento. As amostras 1 e 2 e 13 a 18 foram coletadas por apicultores da Turimel, já as amostras 3 a 12 foram extraídas por apicultores com acompanhamento dos pesquisadores da UFMA e ambas as coletas representam apiários diversos da cidade de Santa Luzia do Paruá e Nova Olinda do Maranhão.

Quadro 1: Coleta das amostras de méis – Mês/Ano e Local

Amostras	Período de coleta	Local
1	Novembro / 2010	Nova Olinda do Maranhão
2	Janeiro/2011	Nova Olinda do Maranhão
3, 4, 5, 6 e 7	Setembro/2011	Santa Luzia do Paruá
8, 9, 10, 11 e 12	Agosto/2012	Santa Luzia do Paruá
13, 14, 15, 16, 17 e 18	Agosto/2012	Nova Olinda do Maranhão

Para as amostras coletadas foram determinados os parâmetros físico-químicos e sendo as mesmas também utilizadas para estabelecimento de um método cromatográfico para detecção e quantificação de resíduos de sulfonamidas em mel.

A fim de evitar a alteração na condição de qualidade do méis e, conseqüentemente, dos resultados, as amostras foram mantidas em local seco e arrejado, em temperatura ambiente e armazenadas em fracos de vidro envoltos por papel alumínio.

3.2 Análise físico-química

Na análise de parâmetros físico-químicos foram utilizadas metodologias estabelecidas na Instrução Normativa nº 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2000), baseado em método preconizado pelo Codex Alimentarius (CAC) e pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC). As análises foram feitas em triplicata.

3.2.1 Instrumentação para análise de parâmetros físico-químicos

Para análise dos parâmetros físico-químicos foram utilizados um refratômetro Atago portátil modelo PAL-RI, um espectrofotômetro BioSpectro modelo SP 220 com faixa de 200 a 1.000 nm, uma mufla Linn Elektro Therm com controle de temperatura até 1.200 °C, uma estufa Fanem modelo Orion 515A com ajuste de temperatura até 300 °C e uma placa de aquecimento Quimis modelo Q313-F21 com regulagem de temperatura de 50 a 320 °C.

3.2.2 Reagentes, solventes e materiais para a análise físico-química

Os solventes e reagentes utilizados nas análises físico-químicas foram sulfato de cobre trihidratado, acetato de zinco, azul de metileno, sacarose, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, biftalato de potássio, fenolftaleína, ferricianeto de potássio, tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, amido, iodeto de potássio, iodo ressublimado, cloreto de sódio, ácido acético glacial e acetato de sódio, todos grau PA da marca Merck – Germany.

Também foram utilizados: pipetas, erlenmeyers, buretas, balões volumétricos, cadinhos de porcelana, cadinhos de vidro com fundo poroso, cubetas de quartzo, dessecador, bastões de vidro, béqueres, provetas e funil de vidro.

3.2.3 Cor

A determinação da cor dos méis foi feita através de leituras no espectrofotômetro em 560 nm, utilizando como branco glicerina pura (PA). Os resultados foram convertidos usando como referência a escala de Pfund para determinação da cor (Quadro C - ANEXO).

3.2.4 Umidade

A umidade foi determinada através do método refratométrico de Chataway. Para isso, mediu-se o índice de refração dos méis com um refratômetro e os resultados foram convertidos pela Tabela de Chataway (Quadro D - ANEXO) para índice de umidade. Considerando que a temperatura do mel não fosse 20 °C, como determinado pelo método, adicionou-se 0,00023 ao resultado do índice de refração a cada grau acima de 20 °C antes da conversão pela tabela de Chataway.

3.2.5 Sólidos insolúveis

Na determinação de sólidos insolúveis foram utilizados cadinhos de fundo poroso que foram aquecidos à 135 °C e deixados em repouso no dessecador até resfriamento, esse processo foi repetido até peso constante do cadinho. Em seguida, pesou-se 20 g de mel e adicionou-se água destilada a 80 °C, sendo essa solução filtrada no cadinho. Esses foram lavados com 1L de água destilada e levados à secagem na estufa a 135 °C por 1 h. Os cálculos usados na análise estão descritos na Equação 1:

$$\% \text{ sólidos insolúveis} = \frac{(m_{c1} - m_{c2})}{m} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Onde: m= massa do mel em g; m_{c1} = massa do cadinho após filtração da amostra de mel; m_{c2} = massa do cadinho antes da adição da amostra (com massa constante).

3.2.6 Minerais ou cinzas

Na determinação de minerais foram utilizados cadinhos de porcelana que foram pré – tratados através de aquecimento por 30 min à 600 °C, o processo foi repetido até peso constante do cadinho. Em seguida, 5 g de mel foram pesados nos cadinhos e levados a uma chapa de aquecimento até início da carbonização e daí transferidos a uma mufla por 5 h à 600 °C. Após conclusão desse procedimento, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. Os resultados das massas foram usados nos cálculos mostrados na Equação 2:

$$\% \text{ minerais e cinzas} = \frac{(m_{c1} - m_{c2})}{m} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Onde: m= massa do mel em g; m_{c1} = massa do cadinho após carbonização da amostra de mel; m_{c2} = massa do cadinho antes da adição da amostra (com massa constante).

3.2.7 Hidroximetilfurfural

Pesou-se 5 g da amostra, adicionou-se 25 mL de água e transferiu-se a mistura a um balão de 50 mL. Posteriormente, adicionou-se 0,5 mL da solução Carrez 1 (solução de ferricianeto de potássio) e 0,5 mL solução de Carrez 2 (solução de acetato de zinco) ao balão e completou-se com água destilada até aferir o mesmo. Filtrou-se com papel de filtro a amostra e descartou-se os primeiros 10 mL. Pipetou-se 5 mL do filtrado em dois tubos de ensaio. No primeiro adicionou-se 5 mL de água e no segundo 5 mL de NaHSO₃ como branco. Mediu-se a absorvância da amostra, nos comprimentos de onda de 284 nm e 336 nm. Os cálculos de HMF foram feitos segundo Equação 3:

$$\text{HMF} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 14,97 \times 5}{m} \quad (\text{Eq.3})$$

Onde: A_{284} = absorvância em 284 nm; A_{336} = absorvância em 336 nm; m = massa da amostra em g; 5 = massa teórica da amostra; 14,97 = fator.

3.2.8 Acidez livre

A acidez foi determinada pelo método baseado em volumetria de neutralização e o resultado dado em meq kg⁻¹. Pesou-se 10 g da amostra de mel e adicionou-se 75 mL de água descarbonatada e gotas de fenolftaleína. Titulou-se, sob agitação, com hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹ até pH 8,5 anotando o volume gasto. Em seguida, para obter-se a acidez lactônica, adicionou-se 10 mL de hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹ e titulou-se com ácido clorídrico 0,05 mol L⁻¹ até pH 8,89 e anotou-se o volume gasto.

Para o branco, adicionou-se 75 mL de água e titulou-se com hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹ até atingir pH 8,5. Nos cálculos de acidez livre, acidez lactônica e acidez total utilizou-se as Equações 4, 5 e 6:

$$\text{Acidez livre} = \frac{(V_{\text{NaOH}} - V_b) \times 50}{m} \quad (\text{Eq.4})$$

$$\text{Acidez lactônica} = \frac{(10 - V_{\text{HCl}}) \times 50}{\text{peso da amostra}} \quad (\text{Eq.5})$$

$$\text{Acidez total} = \text{Acidez Livre} + \text{Acidez Lactônica} \quad (\text{Eq.6})$$

Onde: V_{NaOH} = volume de NaOH gasto na titulação – fator de correção da solução de NaOH; m = massa da amostra em g; V_{HCl} = volume de HCl gasto na titulação – fator de correção da solução de HCl.

3.2.9 Atividade diastásica

Para verificação da atividade diastásica é necessária uma etapa prévia de padronização do amido, no qual solubilizou-se 5 mL da solução de amido em 10 mL de água destilada. Pipetou-se 1 mL dessa solução em 10 mL de solução de iodo $0,0007 \text{ eq L}^{-1}$, agitou-se. Diluiu-se essa solução com água até obter-se absorvância $0,76 \pm 0,02$ a 660 nm.

Na determinação da atividade diastásica, fez-se uma solução contendo 10 g de mel, 5 mL de uma solução de acetato de sódio e 20 mL de água destilada. Após diluição do mel transferiu-se a solução a um balão volumétrico de 50 mL contendo 3 mL de cloreto de sódio e aferiu-se com água destilada. Uma alíquota de 10 mL da solução foi colocada em um tubo de ensaio. Em outro tubo, colocou-se 5 mL de uma solução de amido. Ambos os tubos foram levados à banho-maria à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. As duas soluções foram misturadas e 1 mL dessa foi retirada a cada 5 min e adicionada ao volume de água determinada na padronização do amido. As absorvâncias foram medidas no espectrofotômetro. Curvas analíticas foram construídas relacionando-se absorvância versus tempo e através delas, encontrou-se as médias dos tempos em que a amostra alcançou a absorvância menor que 0,235. O cálculo de índice diástase é apresentado na Equação 7:

$$\text{Índice diástase} = \frac{300}{t} \quad (\text{Eq.7})$$

Onde: t = tempo em que a absorvância encontrada é $\leq 0,235$.

3.3 Análise cromatográfica

3.3.1 Instrumentação

Para desenvolvimento do método para determinação de resíduos de sulfonamidas foi utilizado um cromatógrafo a líquido Varian equipado com bomba de alta pressão binária (Varian Polaris ProStar 210/210), injetor manual com loop de 20 μ L, detector espectrofotométrico por arranjo de diodos DAD e software Galaxie para aquisição e processamento dos dados.

Também foram utilizados balança analítica (Bell Engineering – Italy), com faixa de 10 mg a 210 g, um medidor de pH modelo MPA-210/MPA 210P (TECNOPON- Brasil), banho ultrassom USC 1450 (Unique Thorton – Brasil) e banho ultrassom modelo Maxiclean com sistema de aquecimento (Unique Thorton – Brasil)

Também se utilizou centrífuga modelo 4K15 (Sigma Laboratory Centrifuges) na separação dos extratos e rotaevaporador, modelo 802 (Fisatom – Brasil), com controle de temperatura foi utilizado para a secagem do solvente de extração e a extração em fase sólida foi executada com o auxílio de um *manifold* (Varian – EUA) com capacidade para processamento de múltiplos cartuchos.

3.3.2 Reagentes, solventes e materiais para a análise cromatográfica

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram acetonitrila e metanol grau HPLC de pureza superior a 99,8% (Merck – Germany) e ácido acético glacial PA (Merck – Germany). A água deionizada foi obtida em um sistema de deionização Puritech Microprocessado 220, modelo Permutation.

Na preparação das amostras de mel foi utilizado ácido clorídrico e hidróxido de sódio PA (Merck – Germany).

Os cartuchos utilizados na extração em fase sólida foram do tipo ABS-ELUT Nexus (sorvente polimérico) 60 mg/3 mL adquiridos da Varian, e as membranas de acetato celulose e nylon utilizadas na filtração de solventes

(porosidade 0,45 μm e diâmetro 47 mm) foram fornecidas pela Merck – Germany.

Na secagem das amostras, utilizou-se gás nitrogênio (N_2) da White Martins – Brasil com grau de pureza 99,999%.

3.3.3 Padrões

As sulfonamidas selecionadas neste estudo fazem parte dos contaminantes que devem ser monitorados em mel de abelhas, conforme estabelece o Programa de Controle de Resíduos em Mel – PCRM/2000, regulamentado pela Instrução Normativa nº 42, de 20/12/1999. A referida instrução normativa inclui, além de outros antimicrobianos, sulfatiazol, sulfametazina (também conhecida como sulfadimidina) e sulfadimetoxina. Tais substâncias, antes com limites máximos permitidos de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tiveram, recentemente, novos limites de referência (soma igual a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Instrução Normativa nº 11, de 22/05/2012). Na Tabela 2 são mostrados os padrões empregados neste estudo.

Tabela 2: Padrões de sulfonamidas usadas no desenvolvimento do método

Padrão	Pureza (%)	Fabricante	Número do CAS
Sufatiazol	99,9	Sigma - Aldrich	72-14-0
Sulfadiazina	99,7	Sigma - Aldrich	68-35-9
Sulfametazina*	99,9	Sigma - Aldrich	57-68-1
Sulfaclopiradazina	99,0	Dr. Ehrenstorfer	80-32-0
Sulfadimetoxina	99,8	Sigma - Aldrich	122-11-2

*Novos limites de referências que precisam ser monitorados em mel de abelhas, conforme estabelece o Programa de Controle de Resíduos em Mel (BRASIL, 2012)

As soluções-estoque das sulfonamidas foram preparadas individualmente a partir dos padrões analíticos, sendo dissolvidas em metanol grau HPLC, em concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas em refrigerador a 4 °C. As soluções de trabalho, inicialmente, foram preparadas na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para se conhecer o tempo de retenção de cada uma das sulfonamidas. Foram preparadas soluções mistas das sulfonamidas em estudo, a partir das soluções-estoque das sulfas e diluídas em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L^{-1} , pH 4,5.

Seguindo recomendações de Silva (2008), as soluções estoque e de trabalho foram renovadas a cada 3 meses e 3 semanas, respectivamente.

3.3.4 Condições cromatográficas

Levando-se em consideração o desenvolvimento de um método capaz de detectar sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfatiazol e sulfacloropiridazina com sensibilidade, precisão e exatidão satisfatórias, foram feitos testes para seleção da coluna analítica, da fase móvel e do comprimento de onda, além da avaliação da conformidade do sistema após otimização das condições cromatográficas.

3.3.4.1 Seleção da coluna analítica

Colunas analíticas de C18 foram testadas para a detecção das sulfonamidas: Zorbax STABLEBOND SB (4,6 mm x 250 mm, 5 µm); Vertical VERTISEP GES (4,6 mm x 150 mm, 5 µm); e Phenomenex Synergi Fusion - RP (4,6 mm x 150 mm, 4 µm). A escolha da coluna foi feita através da avaliação das áreas para todas as sulfonamidas em estudo.

3.3.4.2 Seleção da fase móvel

Foram testadas várias condições cromatográficas para seleção da melhor fase móvel e das melhores proporções. Todos os testes foram feitos em modo gradiente e divididos em dois grupos de testes:

1. Proporções testadas usando como fase A (acetonitrila) e fase B (água);
2. Proporções testadas usando como fase A (acetonitrila) e fase B (tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5).

Em ambos os testes as fases móveis passaram por filtração em membrana acetato celulose (para água e tampão) ou membrana de nylon (para

acetonitrila) seguida de desgaseificação em banho ultrassom por 30 min para que as bolhas de ar não interferissem no resultado das análises.

3.3.4.3 Seleção do comprimento de onda

A seleção do comprimento de onda para detecção das sulfonamidas foram feitas através da injeção de amostras individuais de cada sulfa na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ no cromatógrafo. Os espectros de absorção foram obtidos no próprio detector do equipamento (HPLC-DAD). A varredura foi feita entre 190 e 400 nm e as máximas absorbâncias foram determinadas. Com base nos resultados obtidos, novas injeções foram feitas utilizando os três principais comprimentos de ondas em cada canal do cromatógrafo. As áreas obtidas em cada canal foram comparadas e usadas como determinante na escolha do melhor comprimento.

3.3.5 Extração de sulfonamidas em mel

As variáveis utilizadas no estabelecimento das condições de extração foram: massa do mel, volume de ácido clorídrico, agitação com (aproximadamente $40 \text{ }^\circ\text{C}$) e sem aquecimento em banho ultrassom.

As condições de extração foram baseadas em metodologia desenvolvida por Silva (2008) com algumas modificações. Cerca de $1,0 \pm 0,2 \text{ g}$ e $5 \pm 0,2 \text{ g}$ de amostra de mel foram pesados em erlenmeyers adicionando-se, respectivamente, 5 e 10 mL de ácido clorídrico 2 mol L^{-1} com objetivo de fazer a hidrólise ácida, quebrar a ligação entre as sulfonamidas e os açúcares contidos no mel para possível extração. Agitou-se até dissolução total do mel e colocou-se em banho ultrassom com e sem aquecimento por 45 min. Em seguida, o pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e tampão acetato de sódio (pH 4,5) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, sendo a solução resultante levada para um balão volumétrico de 100 mL. Na aferição do volume, foram testadas água e tampão mantendo o pH 4,5. A solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose e em seguida extraída em cartucho SPE ABS- ELUT, previamente condicionado com 2 x 5 mL de acetonitrila, água e

tampão acetato de sódio (pH 4,5) 0,05 mol L⁻¹. O cartucho foi seco durante 45 min sob vácuo e a eluição foi efetuada com 5 mL de acetonitrila. O eluato foi cuidadosamente evaporado até a secura com fluxo baixo de nitrogênio. O resíduo seco foi reconstituído em 1000 µL de tampão acetato de sódio (pH 4,5) 0,05 mol L⁻¹ sendo 1% deste valor metanol, em seguida homogeneizado em vórtex.

3.3.6 Validação do método

Para validação do método analítico foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, intervalos de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA (2003).

3.3.6.1 Conformidade do sistema

Para estabelecer a conformidade do sistema, os seguintes parâmetros foram avaliados: resolução (Rs), número de pratos (N) e fator de assimetria (As). Foram adotados os seguintes valores como critérios de aceitação: Rs>2,0 e N>2000 (SHABIR, 2003).

3.3.6.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se injeções das amostras de méis isentos de sulfonamidas (amostra branco) com amostras de méis fortificados com padrões das sulfas. Mediante comparação é observado se há presença de picos interferentes na região do tempo de retenção do analito de interesse (LANÇAS, 2004).

3.3.6.3 Intervalo de trabalho

Intervalo de trabalho corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão (BRITO et al., 2003).

Geralmente, a faixa é determinada de acordo com o uso pretendido e deriva de estudo da linearidade do método. No caso do método para detecção de sulfonamidas a análise do intervalo de trabalho foi determinado a partir de injeções que variaram de $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. As injeções foram feitas em triplicata.

