

Avaliação da presença de resíduos de tetraciclinas em amostras de mel comercializadas no estado da Bahia

Evaluation of presence of residues of tetracyclines in commercialized honey in the state of Bahia, Brazil

Gisele Vivas Tosta Aguiar Monteiro¹, Hilda Costa dos Santos², Renata de Souza Guerreiro³, Fernando Luiz Trindade Rêgo⁴

¹ Farmacêutica; Coordenadora do Laboratório de Físico-Química de Alimentos do SENAI-CETIND; ² Doutora em Química Analítica; Coordenadora do Laboratório de Química Geral e Inorgânica do SENAI – CETIND; ³ Técnica em alimentos; Técnica do Laboratório de Físico-Química de Alimentos do SENAI-CETIND; ⁴ Mestre em Ciências Agrárias; Departamento de Análises Bromatológicas da FFAR/UFBA.

Resumo

O mel é conhecido mundialmente como um produto natural, e sua imagem está diretamente associada à saúde. Entretanto, as colmeias de abelhas melíferas estão sujeitas a doenças, como a Cria Pútridas Americana (CPA) e Europeia (CPE) e a Varroatose. A prevenção dessas doenças é realizada com a aplicação de antibióticos na colmeia durante a primavera; eles podem ainda ser adicionados diretamente às plantas, no período da florada. Esses procedimentos geram um alto risco dos resíduos serem carreados até o mel, e essa presença como contaminantes é causa de preocupação, devido à possibilidade de ocorrência de reações alérgicas ou tóxicas em consumidores e do surgimento de cepas microbianas resistentes a esses medicamentos. Embora o uso de antimicrobianos não seja usual no Brasil, os apicultores necessitam comprovar a segurança e a inocuidade do seu produto junto aos clientes externos, especialmente para os países da União Europeia. Com o objetivo de detectar a presença de resíduos de tetraciclinas no mel comercializado no Estado da Bahia, foram analisadas 13 amostras por meio de radioimunoensaio, utilizando-se o método desenvolvido pela Charm Sciences. Todas as amostras apresentaram resultados negativos para resíduos de Tetraciclina, Oxitetraciclina e Clortetraciclina, com limites de detecção de 15µg Kg-1, 20µg Kg-1 e 10µg Kg-1, respectivamente.

Palavras-chave: tetraciclina, resíduos de - mel - radioimunoensaio; mel - resíduos de tetraciclina - radioimunoensaio.

Abstract

Honey is known worldwide as a natural product and its image is directly linked to health. Meanwhile, the hives of honey bees are subject to diseases such as Creates Putrid American (CPA) and European (CPE) and Varroatosis. The prevention of these diseases is performed by the application of antibiotics in beehive during the spring; they can also be added directly to the plants during the period of bloom. These procedures generate a high risk of waste being taken to the honey and the presence of these contaminants is cause for concern because of the possibility of allergic or toxic reactions in the consumers and the emergence of bacterial strains resistant to these drugs. While the use of antimicrobials is unusual in Brazil, the beekeepers need to prove the safety of its product to customers abroad, especially to EU countries. Aiming to detect the presence of residues of tetracycline in honey sold in the state of Bahia, 13 samples were analyzed by radioimmunoassay, using a method developed by Charm Sciences. All samples showed negative results for residues of Tetracycline, Oxytetracycline and Chlortetracycline, with detection limits of 15µg kg-1, 20µg kg-1 and 10µg kg-1, respectively.

Keywords: Tetracycline residues - Honey - Radioimmunoassay; Honey - Tetracycline residues-Radioimmunoassay.

INTRODUÇÃO

Segundo o *Codex Alimentarius*, mel é o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir

do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia.¹

As abelhas armazenam o mel em favos para que seja utilizado como alimento durante o inverno.² Sua composição inclui constituintes orgânicos e inorgâni-

Recebido em 03 de setembro de 2009; revisado em 28 de maio de 2010.

Correspondência / Correspondence: Gisele Vivas Tosta Aguiar Monteiro. SENAI-CETIND. Setor: MQV - Metrologia Química e Volumétrica. Avenida Luís Tarquínio Pontes, nº 938 - Aracuí. 42700-000. Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. Tel.: (71) 3287-8289 e 9187-0240. E-mail: gisele@cetind.fieb.org.br.

cos, sendo que a glicose e a frutose representam cerca de 75% do total desses constituintes. Os demais constituintes orgânicos podem ser: di/tri/oligosacarídeos, ácidos alifáticos, vitaminas, aminoácidos e proteínas. Dentre os componentes inorgânicos, encontram-se a água, potássio, sódio, cálcio, magnésio, cobre, manganês, ferro, cloreto, enxofre, fósforo e sílica.^{1,2,3,4}

O mel possui ainda substâncias antibacterianas, a exemplo do peróxido de hidrogênio, que se degradam quando o mel é aquecido ou armazenado sob a incidência de luz, e outros componentes que são estáveis ao calor e às condições de armazenamento. A maioria desses compostos originam-se das abelhas, porém alguns deles podem vir do néctar ou do melado.