3.3.6.4 Linearidade e sensibilidade

A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de correlação da curva analítica. Estas foram feitas utilizando-se soluções padrões e também amostras de méis fortificados com solução-padrão. Nas curvas, relacionou-se as razões da área do pico do analito com as concentrações das sulfonamidas estudadas.

As curvas foram feitas dentro do intervalo de trabalho que variou de $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram considerados satisfatórios quando estes foram proporcionais às concentrações dentro do intervalo de trabalho estudado e o coeficiente de correlação entre $0,91 < r < 0,99$.

A sensibilidade foi avaliada pelo coeficiente angular obtido nas curvas analíticas das sulfonamidas.

3.3.6.5 Teste de Huber

Os resultados das áreas obtidas no intervalo trabalho estudado passaram pelo tratamento estatístico do Teste de Huber. O teste de Huber é um método baseado no gráfico de linearidade no qual é possível identificar e rejeitar dados anômalos. Esse teste parte do princípio que o quociente entre as áreas medidas e as correspondentes concentrações (A/C) são constantes. Sabendo disso, é necessário estabelecer um intervalo de confiança que define quais dados são aceitáveis, ou seja, que estão dentro do intervalo de confiança. Portanto um valor central é estabelecido de forma que ele não dependa dos dados anômalos. Isso é feito pelo cálculo da mediana (md) dos valores obtidos pelo quociente A/C . A mediana é então usada para calcular as diferenças absolutas entre cada valor de A/C e md a partir dessa diferença é

calculado o desvio absoluto da mediana (mad) dos valores $|A/C - md|$. Com esses valores é possível calcular o intervalo de confiança (IC) (VALENTE et al., 2003), como mostrado na Equação 8:

$$IC = md \pm k \cdot mad \quad (\text{Eq.8})$$

Onde k é um valor que varia entre 2 e 8 e é definido pelo analista. Na prática, quanto maior for o valor de k mais permissivo é o critério de linearidade adotado, uma vez que amplia o intervalo de confiança (FUJITA, 2009).

3.3.6.6 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumental para cada uma das sulfonamidas foram determinadas usando o método baseado em parâmetros da curva analítica. Nas equações 9 e 10 são mostrados os cálculos de LD e LQ:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq.9})$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq.10})$$

Onde: s é estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta e S é a inclinação da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

3.3.6.7 Precisão

A avaliação da precisão do método foi feita utilizando-se ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária.

Nos ensaios de repetibilidade, verificou-se a concordância dos dados frente à análise de amostras submetidas às mesmas condições de análise: analista, equipamento, mesmo laboratório e num espaço de tempo curto. Fortificações de mel nas concentrações 100, 500 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram extraídas e injetadas. Em cada nível de fortificação foram feitas 5 soluções e cada uma injetada três vezes.

Os ensaios de precisão intermediária, também, foram feitos em quintuplicata nas concentrações, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo as injeções das amostras fortificadas feitas em dias diferentes e os resultados avaliados pelos cálculos do coeficiente de variação.

Como critério de aceitação foi adotado um CV máximo de 15%, conforme preconizado pela ANVISA (2003).

3.3.6.8 Exatidão

Para avaliar a exatidão, utilizou-se ensaios de fortificação e os resultados foram analisados pelos dados de recuperação das substâncias em estudo. Os ensaios de fortificações foram realizados a partir de uma solução de trabalho na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contendo as cinco sulfonamidas, em diferentes níveis de concentração, obtendo-se as seguintes concentrações nas amostras de méis: 100, 500 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os volumes da solução analítica correspondentes para cada nível de fortificação foram adicionados aos méis logo após pesagem.

3.3.7 Aplicação do método

O método validado foi aplicado em amostras de méis da região do Alto Turi – MA e os resultados analisados foram apresentados à comunidade como informações para que se pudesse através dessa, melhorar as condições de produção do mel e assim aumentar a lucratividade.

4 RESULTADOS

4.1 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas para amostra de méis de abelhas africanizadas da Região do Alto Turi – MA são mostradas nas Tabelas 3 e 4. Todos os parâmetros foram avaliados segundo Instrução Normativa n° 11 do MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000).

Tabela 3: Caracterização físico-química para méis da região do Alto Turi – MA

Amostra	Umidade	SI**	MC***	Cor
	(%) ± RSD* (%)	(%) ± RSD* (%)	(%) ± RSD*(%)	
1	18,4 ± 0,1	0,004 ± 2,5	0,18 ± 5,5	Extra âmbar claro
2	19,4 ± 0,2	0,110 ± 9,0	0,09 ± 4,4	Âmbar claro
3	18,0 ± 0,1	0,046 ± 6,5	0,07 ± 10,0	Âmbar claro
4	21,0 ± 0,5	0,060 ± 4,6	0,09 ± 9,0	Âmbar claro
5	16,6 ± 0,1	0,026 ± 7,7	0,08 ± 12,0	Âmbar claro
6	17,6 ± 0,2	0,004 ± 4,0	0,10 ± 8,0	Extra âmbar claro
7	18,0 ± 0,1	0,006 ± 5,0	0,006 ± 3,0	Extra âmbar claro

*RSD = Desvio padrão relativo, n=3; **SI= Sólidos insolúveis; ***MC = minerais ou cinzas

As amostras analisadas apresentaram predominância da cor âmbar claro com representativo de 57% das amostras, seguida da cor extra âmbar claro com 43%. Para o parâmetro cor todas as amostras de méis estão em conformidade com a norma vigente (BRASIL, 2000) que estabelece que a cor do mel, varia de branco d'água a âmbar escuro.

As porcentagens de umidade variaram de 16 a 21%. Apenas a amostra 4 apresentou valor superior ao permitido pela legislação brasileira que é 20% (BRASIL, 2000). No entanto, não se trata de valor alarmante visto que umidades superiores já foram encontradas em méis de outras regiões, por exemplo, Mato Grosso do Sul, onde foram encontrados valores de 15 a 26,0% (VIEIRA, 2005).

RESULTADOS

O valor da umidade na amostra 4 pode ter sido aumentada, por falhas no processo de extração do mel como colheita antes da completa desidratação ou umidade relativa do ar durante a extração estar acima de 65%, resultando na absorção de água pelo mel (NUNES, 2005). É importante que durante a extração do mel todos os cuidados sejam tomados, pois processos fermentativos podem ser favorecidos, resultando em perda de lucro e dos produtos no processo.

Na análise de sólidos insolúveis, verificou-se que apenas a amostra 2 apresentou valor acima do recomendado pela legislação (máximo 0,1%). No entanto, através da aplicação do teste t verifica-se que a diferença entre o valor conhecido (0,1%) e o valor obtido (0,11%) é aceitável, visto que $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ($1,75 < 4,30$), com um nível de 95% de confiança. Portanto, como não há diferença significativa pode-se considerar a amostra 2 dentro dos padrões.

Os resultados obtidos na análise de minerais variaram de 0,0059 a 0,18%. A norma vigente estabelece como máximo 0,6%, estando, portanto todas as amostras abaixo do máximo estabelecido pela norma.

No referente ao parâmetro acidez, valores acima do máximo permitido foram encontrados, como mostrado na Tabela 4. De acordo com Horn e colaboradores (1996), a acidez do mel tem sua origem na variação dos ácidos orgânicos de diferentes fontes de néctares, pela ação da enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico, pela ação das bactérias durante a maturação do mel e pelas quantidades de minerais presentes no mel.

Tabela 4: Avaliação de parâmetros físico-químicos em méis da região do Alto Turi- MA

Amostra	Acidez	HMF**	Diastase \pm RSD* (%)
	meq kg ⁻¹ \pm RSD* (%)	mg kg ⁻¹ \pm RSD* (%)	
1	72,0 \pm 4,9	5,03 \pm 1,0	16,04 \pm 6,2
2	66,8 \pm 4,0	4,26 \pm 0,5	15,92 \pm 7,5
3	51,8 \pm 2,9	4,26 \pm 1,2	22,18 \pm 14,0
4	64,5 \pm 3,7	2,46 \pm 0,8	23,14 \pm 10,5
5	46,1 \pm 4,3	1,97 \pm 0,5	16,07 \pm 12,2
6	52,4 \pm 6,1	1,97 \pm 0,9	22,45 \pm 5,6
7	44,9 \pm 2,2	1,39 \pm 0,2	11,35 \pm 7,1

*RSD = Desvio padrão relativo, n=3; **HMF = Hidroximetilfurfural

Apesar de a legislação vigente aceitar como máximo 50 meq kg^{-1} , Bogdanov e colaboradores (1997) relatam que em regiões tropicais os méis apresentam um teor de acidez naturalmente mais elevado, podendo, assim, explicar os valores elevados de acidez em 71% das amostras de méis da região do Alto Turi.

Considerando que a acidez possa estar relacionada com as características próprias do mel da região do Alto Turi – MA, pode-se atrelar, além do fator clima, a flora da região, pois o néctar das flores coletado pelas abelhas africanizadas pode acrescentar à composição do mel uma concentração maior de ácidos orgânicos (BERTOLDI et al., 2007) fazendo com que valores altos de acidez sejam obtidos. Além disso, pode-se relacionar a quantidade de minerais presentes no mel com a acidez obtida: altas percentagens de minerais como, por exemplo, na amostra 1, geram altos valores de acidez.

No entanto, devido às análises não serem efetuadas em todos os períodos de coleta de mel, não pode-se afirmar que os valores altos de acidez são ocasionados pelas condições edafoclimáticas da região do Alto Turi - MA. Sendo assim, segundo o MAPA, este mel não é recomendado para venda e consumo.

A Legislação Brasileira tolera como máximo de hidroximetilfurfural (HMF) no mel 60 mg kg^{-1} e como apresentado na Tabela 4 todas as amostras analisadas estão em conformidade como o estabelecido pela legislação estando abaixo do máximo permitido. Este dado é um indicativo de que o mel coletado apresenta adequada condição de qualidade, pois valores aumentados de HMF significam, segundo Veríssimo (1988), queda no valor nutritivo do mel pela destruição, por meio de aquecimento, de algumas vitaminas e enzimas que são termolábeis, além de indicar, segundo Evangelista-Rodrigues e colaboradores (2005), adulteração do produto com açúcar comercial.

Em relação aos valores de diástases obtidos, nota-se que todas as amostras analisadas estão em conformidade com a legislação que aponta como aceitáveis valores ≥ 8 . O índice de diástase é um parâmetro importante, pois com ele é possível verificar o estado de conservação do mel, etapas de aquecimentos (SOLOVEVE, 1971) ou até mesmo fraudes, com adição de

xaropes. A observação dos resultados mostra que o mel da região do Alto Turi não foi adulterado e nem aquecido, apresentando, portanto, adequada condição de qualidade.

4.2 Estabelecimento das condições cromatográficas

No estabelecimento das melhores condições de análise foram testadas diferentes colunas analíticas, sendo também determinado o comprimento de onda de melhor sensibilidade de sinal.

4.2.1 Escolha da coluna

Na Tabela 5, é mostrada a média dos resultados das áreas das sulfonamidas para comparação entre as colunas C18 de marcas diferentes: Zorbax, Vertical e Phenomenex. Segundo Malintan & Mohd (2006), devido à natureza anfotérica das sulfonamidas a separação em coluna cromatográfica mais polar, como C8, é dificultada, sendo observadas separações bastante satisfatórias em colunas do tipo C18, avaliando-se neste trabalho a eficiência de distintas colunas de C-18.

Tabela 5: Comparação entre as colunas Zorbax, Vertical e Phenomenex para estabelecimento das condições cromatográficas

Analitos	Zorbax		Vertical		Phenomenex	
	Área (mAU.sec)	Altura (mAU)	Área (mAU.sec)	Altura (mAU)	Área (mAU.sec)	Altura (mAU)
Sulfadiazina	106,1	5,2	74,0	5,0	186,6	29,2
Sulfatiazol	150,6	8,8	126,2	6,6	224,1	35,1
Sulfametazina	63,6	3,9	40,5	2,0	188,8	19,1
Sulfaclopiradazina	80,7	4,9	51,2	2,4	175,4	11,1
Sulfadimetoxina	76,9	3,7	35,4	5,2	228,1	27,5

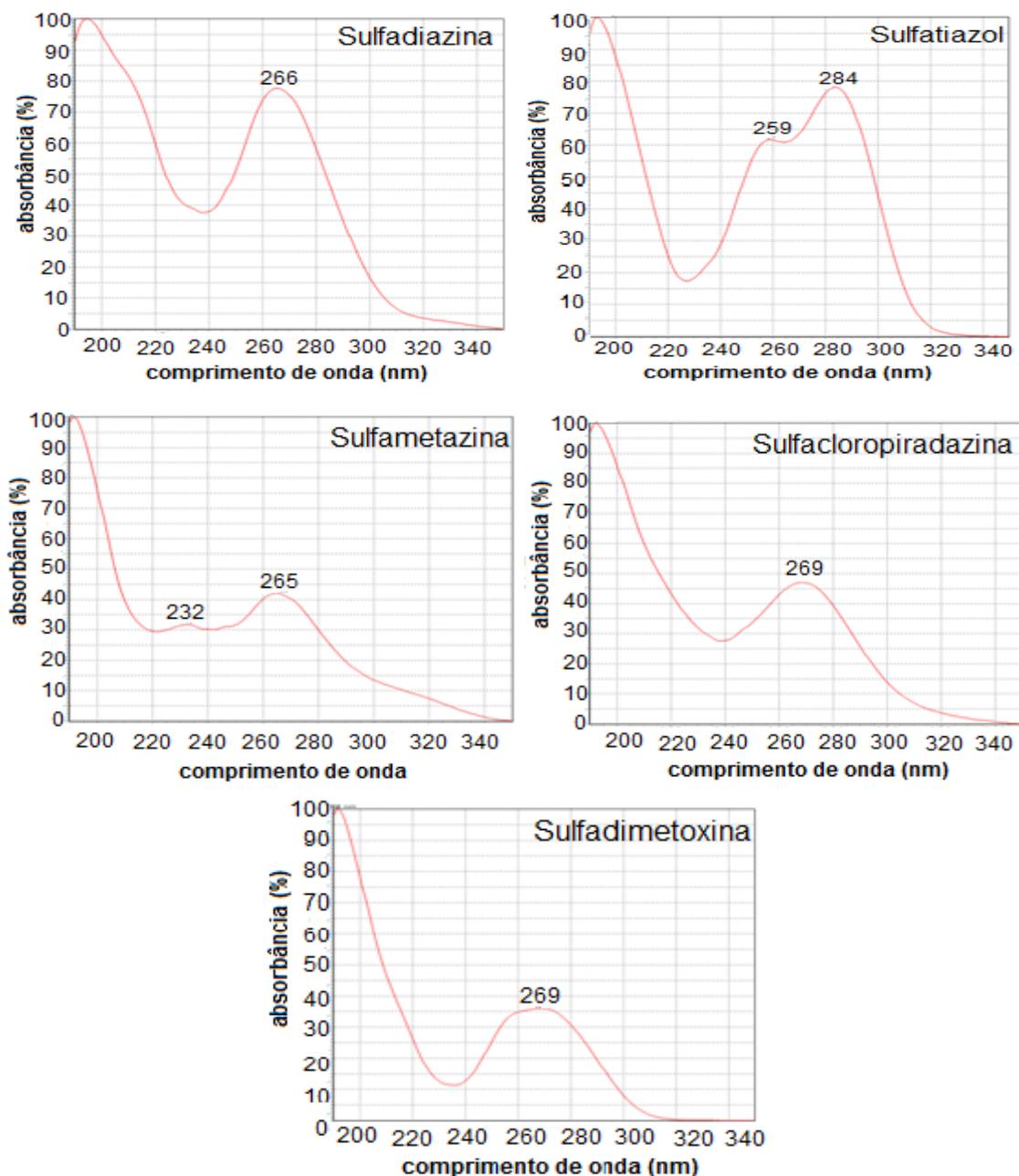
Verificou-se que as áreas dos picos variaram consideravelmente. As maiores áreas foram obtidas com colunas Zorbax e Phenomenex, esta última apresentando maiores áreas e sinal de resposta (altura do pico), justificando a escolha desta para análises posteriores.

RESULTADOS

4.2.2 Escolha do comprimento de onda

Na Figura 9 são apresentados os espectros de absorção na região do UV e os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 190 a 400 nm para as sulfonamidas estudadas.

Figura 9: Espectros UV, obtidos no sistema HPLC/DAD Varian ProStar



As absorções máximas foram observadas entre 265 e 284 nm, que é justificado devido à presença de cromóforos aromáticos que possuem absorção

RESULTADOS

máxima acima de 200 nm. A variação nos comprimentos de onda são relativos aos “incrementos” da estrutura molecular representado pelo radical. Selecionou-se os comprimentos de onda de 260, 270 e 278 nm para avaliação das maiores áreas, mostradas na Tabela 6. Os melhores resultados de áreas foram apresentados por 260 e 270 nm, selecionando-se 270 nm por ser mais próximo da absorção máxima para quatro sulfonamidas, exceção apenas o sulfatiazol. Apesar de não ser o melhor comprimento para sulfatiazol, resultados satisfatórios foram encontrados.

Tabela 6: Avaliação dos comprimentos de onda através análise das áreas das sulfas

Analito	278 nm	270 nm	260 nm
Sulfadiazina	159,03	187,30	175,37
Sulfatiazol	196,90	169,13	167,50
Sulfametazina	178,60	206,00	203,50
Sulfaclopiradazina	163,30	176,80	155,20
Sulfadimetoxina	211,10	227,10	212,10

4.2.3 Estudo da fase móvel

Como especificado no Quadro A (ANEXO), a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura trabalham com fase móvel acetonitrila e tampão, tanto de ácido acético como de ácido fórmico. Alguns testes foram feitos dando-se prioridade a testes com a fase móvel citada anteriormente. Testes com acetonitrila e água também foram feitos, visto que o uso de tampões diminui o tempo de vida útil das colunas analíticas (MALDANER, 2010; MALITAN & MOHD, 2006). Nas Tabelas 7 e 8, são mostradas as principais proporções e fases móveis testadas.

RESULTADOS

Tabela 7: Estudo das proporções e da fase móvel para detecção das sulfonamidas, com fluxo constante de 1 mL min⁻¹

Teste	Tempo (min)	Fase móvel (proporções %)	
		ACN*	TA**
1	0	10	90
	10	15	85
	15	30	70
	20	40	60
	25	15	85
	30	10	90
2	0	10	90
	3	14	86
	10	14	86
	15	30	70
	20	40	60
	25	14	86
3	0	10	90
	3	20	80
	10	20	80
	15	30	70
	20	40	60
	25	20	80
4	0	20	80
	30	20	80
5	0	10	90
	3	20	80
	12	20	80
	15	30	70
	20	40	60
	23	20	80
	25	10	90

*ACN = acetonitrila; **TA = tampão acetato de sódio

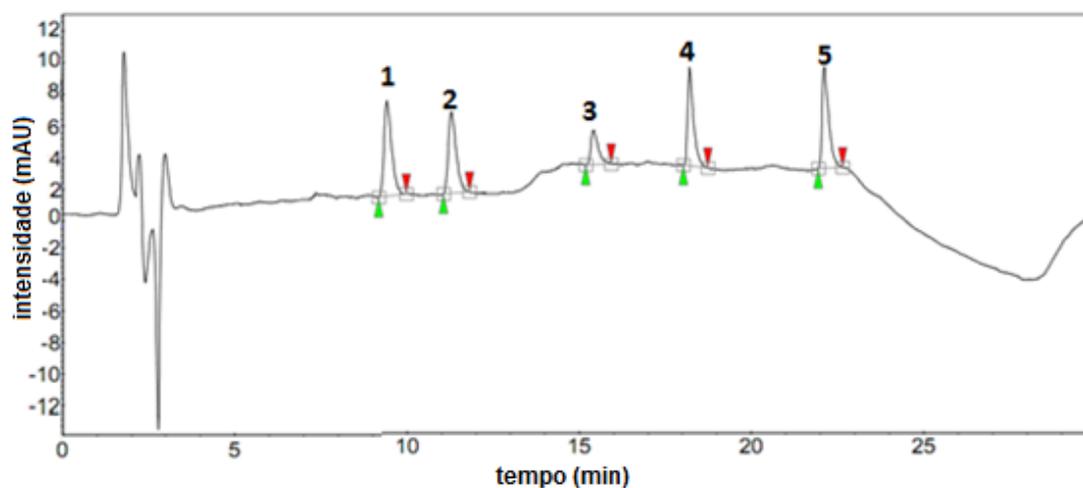
RESULTADOS

Tabela 8: Estudo das proporções e da fase móvel (ACN/H₂O) para detecção das sulfonamidas, com fluxo constante de 1 mL min⁻¹

Teste	Tempo (min)	Fase móvel (proporções %)	
		ACN*	H ₂ O
6	0	10	90
	10	15	85
	15	30	70
	20	40	60
	25	15	85
	30	10	90

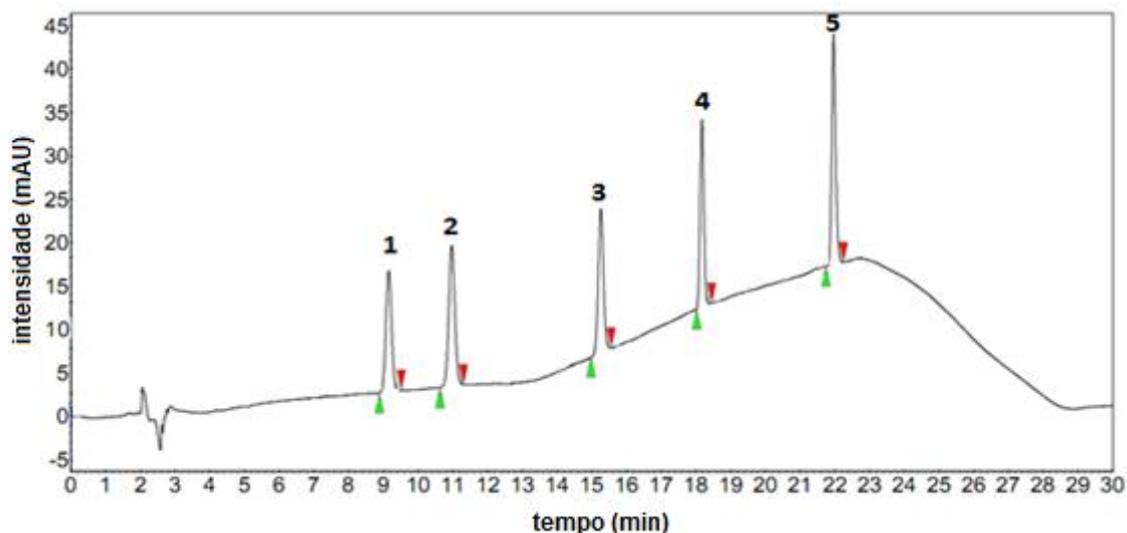
*ACN = acetonitrila

Nas Figuras 10 e 11, são mostrados alguns cromatogramas obtidos com testes com as variações das proporções testadas. Nestes, percebe-se que tanto os testes utilizando água como tampão acetato de sódio apresentaram boa separação analítica dos compostos em estudo. No entanto, maiores áreas foram obtidas para as sulfonamidas separadas em fase móvel acetonitrila e tampão. Levando em conta a necessidade de obter maiores sensibilidades, optou-se pelo uso do tampão, a despeito dos maiores cuidados exigidos para a coluna analítica.

Figura 10: Cromatograma das sulfonamidas 1 µg mL⁻¹ – fase móvel ACN/H₂O teste 6 (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)

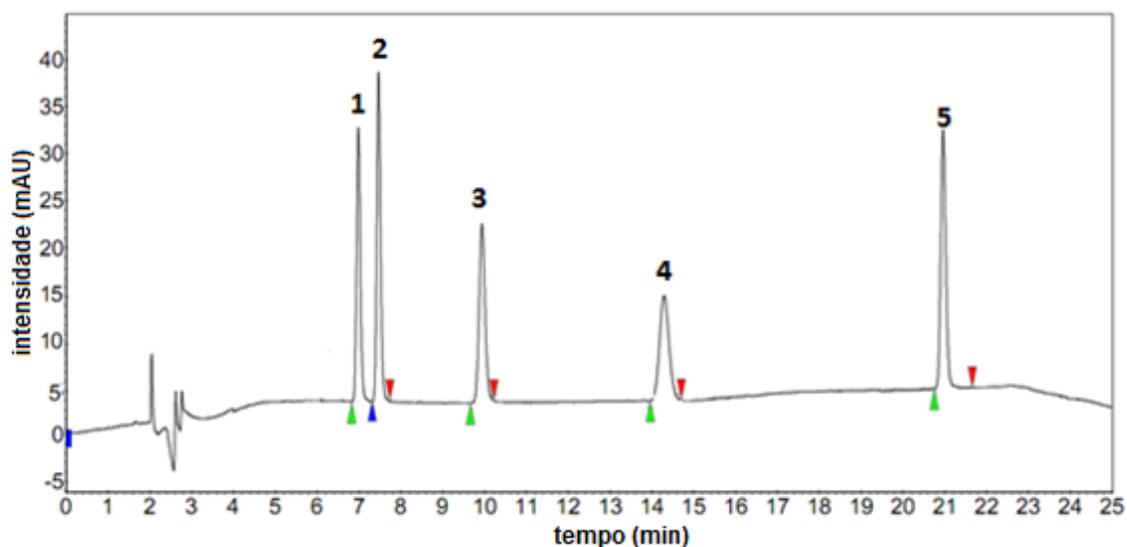
RESULTADOS

Figura 11: Cromatograma das sulfonamidas $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ – fase móvel ACN/tampão teste 1 (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)



O teste 5 também apresentou bons resultados, como mostrado na Figura 12. Uma vantagem desse teste em relação aos testes 1 e 6 mostrados nas figuras anteriores é que, além de uma boa separação analítica, as áreas dos picos são maiores, sendo possível obter menor tempo de análise cromatográfica (25 min).

Figura 12: Cromatograma das sulfonamidas em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ – fase móvel ACN/tampão teste 5 (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)



As Figuras 10, 11 e 12 mostraram que as fases e as proporções utilizadas nos testes 1, 5 e 6 foram satisfatórias. Todos esses testes foram usados na verificação de melhores resultados frente à matriz, que sendo complexa apresenta alta quantidade de interferentes e conseqüentemente sobreposição dos picos das sulfonamidas com substâncias provenientes da matriz, dificultando a quantificação dos picos. Por isso a necessidade de análises com diferentes proporções da fase móvel na otimização das condições cromatográficas.

4.3 Estabelecimento das condições de extração das sulfonamidas

A preparação da amostra de mel é uma etapa importante, visto que o esta é uma matriz complexa e que, conforme estabelecido no Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB) apresenta baixos níveis de concentração em que as sulfonamidas são permitidas (LMR – 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (BRASIL, 2012). Sendo assim, resultados confiáveis derivam de uma preparação adequada das amostras de méis.

A preparação das amostras demanda técnicas de extração e concentração dos analitos para se atingir os limites de sensibilidade dos equipamentos e/ou a eliminação dos possíveis interferentes (PITTELLA, 2009). Quatro procedimentos de extração foram testados, tendo como variáveis a massa da amostra e o solvente utilizado no preparo das soluções de mel.

Em todos os procedimentos foram efetuadas hidrólise ácida do mel, por se tratar de uma etapa imprescindível para correta quantificação das sulfas, sem a qual, a determinação de sulfonamidas em mel ficaria subestimada (PERES, 2009).

As análises foram efetuadas usando amostras testemunhas (amostra branco) e amostras fortificadas de sulfonamidas na verificação de possíveis interferentes e subsequente estudo de recuperações de resíduos de sulfonamidas em mel.

Nas análises de amostras de méis, foi necessário que a solução *mix* do padrão das sulfonamidas ficasse em contato direto com o mel por, no mínimo, 30 min permitindo, assim, que houvesse a ligação entre sulfonamidas e

açúcares. O tempo de interação das sulfonamidas com o mel é necessária para obtenção de resultados mais próximos à situação real de contaminação do mel.

4.3.1 Etapas de extração com condições cromatográficas do teste 6

4.3.1.1 Procedimento 1

Procedimentos de extração em fase sólida são dificultados quando trabalha-se com matriz complexa, como mel. Pode-se citar dois empecilhos: o efeito matriz e a viscosidade do mel. De acordo com Hajšlova e colaboradores (1998), a intensidade do efeito de matriz é influenciada pela natureza da amostra e pelo tipo de coextrativos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.). Coextrativos como carboidratos e alguns pigmentos podem permanecer solubilizados nos extratos (FERNANDEZ, 2001), mesmo após a purificação da amostra, gerando o efeito de matriz nas análises cromatográficas (HAJŠLOVA et al., 2003). No caso do mel, a alta quantidade de açúcares da matriz interfere significativamente na quantificação dos analitos.

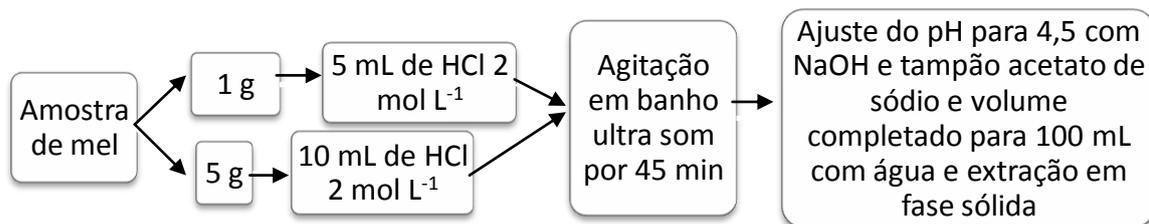
Além disso, o mel é um líquido muito viscoso, dificultando assim a extração em fase sólida devido à saturação e obstrução do cartucho SPE. Para facilitar a passagem da amostra pela fase estacionária do cartucho é necessário fazer diluição desse líquido viscoso em água ou numa mistura de água e solventes orgânicos (PITTELLA, 2009). Por isso, o primeiro teste de preparação das amostras de méis foi feito com a diluição do mel em água, após hidrólise ácida, completando um volume de 100 mL, de forma que no final esse volume estivesse com pH ajustado para 4,5.

As análises descritas a seguir foram baseadas em metodologia desenvolvida por Silva (2008) com algumas variáveis, sendo acetonitrila/água utilizada como fase móvel na análise cromatográfica, com proporções especificadas no teste 6 descrito na Tabela 8 (item 4.2.3 - estudo da fase móvel).

Na Figura 13, são apresentados os procedimentos utilizados nessa etapa do trabalho:

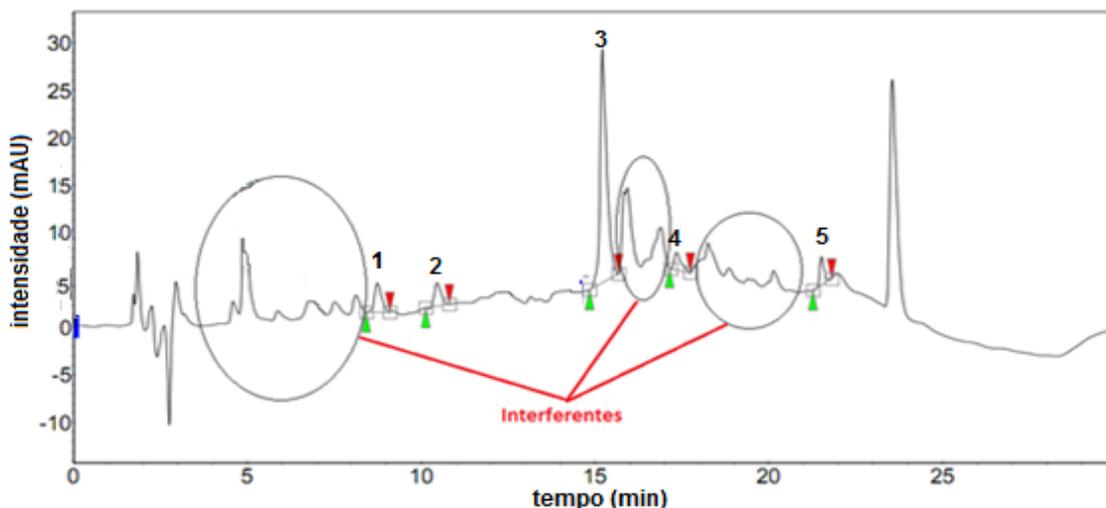
RESULTADOS

Figura 13: Fluxograma do procedimento experimental 1 para otimização da extração em fase sólida



As extrações feitas com 1 g de mel, fortificado com 100 μL e 1.000 μL de solução 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada sulfonamida (concentrações finais de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), várias interferências foram observadas dificultando, assim, a detecção de algumas sulfonamidas (por exemplo, sulfametazina). A Figura 14 apresenta o cromatograma do extrato do mel fortificado com 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, percebendo-se, mesmo nesta concentração, a influência da matriz através de coeluentes como, por exemplo, no tempo de retenção da sulfametazina (15,23 min), onde houve sobreposição deste analito com um pico interferente.

Figura 14: Cromatograma do extrato das sulfonamidas fortificado com 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e análise cromatográfica com fase móvel ACN/ H_2O (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfaclopiradazina e 5- sulfadimetoxina)

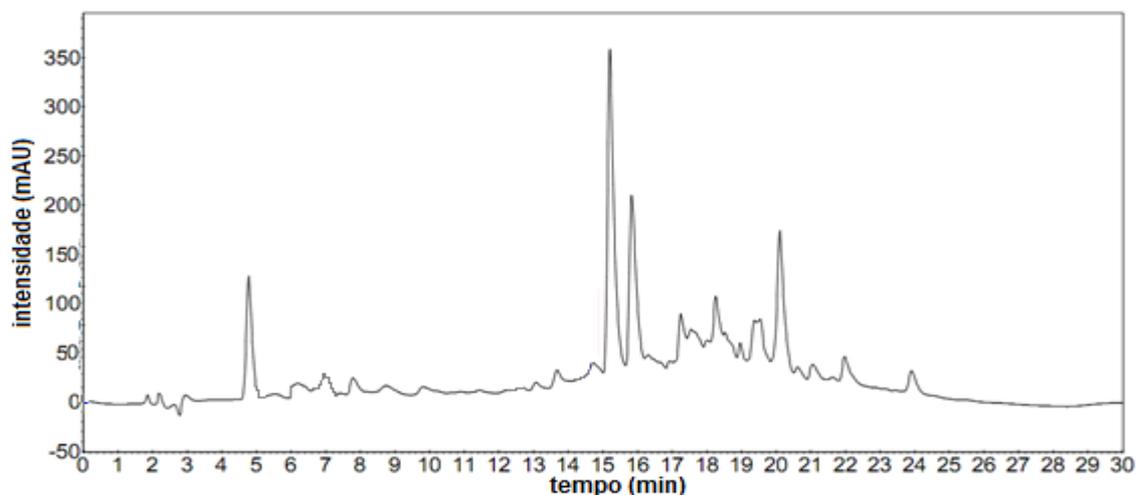


A Figura 15 apresenta extrações feitas com 5 g de mel, sendo observado efeito matriz mais pronunciado, devido à forte interação das sulfonamidas com os açúcares do mel, de difícil quebra mesmo com maiores quantidades de ácido clorídrico. Para a maioria das sulfonamidas, embora

RESULTADOS

fossem identificados os picos, não foi possível a quantificação. Em razão disso, foi fixada a massa de 1 g para novas análises de extração devido a menor intensidade dos interferentes e linha de base mais limpa do que com 5 g de mel.

Figura 15: Cromatograma do extrato do branco do mel com massa de 5 g diluído em solução de água com pH 4,5 e análise cromatográfica com fase móvel ACN/H₂O



Foi observado que o uso de água na preparação das amostras de méis não foi eficiente em termos de recuperações de sulfonamidas devido à instabilidade das mesmas em água. Segundo Santos (2009), as sulfonamidas apresentam melhor solubilização e estabilidade em soluções de sais de sódio, sendo confirmado em ensaios de recuperações em que é usado solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 4,5) no preparo da solução de mel, conforme mostrado na Tabela 9.