A atividade antimicrobiana do mel parece ser influenciada pelo tipo. Méis escuros são associados a uma maior atividade antimicrobiana contra alguns patógenos, quando comparados aos méis claros.^{2,5}

O mel é conhecido mundialmente como um produto natural capaz de servir como tratamento contra vários tipos de infecções, queimaduras e feridas, razão da sua imagem está diretamente associada à saúde.⁶ A atividade antibacteriana do mel abrange, inclusive, ação contra cepas bacterianas que são resistentes às drogas comumente utilizadas na medicina. Outras propriedades, incluindo a atividade anti-inflamatória, contribuem para a redução rápida de dor, exudato e edema, e estão diretamente relacionadas à pureza do mel.⁵

Entretanto, as colmeias de abelhas produtoras de mel estão sujeitas a doenças epidêmicas que podem ser causadas por diferentes microorganismos. As mais comuns em todo o mundo são a Cria Pútrida Americana (CPA), causada pelo *Paenibacillus larvae*, a Cria Pútrida Europeia (CPE), causada pelo *Mellisococcus pluton* e a Varroatose, causada pelo ácaro *Varroa Jacobsonii*.^{2,3,7,8} A Cria Pútrida é uma infecção que afeta as larvas da rainha, dos zangões e das operárias, mas não afeta os indivíduos adultos. O *P. larvae* ocorre em duas formas: a vegetativa e a esporulada, que é infecciosa, e os seus esporos são altamente resistentes à dessecação, calor e desinfetantes químicos. Além disso, os esporos podem manter sua virulência por mais de 40 anos em favos e no mel.⁹

A atuação dos apicultores em todo o mundo, diante desse problema, abrange possíveis ações: a prevenção, o tratamento terapêutico e a destruição completa das colmeias afetadas.^{2,3,7}

A prevenção é realizada basicamente por meio do tratamento das colmeias com antibióticos durante a primavera⁸, embora também esteja descrito na literatura o uso de pesticidas. Esse procedimento é adotado em muitos países, especialmente nos Estados Unidos, visando a proteger a saúde das abelhas e manter o nível de produção de mel.^{5,8,10}

Os medicamentos utilizados com maior frequência na prevenção e no tratamento terapêutico dessas doenças são sulfonamidas, aminoglicosídeos, anfencóis e tetraciclina^{2,3,7}, havendo predominância no uso das tetraciclina, devido a seu amplo espectro de ação, facilidade de acesso, flexibilidade no uso e a sua relação entre custo e benefício.^{5,8,11} Dentre as tetraciclina, a mais utilizada é a Oxitetraciclina, que tem sido usada desde o início dos anos 50, nos Estados Unidos, na prevenção e controle da CPA e CPE.⁸

As tetraciclina podem ainda ser adicionadas diretamente às plantas, durante o período da florada, e a contaminação das flores com altas concentrações de antibióticos implica um alto risco de os resíduos serem carregados até o mel.^{7,12}

Resíduos desses medicamentos podem permanecer nos produtos gerados pelas abelhas^{2,10,12}, especialmente o mel, onde podem ser encontradas concentrações de até 1mg Kg⁻¹ de tetraciclina, quando as colônias responsáveis por sua produção forem tratadas com esses medicamentos.⁶

A presença desses resíduos como contaminantes no mel e em outros produtos apícolas são causa de preocupação, devido à possibilidade de reações alérgicas ou tóxicas, sobretudo em pessoas hipersensíveis, e do surgimento de cepas microbianas resistentes a esses medicamentos.^{2,5,8} Já existe registro de cepas de *Paenibacillus sp* resistentes às tetraciclina devido ao seu uso intensivo nos Estados Unidos e na América do Sul.⁶ Além disso, estudos demonstram que o crescimento da resistência microbiana é um evento relativamente novo e está associado à introdução do uso de antibióticos nos meios clínico, veterinário e na agricultura.¹³

Dessa forma, a presença de resíduos de antibióticos no mel tem sido relatada em publicações científicas como um problema de ordem mundial há muitos anos⁶, e demonstra que o uso desses medicamentos na apicultura não está sendo bem controlado e (ou) monitorado.¹⁴

Em resposta a esse problema, a maior parte das autoridades em saúde insiste na ausência de resíduos de antibióticos nos alimentos, e muitos países estão exigindo que o mel, ao ser importado, seja certificado como livre de antibióticos.¹⁵ O uso de antibióticos na apicultura não é permitido no Japão¹⁶ e na Europa⁶, e é desaconselhado em muitos outros países.