Tabela 9: Comparação das recuperações com e sem aquecimento preparados com tampão e de extratos preparados com água na concentração 1.000 µg kg⁻¹, com proporções conforme teste 6

Analitos	Rec. (%)	Rec. com tampão (%)	
	água	Sem aquecimento	Com aquecimento
Sulfadiazina	47,80	38,72	39,05
Sulfatiazol	52,80	70,45	59,78
Sulfametazina	21,30	21,42	112,52
Sulfaclopiradazina	29,15	33,09	29,40
Sulfadimetoxina	62,34	64,60	57,13

A comparação entre as taxas de recuperações obtidas com soluções de méis preparadas com tampão e com água são mostradas na Tabela 9. Considerando-se que, na determinação em nível de traços e em matrizes complexas, recuperações na faixa de 50 - 120%, com precisão de $\pm 15\%$ são aceitáveis (RIBANI et al., 2004), melhores resultados puderam ser obtidos nos extratos preparados em tampão, sem etapa de aquecimento, sendo este o procedimento escolhido para etapas posteriores de ensaios de recuperação.

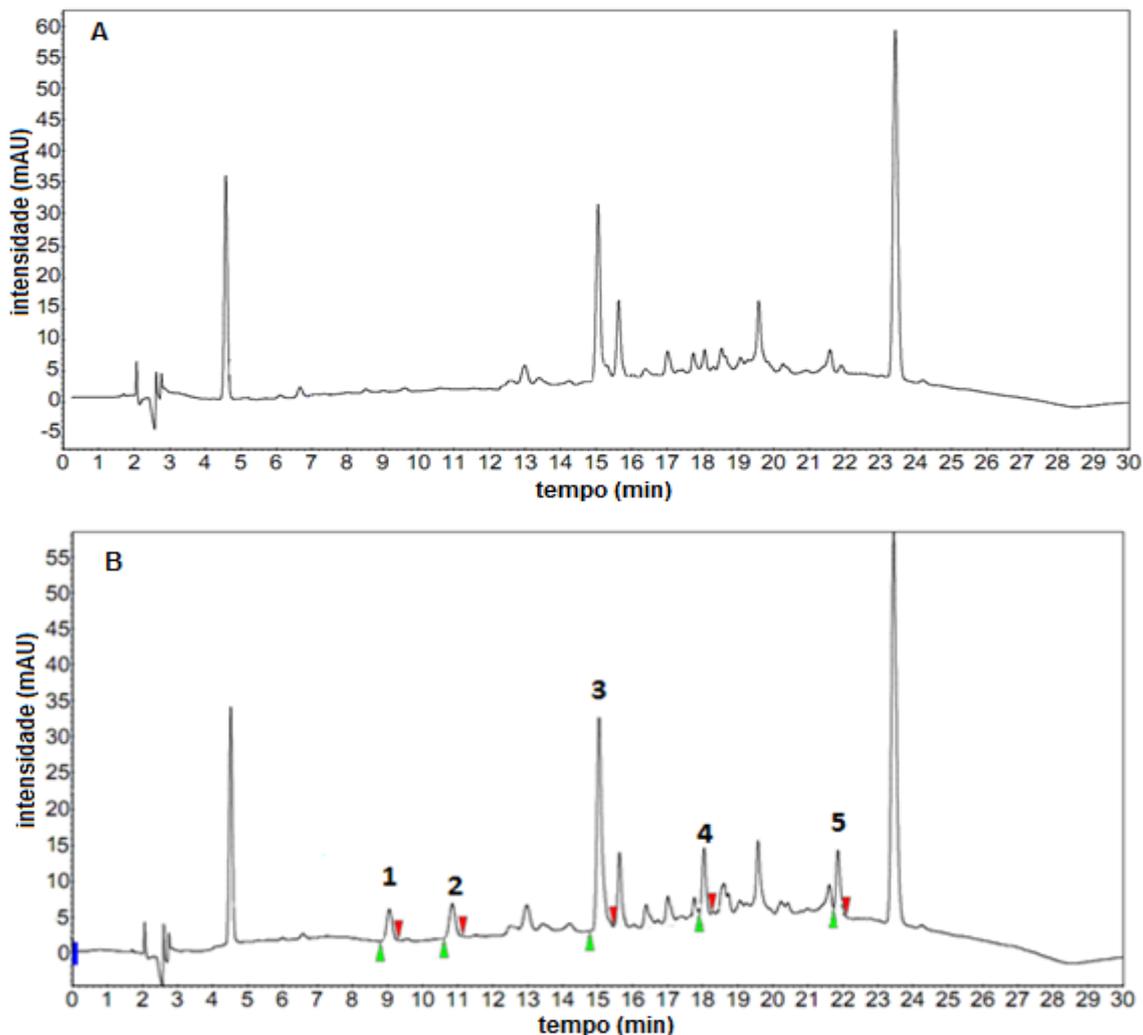
Objetivando diminuir o efeito matriz, uma etapa de aquecimento no banho ultrassom foi avaliada. A temperatura máxima adotada foi 40 °C, pois acima desta, picos interferentes seriam gerados como, por exemplo, o hidroximetilfurfural que é dos componentes que indicam adulterações ou acondicionamento inadequado dos méis em função do aquecimento. Embora a etapa de aquecimento tenha diminuído significativamente a intensidade dos interferentes presentes no extrato do mel, as recuperações obtidas não foram melhores que as recuperações obtidas sem aquecimento e preparadas com tampão, como mostrado na Tabela 9. A degradação das sulfonamidas em razão do aquecimento pode ter sido a causa da diminuição das recuperações.

A metodologia baseada em Silva (2008) não foi eficiente em termos de recuperações e apresentou sensibilidade inadequada, conseguindo-se quantificar na amostra de mel concentrações de sulfonamidas a partir de 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, estando esse valor acima do limite máximo de resíduos de sulfonamidas que é 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, além de ter efeito matriz pronunciado.

Com intuito de quantificar sulfonamidas em concentrações menores que 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, utilizou-se acetonitrila/tampão acetato de sódio na fase móvel, cuja sensibilidade é maior que a fase móvel acetonitrina/água na análise cromatográfica, conforme apresentado no item 4.2.3. Para tanto foram utilizadas as proporções descritas no teste 1 (item 4.2.3, Tabela 7) e o preparo da solução de mel, após hidrólise ácida, foi feita com tampão e sem aquecimento para conseguinte extração em fase sólida. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 16.

RESULTADOS

Figura 16: Cromatograma do branco (A) e da amostra fortificada (B) com $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)



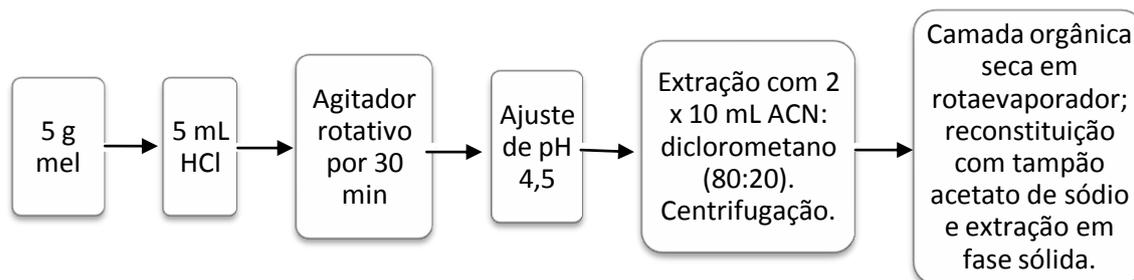
Apesar da obtenção de sinal analítico melhor, o método em análise não apresenta seletividade, pois, como matriz complexa, o mel não apresenta um extrato totalmente limpo apesar de todas as etapas de tratamento e limpeza da amostra. Dois interferentes especificamente aparecem nas mesmas zonas de eluição das sulfonamidas, nos tempos de 15 e 18 min aproximadamente, fazendo com que a análise das substâncias em estudo possam ser inequívocas, interferindo assim na determinação das sulfas na amostra. Segundo Lanças (2004), a pureza de um pico pode ser interferida pela co-eluição de estruturas químicas similares, e podem atuar aumentando ou reduzindo o sinal analítico, neste caso, os interferentes atuam aumentando o sinal dos picos.

Sabendo disso, é necessária a análise com outros métodos de extração para redução dos interferentes da amostra e obtenção de extrato com maior percentagem de recuperação das sulfonamidas. Dois procedimentos de extração foram testados e descritos nos procedimentos 2 e 3.

4.3.1.2 Procedimento 2

O segundo procedimento está descrito na Figura 17 e foi baseado no método descrito por Bonta e colaboradores (2009), com algumas modificações. A escolha do método de extração deve-se à utilização de uma extração líquido – líquido antes da extração em fase sólida, que poderia solucionar o problema com os interferentes, visto que alguns compostos podem não solubilizar na solução de extração acetonitrila:diclorometano.

Figura 17: Fluxograma do procedimento experimental 2 para otimização da extração em fase sólida



O uso dos solventes acetonitrila e diclorometano são justificados pelo fato das sulfonamidas terem mais afinidade com solventes polares.

Uma diminuição significativa dos interferentes foi obtida com este método, como apresentado na Figura 18. No entanto, a perda de sulfonamidas durante o processo de tratamento da amostra e extração das sulfonamidas também foram significativas. A Figura 19 mostra o cromatograma do extrato do mel fortificado com sulfonamidas na concentração de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$. Nota-se que os sinais obtidos por esse método dão rendimentos (%) inferiores aos obtidos pelo 1º procedimento, apesar deste último não apresentar boa seletividade, Tabela 10. Este resultado foi causado pelo aquecimento durante a etapa de secagem no evaporador rotativo; apesar de se utilizar como temperatura máxima $50 \text{ }^\circ\text{C}$ a solução permanecia por um tempo longo nessa condição para secagem total, podendo ter ocasionado perdas de analito.

RESULTADOS

Figura 18: Cromatograma do extrato do branco de méis utilizando metodologia descrita por Bonta (2009) e usando como fase móvel ACN/tampão

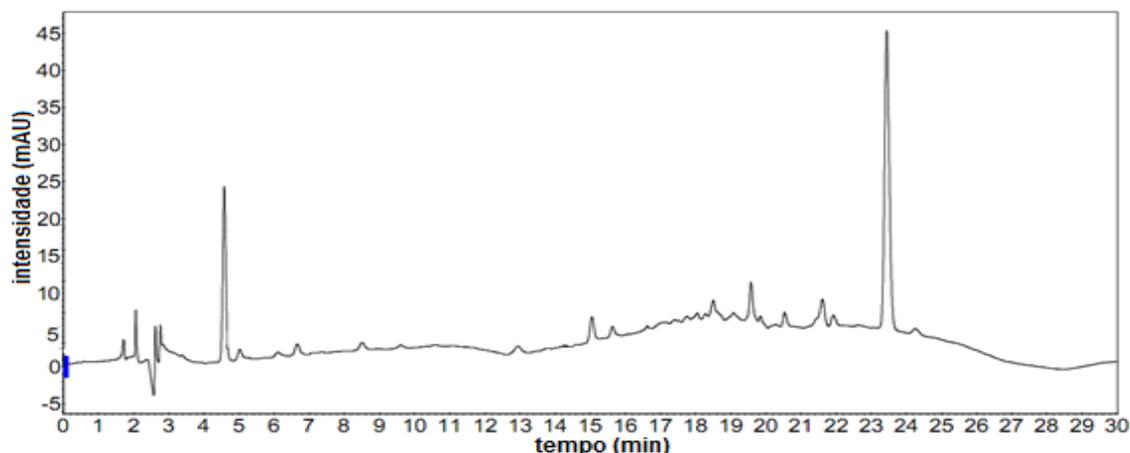


Figura 19: Fortificações das sulfas em concentração de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ (1- sulfadiazina, 2- sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)

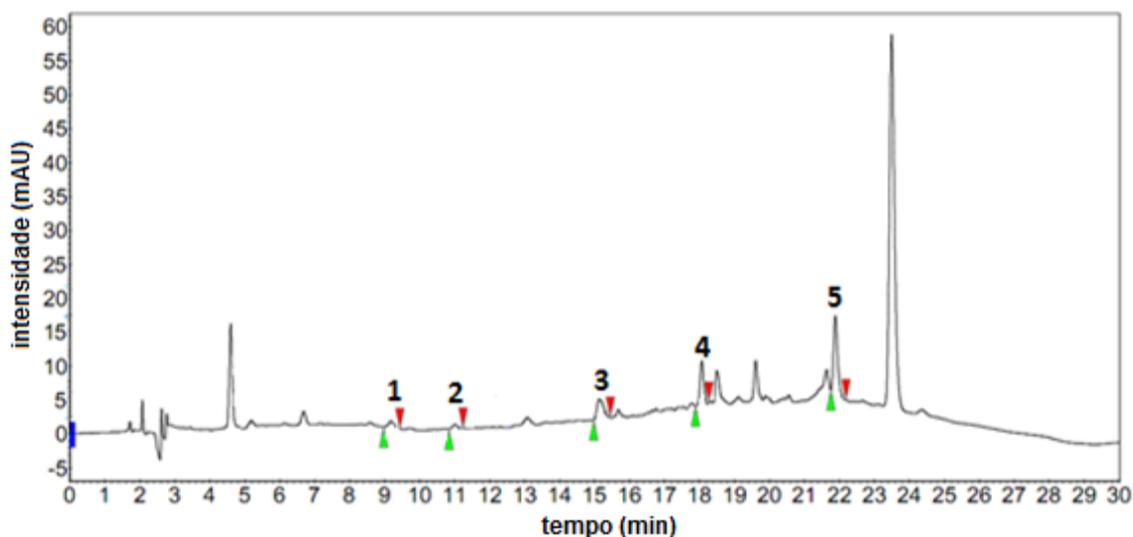


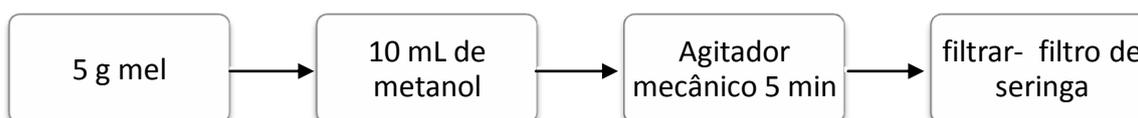
Tabela 10: Recuperações em $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para 1º e 2º procedimento, ambos utilizando fase móvel ACN/tampão, segundo proporções do teste1 e método descrito por Bonta (2009)

Analitos	Rec. 1ºproc (%)	Rec. 2ºproc.(%)
Sulfadiazina	62,5	13,0
Sulfatiazol	56,0	6,3
Sulfametazina	104,1	44,5
Sulfacloropiradazina	81,0	57,1
Sulfadimetoxina	66,0	87,2

4.3.2.1 Procedimento 3

O procedimento 3 foi baseado no método descrito por Bernal e colaboradores (2009). Avaliou-se um novo método de extração de sulfonamidas com o objetivo de reduzir o tempo da análise e obter melhores recuperações, reduzindo a perda de analitos geralmente observadas no passo de evaporação, que são usualmente utilizadas para remover o solvente inicial. O autor avaliou a quebra da ligação N-glicosídica com metanol, como descrito na Figura 20, visto que recuperações obtidas através de hidrólise ácida com HCl não foram eficientes.

Figura 20: Fluxograma do procedimento experimental 3 para otimização da extração em fase sólida



O procedimento consistiu na adição de metanol ao mel fortificado com todas as sulfonamidas, e para auxiliar o processo de quebra da ligação glicosídica utilizou-se um agitador mecânico por 5 min. A solução foi, então, filtrada em filtro de seringa e a injetada diretamente no cromatógrafo diminuindo, assim, as perdas obtidas durante o processo de extração e, conseqüentemente, aumentando as recuperações.

O metanol, sendo um solvente polar, facilita a solubilização das sulfas e do mel possibilitando a passagem do mesmo pelo filtro de seringa. No entanto, não foi possível a injeção cromatográfica devido à ineficiência da quebra da ligação glicosídica, que deixou a solução ainda muito viscosa, dificultando a filtração no filtro de seringa devido à obstrução dos poros da membrana.

Esse método, portanto, foi excluído dos procedimentos para novos testes de extração.

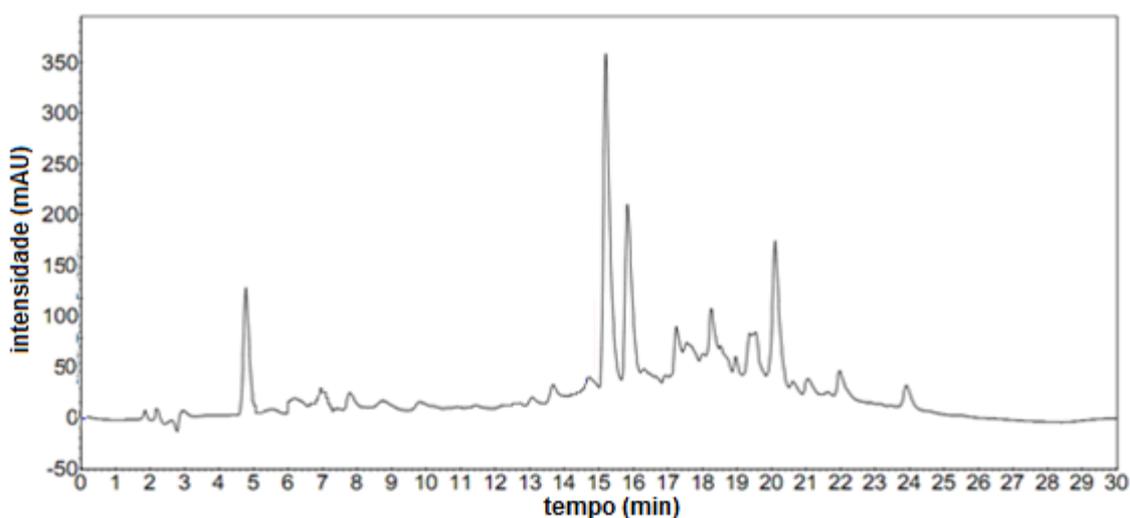
4.3.2.2 Procedimento 4

Apresentaram resultados satisfatórios os processos de extração provenientes do primeiro procedimento (hidrólise ácida com HCl, diluição em solução tampão acetato de sódio, sem aquecimento e fase móvel ACN/tampão), no entanto a seletividade do método foi afetada devido aos interferentes provenientes da matriz mel. Com intuito de alterar as zonas de eluição dos interferentes e dos analitos, foram avaliadas mudanças na proporção da fase móvel ACN/tampão. Foram utilizadas as proporções descritas no teste 5, Tabela 7 (item 4.2.3).

Nas Figuras 21, 22 e 23 são mostrados cromatogramas do extrato do branco dos testes 6, 1 e 5 em que são mudadas as proporções e as fases móveis e mantendo-se o processo de extração descrito no 1º procedimento. No teste 5 (ACN/tampão) é possível verificar que os interferentes tiveram suas zonas de eluição alteradas com a mudança na proporção da fase móvel fazendo com que não houvesse sobreposição/coeluição dos picos interferentes com os analitos.

As etapas do método de extração utilizado no preparo das amostras de mel são descritos na Figura 24.

Figura 21: Cromatograma do extrato do branco do mel, utilizando fase móvel ACN/água conforme Teste 6



RESULTADOS

Figura 22: Cromatograma do extrato do branco do mel, utilizando fase móvel ACN/tampão conforme Teste 1

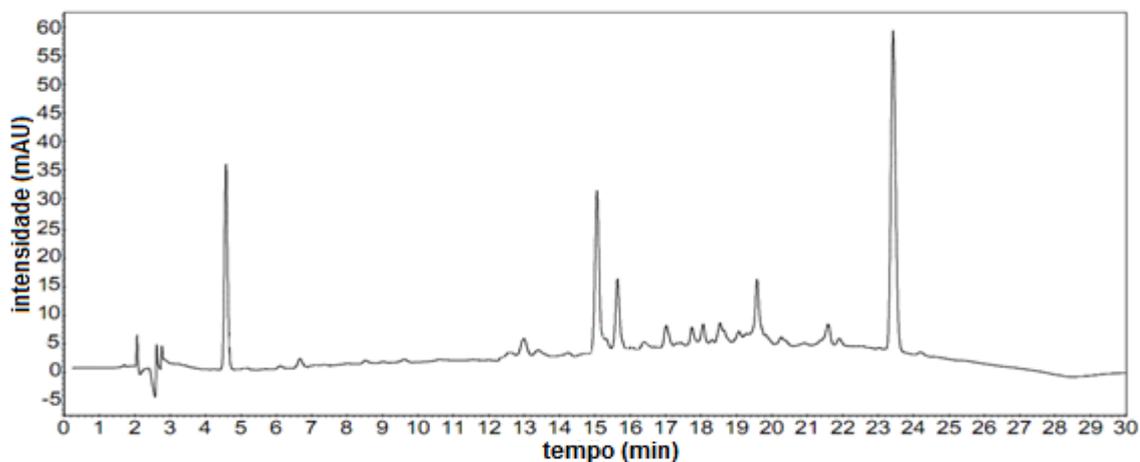


Figura 23: Cromatograma do extrato do branco do mel, utilizando fase móvel ACN/tampão conforme Teste 5

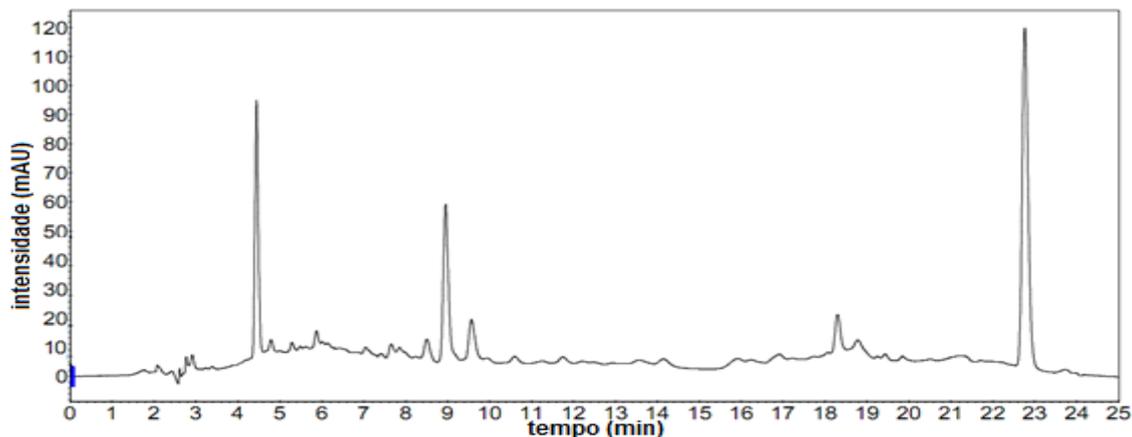
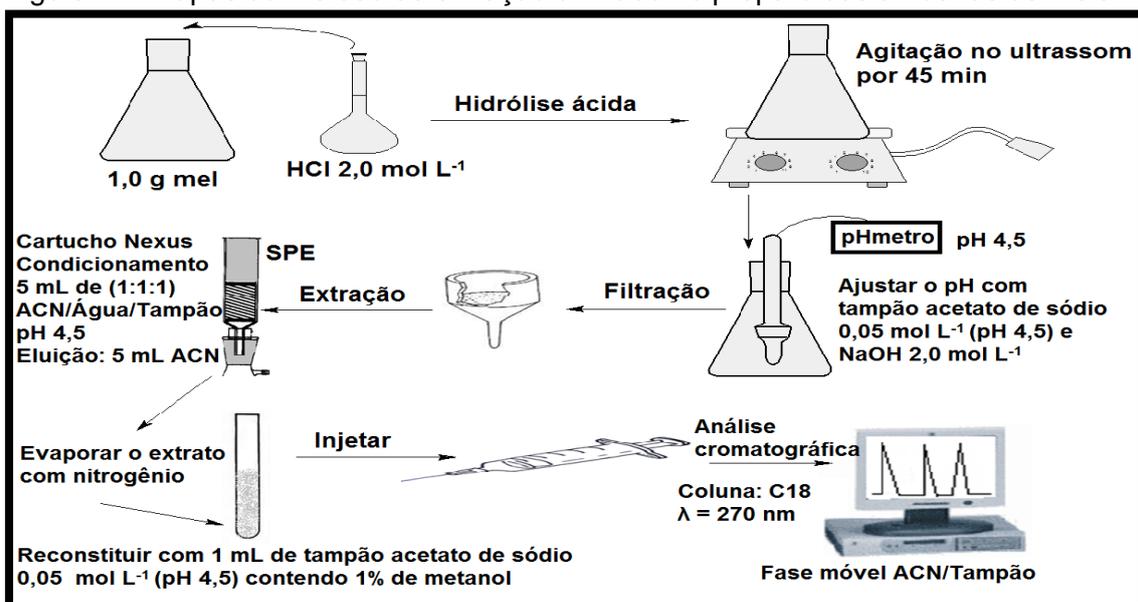


Figura 24: Etapas do método de extração utilizado no preparo das amostras de méis



Baseado em: LINHARES, 2009

4.4 Condições cromatográficas otimizadas

Na Tabela 11 são mostradas as condições cromatográficas para determinação/identificação das sulfonamidas em mel de abelha africanizada.

Tabela 11: Condições cromatográficas otimizadas para análise de sulfonamidas em mel

Item	Condições
Equipamento	HPLC-DAD
Coluna	Phenomenex C18: 150 mm x 4,6 mm, 4 μ m
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ , pH 4,5
Proporção dos solventes (A:B)	10:90
	20:80
	20:80
	30:70
	40:60
Fluxo	20:80
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 μ L
Comprimento de onda	270 nm

Na Tabela 12 são apresentados os tempos de retenção obtidos para cada sulfonamida nas soluções *mix* de padrões de sulfonamidas após otimização das condições cromatográficas. Percebe-se que a variação dos tempos de retenção entre injeções é muito pequena indicando, assim, estabilidade do sistema cromatográfico.

RESULTADOS

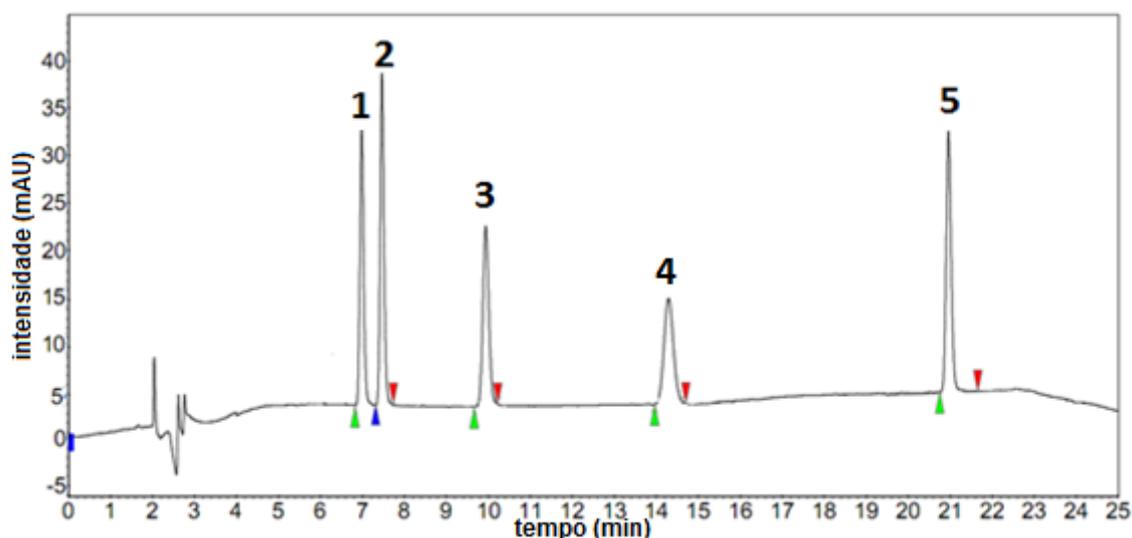
Tabela 12: Tempos de retenção (TR) obtidos para cada sulfonamida na análise cromatográfica de uma mistura de padrões de sulfonamidas

Analitos	Tempo de retenção (TR) (min)*	Desvio padrão
Sulfadiazina	7,00	0,017
Sulfatiazol	7,49	0,023
Sulfametazina	9,97	0,023
Sulfaclopiradazina	14,31	0,015
Sulfadimetoxina	20,99	0,023

*Valor médio de cinco injeções consecutivas

A resposta do detector é mostrada na Figura 25 pelo cromatograma da solução padrão das sulfonamidas em concentração $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos no HPLC-DAD, operando com software Galaxie. Observa-se boa separação cromatográfica dos analitos estudados.

Figura 25: Cromatograma da solução padrão *mix* das sulfonamidas (1 – sulfadiazina, 2 – sulfatiazol, 3 – sulfametazina, 4 – sulfaclopiradazina, 5- sulfadimetoxina)



4.5 Validação do método

Etapas anteriores à validação do método devem ser realizadas para garantir determinações adequadas, com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis (MAMANI, 2007). Trata-se de etapas importantes, visto que o instrumento e o método devem ser adequados ao propósito do experimento

RESULTADOS

(*suitability test*) (LANÇAS, 2004). Tais etapas incluem a avaliação da adequação do sistema e a estabilidade das soluções e amostras.

4.5.1 Adequação do sistema

Adequação do sistema significa assegurar o desempenho do mesmo antes ou durante a análise de amostras desconhecidas. Os parâmetros resolução (Rs), número de pratos (N) e fator de assimetria (As) foram avaliados e são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Avaliação do desempenho do sistema cromatográfico sob análise dos parâmetros de resolução, número de pratos teóricos e assimetria do pico

Parâmetros	Analitos*					Referência**
	SDZ	STZ	SDD	SCP	SDM	
Pratos (N)	28.337,0	32.149,2	23.121,4	18.500	14.829,02	N > 2000
Resolução (Rs)	4,48	3,00	11,56	12,77	20,91	Rs > 2
Assimetria do pico (As)	1,17	1,18	1,12	1,10	1,14	As < 2
Tempo de retenção (tr)	7,00	7,49	9,97	14,31	20,99	-

Analitos*: SDZ - Sulfadiazina, STZ - Sulfatiazol, SDD - Sulfametazina, SCP - Sulfaclopiradazina, SDM – Sulfadimetoxina.

**Valor de referência (SHABIR, 2003)

O número de pratos teóricos indica a eficiência da coluna frente às substâncias analisadas e as condições de análises. De acordo com a Tabela 13, para todos os analitos, a coluna Phenomenex mostrou-se eficaz apresentando N > 2000.

A análise da resolução (Rs) mostrou que as substâncias, mesmo apresentando zonas de eluição próximas, apresentam separação satisfatória, sem interferências mútuas.

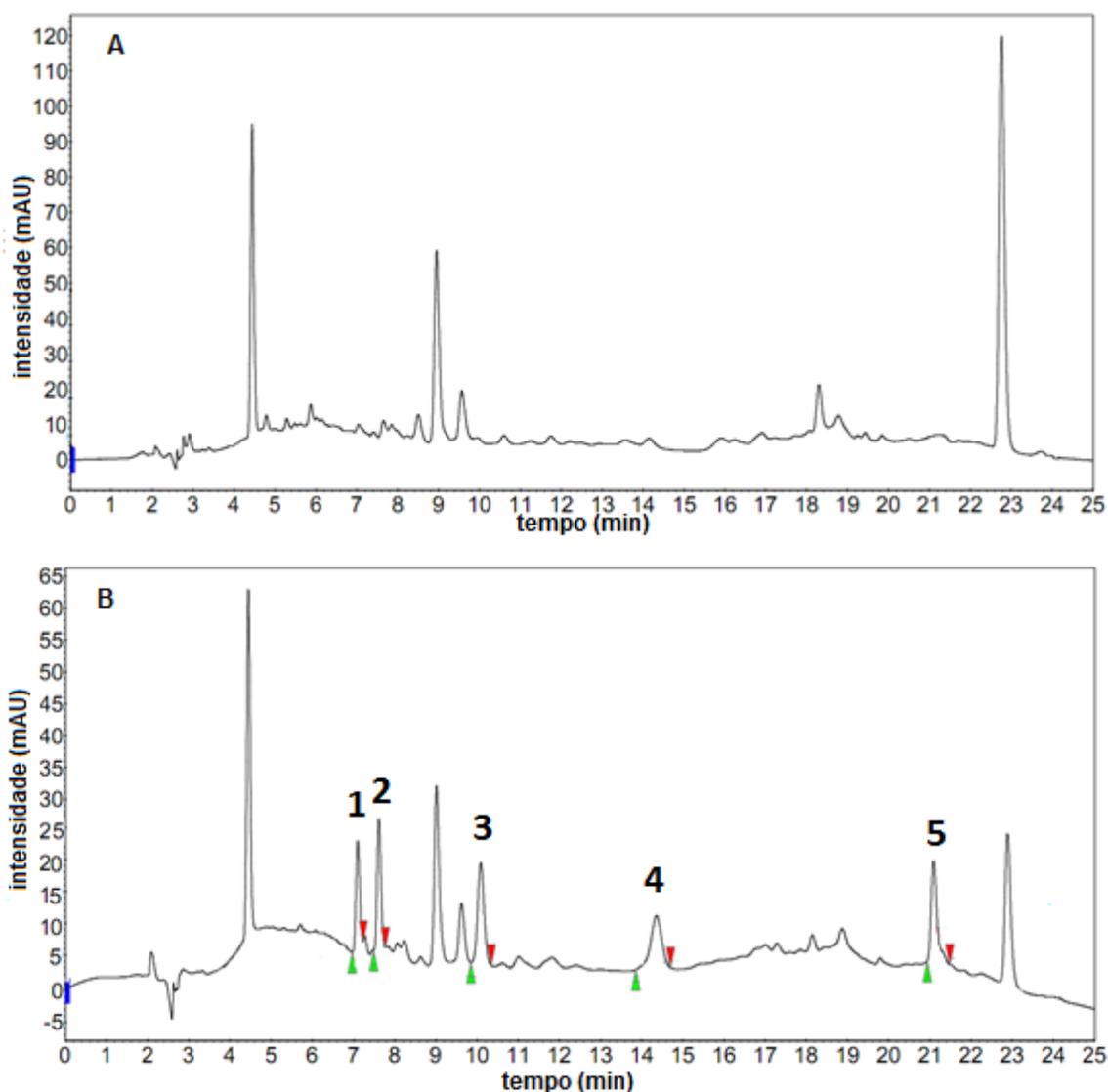
Além disso, os picos apresentam simetria, pois apresentam valor próximo a 1 indicando que não houve arrastamento na eluição das sulfonamidas.

De acordo com Tabela 13, todos os parâmetros avaliados estão em conformidade com os estabelecidos por Shabir (2003).

4.5.2 Seletividade

Para verificar se o método para detecção de sulfonamidas em mel de abelha é seletivo, injetou-se amostras em branco e amostras fortificadas e comparou-se os cromatogramas, como mostrado na Figura 26.