No Brasil, a maioria dos apicultores utiliza as chamadas "abelhas africanizadas", que são polihíbridos resultantes de cruzamentos entre as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata*, anteriormente denominadas *Apis mellifera adansonii*, com as diversas subespécies de abelhas europeias existentes no Brasil e no continente americano, tais como *Apis mellifera mellifera* (abelha real, alemã, comum ou negra), *Apis mellifera ligustica* (abelha italiana), *Apis mellifera*

caucasica (originária da Rússia) e *Apis mellifera carnica* (originária da Áustria). Essas abelhas são altamente resistentes às doenças acima descritas, o que torna desnecessário o uso de antibióticos para tratamento pelos apicultores brasileiros. Tudo isso confere ao mel brasileiro um alto valor agregado, devido à inexistência de resíduos de contaminantes.¹⁷

De qualquer forma, países exportadores, como o Brasil, necessitam comprovar a segurança e a inocuidade do seu produto e, por isso, diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos e validados em todo o mundo visando à triagem das amostras (*screening*), ou seja, a determinação qualitativa do composto e a confirmação da presença desses resíduos no mel, associada à sua quantificação. A determinação das tetraciclinas pode ser realizada por meio de diversos métodos analíticos, incluindo ensaios microbiológicos, imunoenaios enzimáticos (ELISA), radioimunoensaios, espectrofotometria, fluorimetria, detecção eletroquímica, eletroforese capilar, polarografia, voltametria absorptiva, Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida (CL) ou Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE), acopladas a detectores espectrofotométricos na faixa do ultravioleta (UV), detectores de fluorescência, quimiluminescência ou espectrômetros de massas. Entretanto, os métodos utilizados com maior frequência são ELISA e Radioimunoensaio, para a triagem das amostras, e os métodos cromatográficos acoplados ao espectrômetro de massas, para a confirmação da presença de tetraciclinas nas amostras que apresentarem resultados positivos na triagem.

3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,18,19

MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliada a presença de três antibióticos da família das tetraciclinas: Oxitetraciclina (OTC), Tetraciclina (TC) e Clortetraciclina (CTC). O método utilizado para a detecção dessas substâncias foi o radioimunoensaio, cujo princípio consiste na concorrência entre a droga que possa estar presente na amostra e a droga marcada com Trítio (H3), denominada *binder*, pela ligação a uma proteína que possui receptor específico para as tetraciclinas (*tracer*). Em seguida, é feita a determinação de complexo *binder/tracer* por luminescência. Quanto menor for a quantidade de resíduos de tetraciclinas contida na amostra, maior será o número de ligações entre o *binder* e o *tracer*, e o resultado da contagem será alto; por outro lado, se a amostra contiver concentrações detectáveis desses resíduos, haverá competição entre a droga presente na amostra e o *binder*, e a quantidade de complexos *binder/tracer* formada será menor. Dessa forma, a partir de um determinado ponto de controle, os resultados das amostras podem ser classificados pela ausência ou presença de resíduos de tetraciclinas. Os limites de detecção do método, indicados pelo fabricante, são de 15µg Kg⁻¹ para a TC, 20µg Kg⁻¹ para a OTC e 10µg Kg⁻¹ para a CTC.²⁰

Para a realização deste experimento, utilizou-se um kit para detecção de tetraciclinas em mel (Charm Sciences, EUA), com os seguintes itens:

- Honey Negative Control (HNC) – Controle Negativo – Liofilizado de uma amostra conhecidamente negativa para tetraciclinas.
- Multi-Antimicrobial Concentrate Standard (MSUMA) – Padrão contendo 4000ppb de clortetraciclina, utilizado no preparo do controle positivo e adições de padrão.
- *Tablets* – O *Tracer* e o *Binder*, em forma de pastilhas, e outras duas substâncias utilizadas no tratamento das amostras, não-especificadas pelo fabricante, também em forma de pastilhas.

O HNC e o MSUMA foram diluídos e conservados conforme orientação do fabricante.

Além dos itens apresentados acima, foi utilizado o fluido de cintilação Optifluor (Perkin Elmer, EUA), Micropipetas de volume variável Transferpette de 1000 µL e 5000 µL (Brand, Alemanha), Centrífuga para tubos Centra CL2 (Thermo IEC, EUA), Bloco Digestor Inctronic 2 (Charm Sciences, EUA) e o analisador de luminescência Charm II (Charm Sciences, EUA). A agitação das amostras, em todas as etapas do ensaio, foi realizada utilizando-se um agitador do tipo vortex Maxmix II (Thermolyne, USA), e a água utilizada foi obtida a partir de um deionizador (Permutation, Brasil). Foram utilizados ainda tubos de ensaio de 13x100mm, com tampa, e tubos de centrífuga em polipropileno, com tampa rosqueada e capacidade para 50mL.