Figura 26: Comparação dos cromatogramas do extrato do branco (A) e do mel fortificado com sulfonamidas na concentração $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B) (1-sulfadiazina, 2-sulfatiazol, 3- sulfametazina, 4- sulfacloropiradazina e 5- sulfadimetoxina)



Como mostrado na Figura 26, apesar de ter havido uma diminuição significativa das interferências observadas, não houve completa eliminação, sendo verificada a eluição de compostos próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, porém com espectros de absorção distintos dos

RESULTADOS

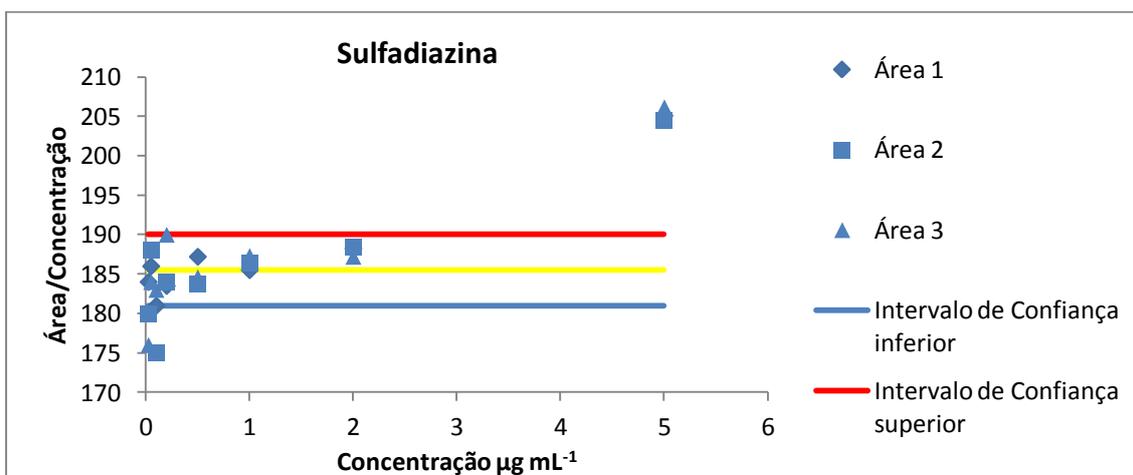
padrões das sulfonamidas estudadas. Foi possível, assim, a detecção e quantificação das cinco sulfonamidas em concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ sem interferências das outras substâncias provenientes da matriz. Neste caso, a avaliação da seletividade do método é importante, pois trata-se de uma amostra complexa, o mel, e a presença de outras estruturas poderiam alterar os resultados, levando a resultados equivocados, com indicação de falsos positivos.

O método descrito, portanto, mostra-se seletivo por não ter interferentes nos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo.

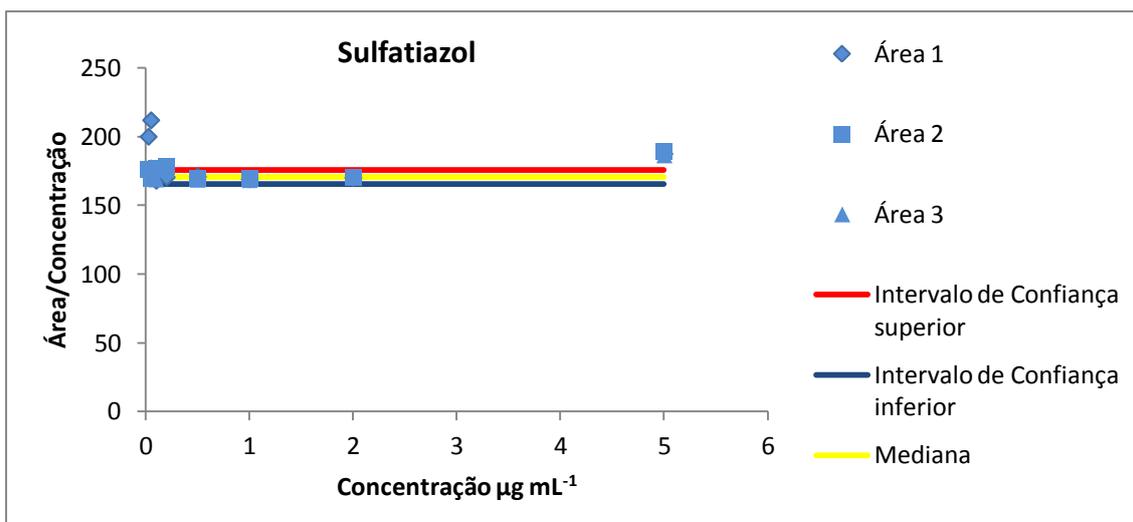
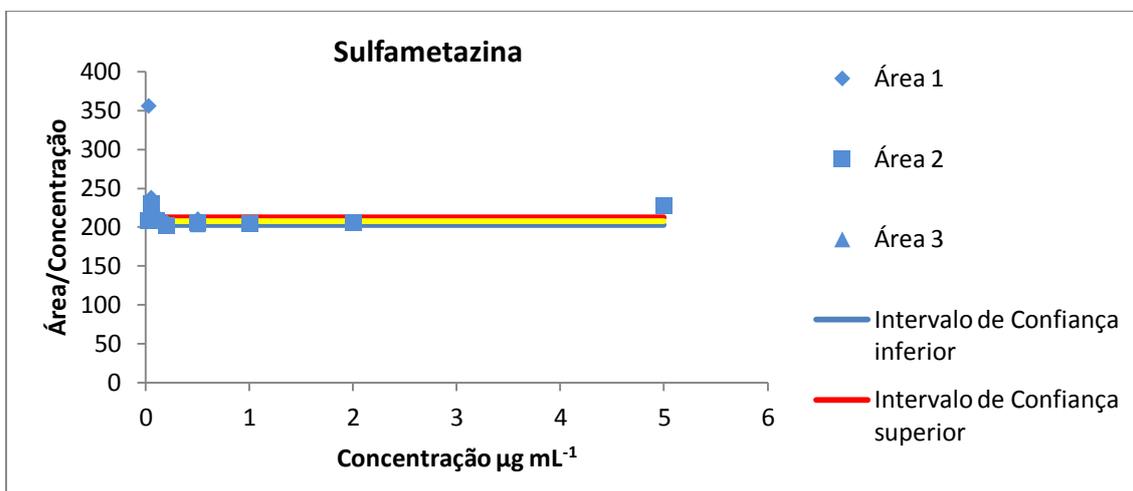
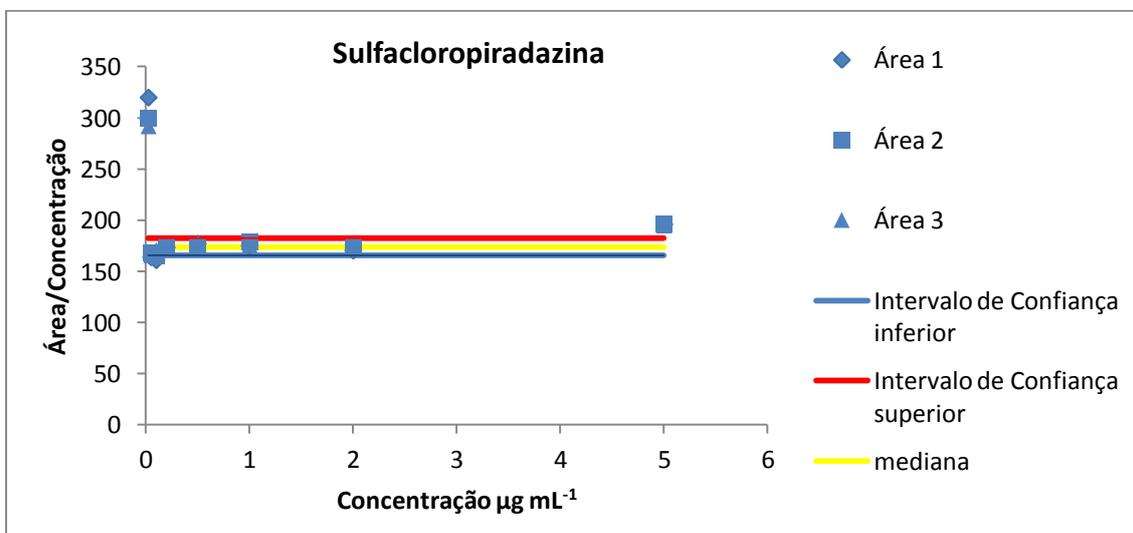
4.5.3 Linearidade e sensibilidade

A linearidade foi determinada através da construção de curvas analíticas e também de curvas de linearidades baseadas no Teste de Huber. Pelo teste foi possível a rejeição de dados anômalos que resultariam em erros nos resultados das análises. Para isso foram feitas injeções sucessivas em cada nível de concentração, iniciando da menor para a maior concentração. Após a rejeição dos dados anômalos as médias das áreas foram usadas na construção das curvas analíticas. As curvas de linearidade das sulfonamidas em estudo são mostradas nas Figuras 27, 28, 29, 30 e 31.

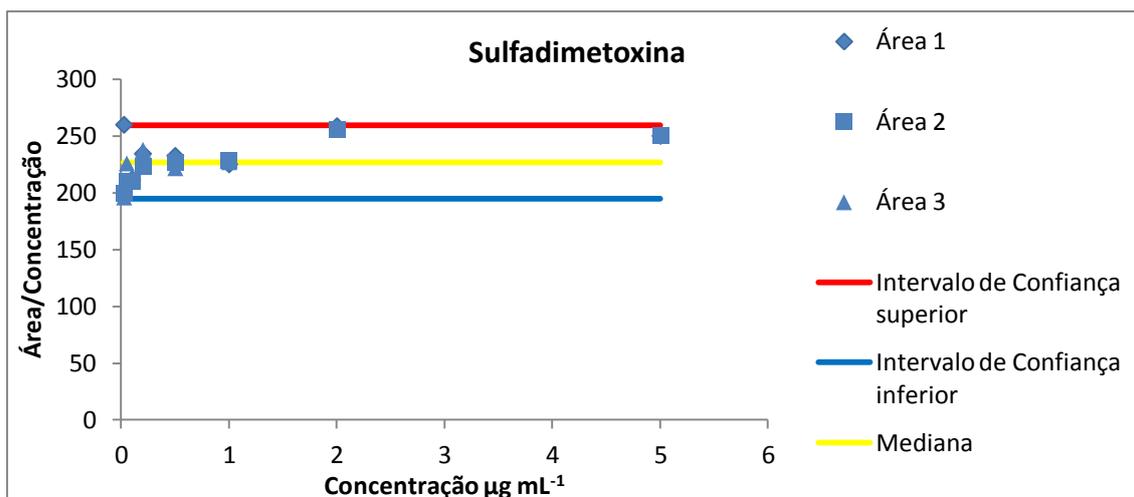
Figura 27: Curva de linearidade da sulfadiazina variando de $0,025 - 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$



RESULTADOS

Figura 28: Curva de linearidade da sulfatiazol variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Figura 29: Curva de linearidade da sulfametazina variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Figura 30: Curva de linearidade sulfacloropiradazina variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 

RESULTADOS

Figura 31: Curva de linearidade da sulfadimetoxina variando de 0,025 - 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 

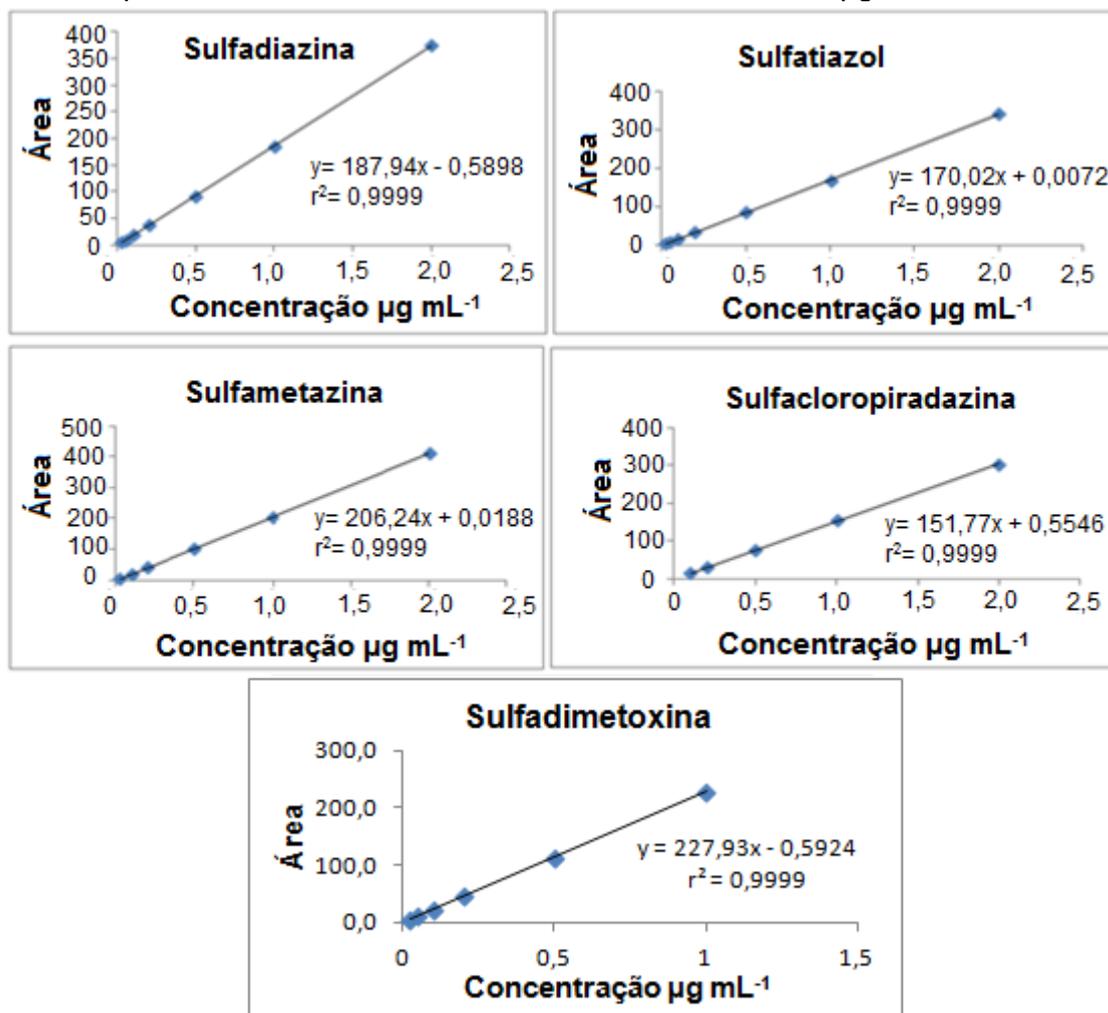
Na Tabela 14 e na Figura 32, são apresentados os resultados e as curvas analíticas, respectivamente, obtidas pela injeção dos padrões nas concentrações citadas para cada sulfonamida. A avaliação das curvas de linearidade e das curvas analíticas mostraram que para todas as sulfonamidas, a concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não representou adequadamente a relação de linearidade entre área e concentração sendo, portanto, excluída dos pontos que representam a linearidade da curva analítica. Outra exceção na definição do intervalo linear foi a sulfaclopiradazina, na qual os pontos de concentração 0,025 e 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram excluídos da curva analítica, estando fora do intervalo de linearidade para esse composto. Analisando as equações das curvas analíticas, pode-se concluir que o modelo é linear e adequado para as sulfonamidas em estudo, fornecendo coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,999, que demonstra adequada proporcionalidade entre concentração dos compostos e sinal analítico, obtido na faixa de aplicação do método.

Tabela 14: Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas para sulfonamidas

Analito	Intervalo Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2	Equação da reta
Sulfadiazina	0,025 – 2,0	0,9999	187,94x - 0,5898
Sulfatiazol	0,025 – 2,0	0,9999	170,02x + 0,0072
Sulfametazina	0,025 – 2,0	0,9999	206,24x + 0,0188
Sulfaclopiradazina	0,1 – 2,0	0,9999	151,77x + 0,5546
Sulfadimetoxina	0,025 – 1,0	0,9999	227,93x - 0,5924

RESULTADOS

Figura 32: Curvas analíticas da sulfadiazina, do sulfatiazol, da sulfametazina, da sulfaclopiradazina e da sulfadimetoxina variando de 0,025 – 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$



A sensibilidade é um parâmetro que descreve a resposta do detector, variando em função da concentração do analito. Foi obtida através da regressão linear da curva analítica, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação). Os resultados são mostrados na Tabela 15, percebendo-se maior sensibilidade para a sulfadimetoxina, seguida por sulfadimidina, sulfadiazina, sulfatiazol e sulfaclopiradazina. Os altos valores dos coeficientes angulares indicam que, com pequenas variações na concentração obtêm-se grandes variações nos sinais medidos, garantindo a diferenciação entre duas concentrações bastante próximas (BRITO et al., 2003).

Considerando-se, assim, a menor concentração obtida na curva de calibração ($0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$), o menor nível de concentração que pode ser adequadamente detectado, nas condições utilizadas para a pré-concentração

RESULTADOS

da amostra é de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor inferior ao limite máximo de resíduos de sulfonamidas, estabelecido na legislação, conforme a Instrução Normativa nº 11, de 29 de abril de 2012 (BRASIL, 2012).

4.5.4 Limites de detecção e quantificação

Na Tabela 15, encontram-se os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), calculados a partir dos parâmetros da curva analítica obtidos com soluções de mistura de padrões de sulfonamidas preparadas em tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5) e metanol. Os limites de detecção e de quantificação permitem determinação em concentrações inferiores ao limite máximo de resíduos, de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Desta forma, considerando as condições estabelecidas no presente método analítico, é possível a quantificação das sulfonamidas em concentrações tão baixas quanto $2,7$ a $49,8 \mu\text{g L}^{-1}$, o que demonstra a adequação do método na determinação de resíduos de sulfonamidas em mel de abelhas.

Tabela 15: Resultados da sensibilidade, do limite de detecção e de quantificação do método para detecção de sulfonamidas

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SCP	SDM
Sensibilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	187,94	170,02	206,24	151,77	252,58
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,8	6,7	32,8	6,9	11,7
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,7	10,2	49,8	10,4	17,7

4.5.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperações, em três níveis de concentração (100 , 500 e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Os resultados são apresentados na Tabela 16 e mostram que, para todas as sulfonamidas, as recuperações estão no intervalo estabelecido para matrizes complexas, ou seja, de $50 - 120\%$, com precisões inferiores a $\pm 15\%$ (RIBANI et al., 2004). As menores recuperações foram obtidas para sulfametazina e sulfadimetoxina (63 e 64% , respectivamente) na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e

RESULTADOS

as maiores foram para a sulfaclopiradazina e sulfadiazina (aproximadamente 98 e 96%, respectivamente) nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Ressalta-se, entretanto, que a cromatografia líquida com detecção por conjunto de diodos, a despeito da menor sensibilidade, se comparada com detecção por espectrometria de massas, por exemplo, apresenta como vantagens a simplicidade do sistema, frequentemente mais disponível e acessível em laboratórios de análise rotineira de controle de resíduos em alimentos.

Tabela 16: Resultado da exatidão do método para detecção de sulfonamidas em 100, 500 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Analito	Concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$	Recuperação (%)	RSD* (n=5)
Sulfadiazina	1000	96,4	0,2
	500	87,8	1,2
	100	74,2	6,8
Sulfatiazol	1000	88,6	0,8
	500	80,4	1,9
	100	95,9	1,4
Sulfametazina	1000	96,3	0,3
	500	85,5	0,9
	100	63,0	1,8
Sulfaclopiradazina	1000	97,4	0,4
	500	98,3	1,0
	100	95,0	2,1
Sulfadimetoxina	1000	96,4	1,4
	500	86,4	3,9
	100	64,0	1,7

RSD*= Desvio padrão relativo das recuperações

4.5.6 Precisão

Na Tabela 17 são apresentados os resultados de repetibilidade e precisão intermediária, obtidas para amostras de méis, fortificadas com as sulfonamidas em estudo, em três níveis de concentração. Para a repetibilidade,

RESULTADOS

os coeficientes de variação variaram entre 0,6 a 10%, valores considerados satisfatórios, levando-se em consideração envolver análise em matriz de elevada complexidade. Sendo assim, o método apresenta boa precisão, em termos de repetibilidade, visto que para matrizes complexas o aceitável é de 15%, estando, portanto, dentro das normas estabelecidas pela ANVISA (2003).

Em termos de precisão intermediária, o parâmetro foi avaliado em função do tempo, com análise das amostras feitas em 2 dias diferentes, mantendo-se demais condições constantes. Os coeficientes de variação obtidos também foram satisfatórios, variando entre 2 e 10%. Verificou-se, portanto, que o método estabelecido para análise de resíduos de sulfonamidas em mel é preciso, apresentando resultados confiáveis, conforme normas estabelecidas pela ANVISA (2003).

Tabela 17: Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método cromatográfico para determinação de sulfonamidas

Analito	Concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$	Repetibilidade		Precisão intermediária		
		n	CV (%)	Dia	n	CV (%)
Sulfadiazina	1000	5	0,4	2	5	2,8
	500	5	1,4	2	5	6,0
	100	5	9,9	2	5	10,8
Sulfatiazol	1000	5	0,9	2	5	2,5
	500	5	2,6	2	5	5,4
	100	5	1,7	2	5	7,4
Sulfametazina	1000	5	0,6	2	5	5,6
	500	5	1,4	2	5	3,4
	100	5	9,2	2	5	10,2
Sulfacloropiradazina	1000	5	0,8	2	5	2,9
	500	5	1,7	2	5	7,8
	100	5	3,0	2	5	7,2
Sulfadimetoxina	1000	5	1,9	2	5	5,9
	500	5	4,7	2	5	6,2
	100	5	5,7	2	5	5,8

4.5.7 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado na determinação de resíduos de sulfonamidas em méis produzidos na região do Alto Turi – MA, mas especificamente nas cidades de Santa Luzia do Paruá e Nova Olinda do Maranhão (coletadas em agosto de 2012). As amostras 1 a 7, coletadas em 2010 e 2011, não foram avaliadas quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, pois como a aplicação do método só ocorreu em 2012 os resultados poderiam ser equivocados devido a processos de degradação dos compostos estudados causados pelo tempo de armazenamento. Os resultados das análises são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18: Análise de resíduos de sulfonamidas em amostras de méis coletadas na região do Alto Turi -MA

Amostras	Local	Resultado
8, 9, 10, 11 e 12	Santa Luzia do Paruá	nd*
13, 14, 15, 16, 17 e 18	Nova Olinda do Maranhão	nd*

*nd = não detectado

Conforme pode ser observado na Tabela 18 e nas Figuras 33 e 34, não foram detectados resíduos de sulfonamidas nas amostras de méis coletadas nas cidades de Santa Luzia do Paruá e Nova Olinda do Maranhão, respectivamente. No entanto, não se pode afirmar que o mel está dentro dos parâmetros exigidos pela legislação, pois a concentração mínima de quantificação das sulfonamidas utilizando o método desenvolvido é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o limite máximo de sulfonamidas no mel é $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Cabe ressaltar também que por não apresentar um número suficiente de amostras, os resultados das análises não podem ser utilizados para definir a qualidade do mel da região do Alto Turi, mas apenas a aplicabilidade do método.

RESULTADOS

Figura 33: Cromatograma da amostra 4 referente a cidade de Santa Luzia do Paruá

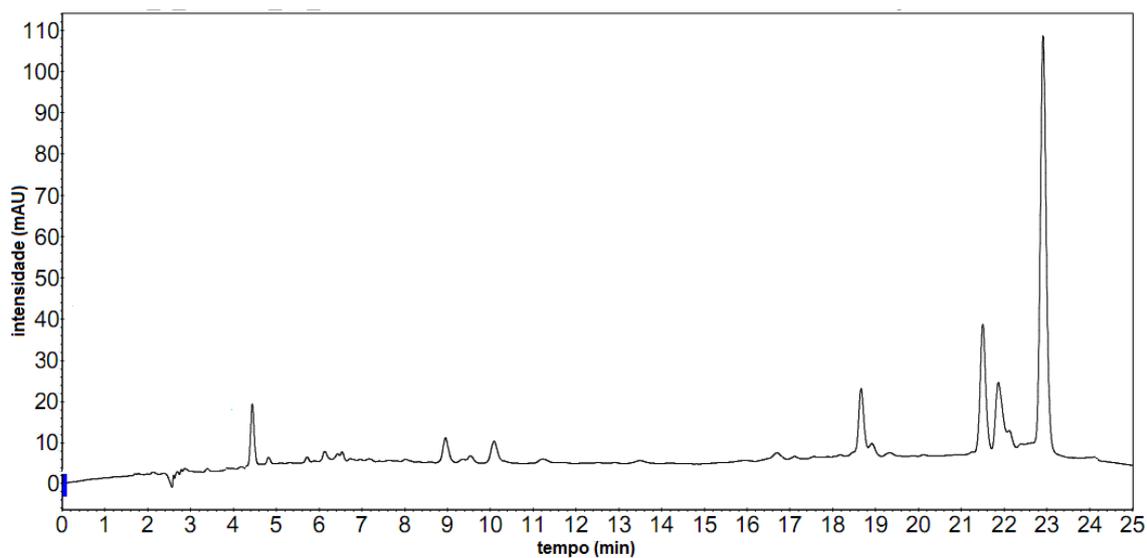
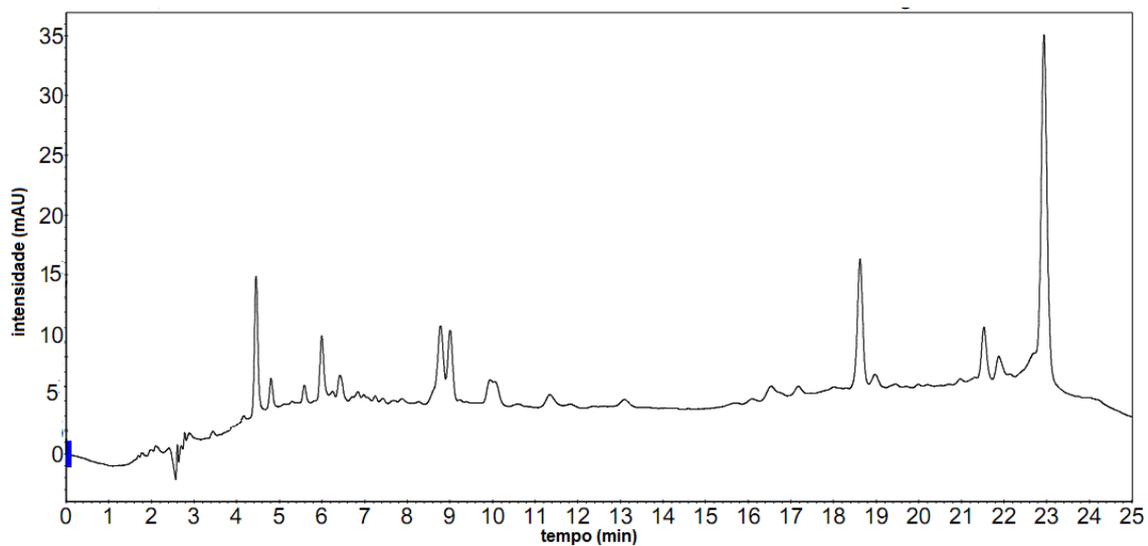


Figura 34: Cromatograma da amostra 11 referente à cidade de Nova Olinda - MA



5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi otimizado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjos de diodos (HPLC-DAD), para análise simultânea de sulfatiazol, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfaclopiridazina e sulfadimetoxina em mel de abelhas africanizadas. Nessa etapa, foram avaliadas colunas analíticas, fases móveis e os comprimentos de onda. Observou-se que colunas C18 e fase móvel acetonitrila/tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ são mais apropriadas para a detecção dos compostos em estudo, assim como o comprimento de onda em 270 nm.

A extração em fase sólida (SPE) aliada ao pré-tratamento da matriz através da hidrólise ácida, mostrou-se etapa imprescindível na quantificação de sulfonamidas em mel, devido à elevada complexidade da amostra e à forte tendência de interação das sulfonamidas com açúcares presentes no mel. A eficiência da SPE foi comprovada por meio de ensaios de recuperação, nos quais se obteve na concentração de 100 µg kg⁻¹, porcentagens de 63 a 96%, que para uma amostra complexa é considerado satisfatório.

O estudo de validação demonstrou que o método otimizado é seletivo, linear, preciso e exato. Os limites de detecção e de quantificação variaram, respectivamente, de 1,8 a 32,8 µg L⁻¹ e de 2,7 a 49,8 µg L⁻¹, valores inferiores aos limites máximos de resíduos, 50 µg kg⁻¹, estabelecidos na legislação (Instrução Normativa nº 11, de 29 de abril de 2012).

No que se refere aos parâmetros físico-químicos, as análises demonstraram que 71% das amostras de méis estavam em desacordo com a legislação brasileira em pelo menos um parâmetro requerido pela Instrução Normativa nº11 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sendo assim, considerados não recomendados para consumo.

O método otimizado e validado foi aplicado em amostras de méis adquiridas na região do Alto Turi – MA, não sendo encontrados resíduos de sulfonamidas nessas amostras.

A metodologia analítica e a extração em fase sólida estabelecidas para análise cromatográfica apresentaram parâmetros analíticos aceitáveis, que demonstra condições para uso na análise de sulfonamidas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aprimoramento da metodologia de extração, minimizando-se efeito matriz e/ou aumentando-se a taxa de pré-concentração, de forma a permitir maiores níveis de detecção;
- Utilização de detectores mais sensíveis, como o de espectrometria de massas;
- A implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) para melhorar e assegurar a qualidade dos produtos apícolas, que traria valorização comercial ao mel produzido na região.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 96, n. 4, p. 271-281, 2005.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 22000**: Sistemas de gestão da segurança de alimentos – Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. Rio de Janeiro: ABNT; 2006.

AFONSO, I. F. **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de derivados heterocíclicos com atividade antimicrobiana**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2008.

AGROLINK. **Sebrae-SP e apicultores promovem a campanha meu dia pede mel**. Disponível em: <<<http://www.agrolink.com.br/noticias/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia>>> Acesso: 13 mai. 2012.

ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; SABINO, P. T. M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p.1587-1592, 2007.

ANADÓN, A., MARTINEZ-LARRANAGA, M. R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. **Livestock Production Science**, v. 59, p. 183-198, 1999.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico**: sulfonamidas. 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas.htm>> Acesso em: 22 jun. 2012.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17 ed. Horwitz, W.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, Chapter, v. 44, p. 22 – 33, 2000.

APACAME – Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Mefíferas Europeias. **O que é apicultura**. Disponível em: <<<http://www.apacame.org.br/index1>>> Acesso em: 02 jun. 2012.

APACAME – Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias. **Campanha nacional estimula o consumo do mel no Brasil**. Disponível em: <<<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/106/campanha.htm>>> Acesso em: 02 out. 2012.

ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D.; SOUSA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade do Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 51-55, 2006.

AROCHA E. M. M.; OLIVEIRA, A. J. F.; NUNES, G. H. S.; MARACAJÁ P. B. Qualidade do mel de abelha produzidos pelos Incubados da IAGRAM e comercializado no Município de Mossoró/RN. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 1, p.211-217, jan/mar, 2008.

ARRUDA, C. M. F. **Características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) da região da Chapada Araripe, Município de Santana do Cariri, Estado do Ceará**. 2003. Dissertação (mestrado) – Pós-Graduação em Química com área de concentração em Etimologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

BALAYIANNIS, G.; BALAYIANNIS, P. Bee Honey as an Environmental Bioindicator of Pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 55, n. 3, p. 462-470, 2008.

BANDO, E. **Ocorrência de resíduos em antimicrobianos em leite pasteurizado comercializado no estado do Paraná, Brasil**. 2006. Dissertação (mestrado) - Pós-Graduação em Ciências da saúde. Maringá, 2006.

BASTOS, D. H. M.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; MARQUES, M. O. M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 122-129, mai./ago., 2002.

BELITZ, H.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, S.A., 1992.

BERNAL, J.; NOZAL, M. J.; JIMÉNEZ, J. J.; MARTÍN, M. T.; SANZ, E. A new and simple method to determine trace levels of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7275-7280, 2009.

BERTOLDI, F. C.; REIS, V. D. A.; GONZAGA, L. V.; CONGRO, C. R. Caracterização físico-química e sensorial de amostras de mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) produzidas no pantanal. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 1, p. 63-74, jan./jun. 2007.

BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v. 37, n. 1, p. 1-18, 2006.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. Harmonized methods of the European honey commission. **Apidologie**, p. 1-59, 1997.

BONTA, V.; MĂRGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D.; BOBIȘ, O. Determination of six sulfonamide residues in honey by HPLC with fluorescence detection. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 66, n. 1-2, p. 237–241, 2009.

BRASIL – Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. **Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/2003/L10.831.htm>> Acesso em: 19 abr. 2011.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 6, 02 de julho de 1985, seção 1, página 11100. **Lex**: Aprova as Normas Higiênico-Sanitárias e Tecnológicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados: Estabelecimentos Industriais.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção de mel cresce 30% no último ano**. 2011. Disponível em: <<<http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2011/03/producao-de-mel-cresce-30porcento-no-ultimo-ano>>> Acesso em: 7 ago. 2012.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa, n. 42, 20 dez 1999. **Diário Oficial da União**, 1999.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº11, 29 de abril de 2012. **Diário Oficial da União**. **União**, D.O.U. Nº. 101, 25 mai. 2012.

BRASIL – Ministério da Agricultura. Instrução normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 out. 2000. Seção 1, p. 16-17, 2000.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRITO, R. L. **Curso de Getecnologias aplicadas ao PNGEO/CBA**: Aplicação do Piloto PNGEO no estado do Maranhão, 2009.

BRITO, R. L. **Importância do georreferenciamento na exploração da apicultura e meliponicultura**. 2010?. Disponível em: <<<http://xibla.com.br/PDF/RicardoLustosa.pdf>>> Acesso: 18 de jun. 2012.

- CAMARGO, R. C. R. **Produção orgânica de mel no Brasil**: realidades e gargalos. Disponível em: <<http://www.xibla.com.br/PDF/Ricardo%20Camargo.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2012.
- CARVALHO, C. A. L. **Mel de abelhas sem ferrão**: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas/BA: Série Meliponicultura, 2005. 32p.
- CHERCHI, A.; SPANNEDA, L.; TUBEROSO, C. I. G. Influence of aging on the quality of honey. **Industria Conservi**,. v. 78, p. 266-271, 1997.
- COMISSÃO EUROPÉIA. **Comunicação da comissão ao parlamento europeu e ao conselho relativa à saúde das abelhas**. Bruxelas, 2010.
- CORREIA, D. M. M. **Análise de sulfonamidas no mel**: validação e otimização de um método de HPLC-fluorescência. 2008. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2008.
- COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura**: manejo e produtos. 3. ed. Jaboticabal: Funep, 2006.
- CRANE, E. **Bees and beekeeping**: science, practice and world resources. Oxford: Heinemann Newnes, 1990. 614 p.
- CRANE, E. History of honey. In: **Honey a comprehensive survey**. 2 ed. London: Heinemann, 1976. p. 439-488.
- CRANE, E. **Honey**: a comprehensive survey. London: Heinemann, 1975. 608p.
- CRANE, E. **Livro do mel**. Trad. de Astrid Kleinert Giovannini. São Paulo: Nobel, 1983. 226 p.
- CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª ed. São Paulo: Nobel, 1998.
- DE JONG, D. **Desaparecimento das abelhas – Brasil**. Disponível em: <<http://www.xibla.com.br/PDF/Davis_de_Jong3.pdf>> Acesso em: 19 jun. 2012.
- DUARTE, R. B. A. **Histórias de sucesso**: agronegócios: apicultura. Brasília: SEBRAE, 2006. 144 p.
- DURÁN, J. E. T.; LAURINO, M.C.; ISSA, M. R. C.; TOLEDO, V. A. A.; BASTOS, E.; SOARES, A. E. E. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, n. 12, 1988, Salvador (BA), **Anais...** p. 404-405, 1998.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S.; BESERRA E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera*

e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, 2005.

FACUNDO, H. V. V. **Mudanças no perfil sensorial e de voláteis do suco de abacaxi concentrado durante o processamento**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FERNÁNDEZ, M.; PADRÓN, C.; MARCONI, L.; GHINI, S.; COLOMBO, R.; SABATINI, A. G.; GIROTTI, S. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, p. 257–265, 2001.

FUJITA, C. K. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) em solo: validação de método e avaliação da influência da queima de cana-de-açúcar na região de Araraquara**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

GONZÁLEZ, M. M; LORENZO, C. El análisis sensorial. In: LORENZO, C. **La miel de Madrid**. Madrid: Madrinnova, 2002. p.137-160

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 1061-1070

GRAMACHO, K. P. Considerações sobre o melhoramento de abelhas com base no comportamento higiênico. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA: 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 2004. Natal. **Anais...** Natal: Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC-Salvador).

GRANJA, R. H. M. M.; NIÑO, A. M. M.; RABONE, F.; SALERNO, A. G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p.116-119, 2008.

GUIMARÃES, N. P. **Apicultura, a ciência da longa vida**. Belo Horizonte: Itatiaia Ltda, 1986.

HAJŠLOVA, J.; HOLADOVA, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; PETR, C.; KEMPNY, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 283-295, 1998.

HAJŠLOVA, J.; ZROSTLIKOVA, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

HOFF, R. **Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas**. 2008. Dissertação

REFERÊNCIAS

(Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

HORN, H. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, n. 11, Teresina, 1996. **Anais...** Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996. p. 403-429.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: aquisição alimentar domiciliar per capita Brasil e Grandes Regiões. Rio de Janeiro, 2010.

KUJAWSKI, M. W.; NAMIESNIK, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 9, 2008.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p.

LASCEVE, G.; GONNET, M. Analyses por radioactivation du contenu mineral d'un miel possibilite de preciser son origine. **Apidologie**, v. 5, n. 3, p. 201-223, 1974.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MALINTAN, N. T.; MOHD, M. A. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 154-160, 2006.

MAMANI, M. C. V. **Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. 2007. 208 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências com área de concentração em Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MANDAIL, J. C. M.; BELARMINO, L. C.; BINI, D. A. Evolução da produção e mercado de produtos orgânicos no Brasil e no mundo. Disponível em: <<http://www.revista.ajes.edu.br/arquivos/artigo_20110220123621.pdf>> Acesso: 16 jun. 2012.

MANYI-LOH, C. E.; CLARKE, A. M.; NDIP, R. N. An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. **Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 8, p. 844-852, 2011.

MARCHINI, L. C. **Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera L.*, 1758 (Hymenoptera: Apidae) do estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos**. 2001. Tese (livre docência) – Escola

REFERÊNCIAS

Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

MARCHINI, L. C., SODRÉ, G. S., MORETI, A. C. C. C. **Mel brasileiro: composição e normas**. Ribeirão Preto: 2004. 111 p.

MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; RODRIGUES, S. R. Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) provenientes do Mato Grosso do Sul. In: 4º SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTO, Campinas, 2001. **Anais....** Campinas, 2001. p. 60.

MARQUES, L. J. P.; MUNIZ, F. H.; LOPES, G. S.; Silva, J. M. Levantamento da flora apícola em Santa Luzia do Paruá, Sudoeste da Amazônia, Maranhão. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 141-149, 2011.

MARUGÁN, M. I. R. **Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche**. Valencia: UPV, 2008. Tese (Doutorado) – Universidad Politecnica de Valencia, Valencia, 2008.

MAUDENS, K. E.; ZHANG, G. F.; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 85-92, 2004.

MIRANDA, M. **Produção de mel orgânico segue padrão internacional**. Campo Alegre, 2004. Disponível em: <<<http://www.paginarural.com.br/noticia/8306/producao-de-mel-organico-segue-padrao-internacional>>> Acesso em: 15 abr. 2011.

MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 18, p. 843-850, 1998.

MOURA, S. G. **Boas práticas apícolas e a qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera Linnaeus, 1758***. 2010. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

MOURA, S. G. **Qualidade do mel de abelhas (*Apis mellifera L.*) em função do ambiente e do tempo de armazenamento**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com área de concentração em Produção de Animais de Interesse Econômico, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.

MOREIRA, R. F. A; DE MARIA, C. A. B. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.

NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <<<http://www.honey.com/downloads/storyhoney>>> Acesso em: 05 ago. 2007.

REFERÊNCIAS

- NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; JIMÉNEZ, J. J.; MARTÍN M. T. High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 917, n. 1-2, p. 95-103, 2001.
- NUNES, T. B. A. Adulteração e influência do manejo na qualidade do mel. **Enciclopédia Biosfera**, n.1, ISSN 1809-0583, 2005.
- OIE – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Código sanitário para animais terrestres: doenças das abelhas**. 2007.
- ORTIZ-VALBUENA, A. The ash content of 69 honey samples from La Alcarria and neighbouring areas, collected in the period 1985-1987. **Cadernos de Apicultura**, n. 5, p. 8-9, 1988. **Apicultural Abstracts**, v. 40, n. 4, p. 360, 1989.
- PACHECO FILHO, J. **Mel orgânico da Bahia será comercializado pela rede Pão de Açúcar**. Agência Sebrae de Notícias (ASN). Brasília - DF. 2005.
- PANG, G. F.; CAO, Y. Z.; FAN, C. L.; ZHANG, J. J.; LI, X. M.; LI, Z. Y.; JIA, G. Q. Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 534-541, 2003.
- PAULA, J. **Mel do Brasil: as exportações brasileiras do mel no período 2000/2006 e o papel do SEBRAE**. Brasília: SEBRAE, 2008. 98 p.
- PEDROSO, R. C. R. **Desenvolvimento de métodos de análises por CLAE – UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração**. 2007. Dissertação (Mestrado) – programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R. **Produção do mel: doenças e inimigos naturais das abelhas**. 2003. Disponível em: <<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/doencas.htm>>> Acesso em: 19 jun. 2012.
- PERES, G. T. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de resíduos de tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol em mel utilizando técnicas cromatográficas**. 2009. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- PEREZ, L. H.; RESENDE, J. V.; FREITAS, B. B. Mel: câmbio e embargo europeu podem prejudicar exportações em 2006. Secretária de agricultura e abastecimento. Instituto de Economia Agrícola. **Análise e indicadores de agronegócios**, v. 1, n. 4, 2006.

PERUCA, R. D.; BRAIS, C. V.; OLIVEIRA, A. P.; MUSSOLINE, V.; ALVES, J.A.; HORITA, S. F. **Projeto de fortalecimento da apicultura dos agricultores familiares no estado de Mato Grosso do Sul**. 13 p. 2002.

PITTELLA, C. M. **Determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas (*Apis SP*) por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com área de concentração em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

REVISTA RURAL. **Mel, o lado doce de ser orgânico**. São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.revistarural.com.br/edicoes/2008/Artigos/rev128_mel.htm>> Acesso em: 21 abr. 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos de análise. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

ROOT, A. I. **ABC y XYZ de la apicultura**. 8. ed. Buenos Aires: Libreria Hachette, 1973. 670 p.

ROTHENBUHLER, W. C. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F₁ and backcross generations to disease-killed brood. **American Zoologist**, v. 4, p. 111-123, 1964a.

ROTHENBUHLER, W. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees I. Responses of four inbred lines to disease - killed brood. **Animal Behaviour**, v. 12, n. 4, p. 578-584, 1964b.

SALOMÉ, J. A. **Busca de certificação orgânica na para mel na grande Florianópolis**. 2007. Disponível em: <<<http://tecnoapiscacatarinense.blogspot.com.br/2007/06/busca-de-certificação-orgnica-para-mel-na.html>>> Acesso: 16 jun. 2012.

SANTOS, P. N. **Validação de metodologias para determinação de antimicrobianos em pescado por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

SATO, T.; MIYATA, G. The nutraceutical benefit, Part III: Honey. **Nutrition**, v. 16, p. 468-469, 2000.

SCHWEITZER, M. P. Qualidade do mel. **Revista Abeille de France**, 866, janeiro, 2001. Somberton, França. Mensagem Doce, n. 61, maio de 2001.

SEBRAE. **Apicultura**: manual do agente de desenvolvimento rural.Org. Darcet Costa Souza. 2 ed. rev. Brasília: SEBRAE, 2007.

SEBRAE. **Informações de mercado sobre mel e derivados da colmeia**. Sumário Executivo. Série Mercado, 2008.

SEEMANN, P.; NEIRA, M. **Tecnología de la producción apícola**. Valdivia: Universidad Austral de Chile, 1988. 202 p.

SENAI – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. **Manual de Segurança e Qualidade para a Apicultura**. Brasília: [s.n.], 2009. 86p.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the USP Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A.**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHERIDAN, R.; POLICASTRO, B.; THOMAS, S.; RICE, D. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3509-3516, 2008.

SILVA, E. V. C. **Caracterização e pasteurização de méis de abelha *Melipona fasciculata* (Uruçu cinzenta) e *Apis mellifera* (Africanizadas)**. 2006. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

SILVA, F. S. **Revisão das doenças que podem acometer *Appis Mellifera***. 2010. Monografia (graduação em medicina veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2010.

SILVA, K. F. N. L. **Caracterização de méis da região do baixo Jaguaribe – CE**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, Campinas grande, 2005.

SILVA, R. A.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n.1, p.113-120, 2006.

SILVA, S. J. N.; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campina, n. 28, p.46-50, 2008.

SOLOVEVE, T. Y. Determination of adulteration of honey on the basis of characteristics of honeys from single or multiple flower sources. **Apicultural Abstracts**, v. 22, n. 1, p. 52-3, 1971.

SPANO, N.; PANZANELLI, A.; PILO, M.; PIU, P.C.; SCANU, R.; TAPPARO, A., SANNA, G. Development and validation of a modified RP- HPLC method for determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of the strawberry tree honey. **Talanta**, v. 68, p.1390-1395, 2006.

STONOGA, V. I.; FREITAS, R. J. S. Conteúdo de água e açúcares em mel de abelha. **Boletim da CEPPA**, Curitiba, v. 9, n. 1, jan/jun. 1991.

TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 217-225, 2001.

THOMPSON, T. S.; NOOT, D. K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p. 168-176, 2005.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. Análise Quantitativa por cromatografia. **Chemkeys**, 2003.

VERÍSSIMO, M. T. L. **Saiba o que é o HMF**. Apicultura no Brasil, v. 4, n. 24, p. 31, 1988.

VIDAL, J. L. M.; AGUILERA-LUIZ, M. D. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1760-1767, 2009.

VIEIRA, G. H. C. **Análise faunística de abelhas (*Hymenoptera: Apoidea*) e tipificação dos méis produzidos por *Apis mellifera L.*, em área de cerrado do município de Cassilândia/MS**. 2005. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2005.

VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Análises físico-químicas de méis de São Paulo. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 53, p. 17-19, 1999.

WHITE JÚNIOR, J. W. Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural and proline in honey; collaborative study. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 515-526, 1979.

WHITE, J. W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. **Honey a comprehensive survey**. London: Heinemann, cap. 6, p. 207-239, 1975.

WIKIPEDIA. **Santa Luzia do Paruá**. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Luzia_do_Paru%C3%A1>> Acesso em: 31 jul. 2012.

ZAMBERLAN, L.; SANTOS, D. M. O comportamento do consumidor de mel: um estudo exploratório. Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto Uruguai – IDEAU. **Revista de administração e ciência contábeis do IDEAU (RACI)**, v. 5, n. 10, 2010.

ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p. 307-311, 2006.

ANEXO

Quadro A: Revisão de métodos para determinação de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida

Analito	Preparo da amostra	Método	Coluna	Fase Móvel	Rec. (%)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
STZ, SMR, SMZ, SMTZ, SMP, SIX, SDX, SMX, SDM, SQX, SME	Hidrólise ácida com TA (pH 5). SPE – C18 e derivatização com fluorescamina	HPLC-FL	Vertex - C18	TA 0,1 mol L ⁻¹ (pH 4)/ACN gradiente	70 - 120	1-9	CORREIA, 2008
SCT, STZ, SPD, SMR, SMP, SMX e cafeína (PI)	Hidrólise ácida com TA (pH 3,6). SPE – Absolut Nexus	HPLC-UV	Inertsil ODS-3 5 μm	MeOH/TA 0.05 mol L ⁻¹ (pH 3.6), 20:80 (v/v)	80 - 117	-	ZOTOU & VASILIAO, 2006
SDX, SAD, SCT, SDZ, SPD, STZ, SMR, SMZ, SMM, SME, SCP, SGN, SDM e SMT (PI)	Diluição do mel com MEOH e derivatização com fluorescamina	HPLC-FL	Ascentis RP-Amide 5 μm 80 A	TA 0,02 mol L ⁻¹ (pH 4,5)/ACN gradiente	56 - 96	4 - 15	BERNAL et al., 2009
SDM, SMZ, STZ e SPD (PI)	Hidrólise ácida com HCl 2 mol L ⁻¹ , extração com diclorometano e SPE Florisil	HPLC-UV	NOVAPACK C-18 4 μm	Acetato de sódio 0,005 mol L ⁻¹ + MEOH/ACN	61 - 95	19 - 20	GRANJA et al., 2008
STZ, SMZ, SMR, SPD, SDZ, SDX, SDM, SCP	Hidrólise ácida com HCl 1 mol L ⁻¹ e filtração com membrana de nylon	HPLC - MS/MS	Oasis HBL 5 μm	0,1% de AF em H ₂ O/0,1% de AF em ACN / 2% de ATF em ACN	84 - 112	5	THOMPSON & NOOT, 2005

REFERÊNCIAS

Quadro A: Continuação

Analito	Preparo da amostra	Método	Coluna	Fase Móvel	Rec. (%)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
SQX, SCP, SDM e outros antibióticos	Diluição do mel com Na_2EDTA pH 4, centrifugação e SPE OASIS HLB	HPLC - MS/MS	Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm	MeOH/AF 0,05% em H_2O	70 - 120	4	VIDAL et al., 2009
SGN, SAD, SCT, SDZ, STZ, SPD, SMR, SME, SMZ, SMP, SDX, SCP	Hidrólise ácida com HCl 2 mol L^{-1} , extração ACN, centrifugação, SPE Bond Elut SCX e derivatização com fluorescamina	HPLC-FL	Purospher Star RP-18 5 μm	TA 0,02 mol L^{-1} em ACN (98:2)/TA 0,02 mol L^{-1} em ACN (68:32)	37 - 67	2 - 5	MAUDENS et al., 2004
SCT, SPD, SMR, SMP, SME, SMX, SDM, SCP	Diluição com AF pH 2, SPE cartucho de permuta catiônica sulfônico aromático, SPE - Oasis HLB e derivatização	HPLC-FL	Symmetryshiled RP 18	ACN + 0,01 mol L^{-1} KH_2PO_4 (27:73) em pH 3,5 - 4	73 - 94	5 - 10	PANG et al., 2003
STZ, SPD, SMR, SME, SMP, SMR, SCP, SMX, SMM, SAI, SDM, SQX, SDZ, SDX	Hidrólise ácida com HCl 2 mol L^{-1} , pH 8,5 foi ajustado e SPE Oasis/HLB	HPLC - MS/MS	Waters Xterra MS C18 3,5 μm	0,15% de ácido acético/0,15% de ac. acético em MeOH	61 - 78	1,5 - 15	SHERIDAN et al., 2008

REFERÊNCIAS

Quadro B: Revisão de métodos para determinação de sulfonamidas em matrizes diversas utilizando cromatografia líquida

Analito	Amostra	Técnica	Resultados	Referência
STZ, SMZ, SMX	Leite	HPLC-FL	LD foi 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ foi 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para STZ e SMZ e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para SDM. A recuperação 63 – 91%	ALABURDA et al., 2007
SAD, SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMP, SDM, SQN	Águas residuárias de suinocultura	HPLC - UV	Recuperações variaram de 32 – 106%. LQ entre 5 – 7,5 ng L^{-1}	MALITAN & MOHD, 2006
STZ, SMZ, SDM, SQN, SMX	Camarão	HPLC - DAD	Método seletivo e linear na faixa de 100 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. LD e LQ variaram de 0,6 – 6 e 2 – 20 respectivamente	SANTOS, 2009
SMX, TC E TM	Água potável e do arroio Dilúvio de Porto Alegre	HPLC - UV	Recuperações de 40 – 90%, LD 0,3 – 3,6 e LQ 0,9 - 12	PEDROSO, 2007

Quadro C: Classificação da cor do mel

Cor	Escala <i>Pfund</i> (mm)	Faixa de cor (inc.)*
Branco d'água	1 a 8	0,030 ou menos
Extra branco	Mais de 8 a 17	Mais de 0,030 a 0,060
Branco	Mais de 17 a 34	Mais de 0,060 a 0,120
Extra âmbar claro	Mais de 34 a 50	Mais de 0,120 a 0,188
Âmbar claro	Mais de 50 a 85	Mais de 0,188 a 0,440
Âmbar	Mais 85 a 114	Mais de 0,0440 a 0,945
Âmbar escuro	Mais de 114	Mais de 0,0945

* incidência (absorbância em 560 nm)

Quadro D: Tabela de Chataway

Índice de refração a 20 °C	Umidade (%)	Índice de refração a 20 °C	Umidade (%)	Índice de refração a 20 °C	Umidade (%)
1,4740	25,0	1,4845	20,8	1,4945	16,8
1,4745	24,8	1,4850	20,6	1,4950	16,6
1,4750	24,6	1,4855	20,4	1,4955	16,4
1,4755	24,4	1,4860	20,2	1,4960	16,2
1,4760	24,2	1,4865	20,0	1,4965	16,0
1,4765	24,0	1,4870	19,8	1,4970	15,8
1,4770	23,8	1,4875	19,6	1,4975	15,6
1,4775	23,6	1,4880	19,4	1,4980	15,4
1,4780	23,4	1,4885	19,2	1,4985	15,2
1,4785	23,2	1,4890	19,0	1,4990	15,0
1,4790	23,0	1,4895	18,8	1,4995	14,8
1,4795	22,8	1,4900	18,6	1,5000	14,6
1,4800	22,6	1,4905	18,4	1,5005	14,4
1,4805	22,4	1,4910	18,2	1,5010	14,2
1,4810	22,2	1,4915	18,0	1,5015	14,0
1,4815	22,0	1,4920	17,8	1,5020	13,8
1,4820	21,8	1,4925	17,6	1,5025	13,6
1,4825	21,6	1,4930	17,4	1,5030	13,4
1,4830	21,4	1,4935	17,2	1,5035	13,2
1,4840	21,0	1,4940	17,0	1,5041	13,0

Fonte: AOAC, 2000