Foram analisadas 13 amostras aleatórias de méis adquiridas em supermercados nas cidades de Salvador e Lauro de Freitas e junto a cooperativas de apicultores na Bahia. Essas amostras foram envasadas por empresas cadastradas no Serviço de Inspeção Federal (SIF) ou no Serviço de Inspeção Estadual (SIE), à exceção da amostra A10. O Quadro 1 descreve as características de cada amostra analisada, resumindo as informações contidas em seus rótulos.

Para fins de monitoramento do desempenho dos reagentes e do analisador, foram analisados controles positivo e negativo e uma amostra com adição de padrão equivalente a 20µg Kg⁻¹ de OTC.

A determinação da faixa de aceitação do controle negativo foi realizada mediante a análise de 6 replicatas do HNC e do cálculo da média das contagens obtidas. O valor da contagem do controle negativo foi considerado como aceito quando se encontrou dentro da faixa de ± 20% sobre o valor da média dos controles negativos.

Para a determinação do ponto de controle, subtraiu-se 25% do valor da média dos controles negativos apresentada acima.

Para a determinação da faixa de aceitação do controle positivo, foram analisadas 03 replicatas do controle positivo, preparado a partir do MSUMA, e foi calculada a média das contagens. A leitura do controle positivo foi considerada aceita quando apresentou valores iguais ou menores que essa média.

Quadro 1 – Características das amostras analisadas

| Amostra | Origem | Florada predominante | Lote | Data da colheita | Serviço de Inspeção |
|---------|--------------------------|----------------------|----------|------------------|---------------------|
| A1 | Salvador, Bahia | Silvestre | 046 | 01/03/2007 | SIF |
| A2 | Feira de Santana, Bahia | Silvestre | NI | 13/11/2006 | SIE |
| A3 | Feira de Santana, Bahia | Silvestre | NI | 16/08/2007 | SIE |
| A4 | Fortaleza, Ceará | Marmeleiro | 10013706 | 09/10/2006 | SIF |
| A5 | São Paulo, São Paulo | NI | 27 | 10/07/2007 | SIF |
| A6 | Bebedouro, São Paulo | NI | 08022 | 17/08/2007 | SIF |
| A7 | Bebedouro, São Paulo | NI | 10004 | 04/10/2006 | SIF |
| A8 | São Felipe, Bahia | Silvestre | NI | 25/02/2007 | SIE |
| A9 | Ribeira do Pombal, Bahia | Catinga de Cheiro | NI | 08/01/2007 | SIF |
| A10 | Tucano, Bahia | Ervanço e Batônica | NI | 10/2006 | Nenhum |
| A11 | Embu-Guaçu, São Paulo | Laranjeira | 202 | NI | SIF |
| A12 | Embu-Guaçu, São Paulo | Silvestre | 203 | NI | SIF |
| A13 | Embu-Guaçu, São Paulo | Eucalipto | 194 | NI | SIF |

Nota: NI = Não-informado

Para a realização os ensaios, executou-se o método desenvolvido pelo fabricante, conforme descrito a seguir.

Foram pesados cerca de 5g de cada amostra em tubos de centrífuga, aos quais foram adicionados 20mL de água deionizada. Os tubos foram agitados até completa dissolução das amostras, e essa solução diluída foi reservada para o uso durante o ensaio.

Transferiu-se a pastilha verde, que continha o *binder*, para um tubo de ensaio, adicionou-se 300µL±15µL de água deionizada e homogeneizou-se o conteúdo do tubo por 10 segundos, visando à desintegração completa da pastilha. Ao mesmo tubo foram adicionados 5,00mL da amostra diluída e novamente precedeu-se à homogeneização por cerca de 10 segundos. O tubo foi então levado ao bloco digestor para incubação por 15 minutos, a uma temperatura de 45 °C± 2 °C.

Após o período de incubação, os tubos foram retirados do bloco e adicionou-se a pastilha laranja, que continha o *tracer*. Procedeu-se à homogeneização do seu conteúdo que foi incubado por mais 5 minutos, à temperatura indicada acima. Após esse período, foi adicionada a pastilha preta, e a solução foi novamente homogeneizada por cerca de 10 segundos.

As amostras foram centrifugadas a 4000rpm por 5 minutos e, nesse intervalo de tempo, adicionou-se a pastilha branca em um novo tubo de ensaio, acrescentando-se também 300µL±15µL de água, e foi realizada a dispersão da pastilha na água, por agitação.

Ao final do período de centrifugação, os tubos que continham as amostras foram retirados rapidamente da centrífuga, e o sobrenadante de cada um deles foi transferido para o novo tubo, que continha a pastilha branca. O conteúdo do novo tubo de ensaio foi então homogeneizado por cerca de 10 segundos e posteriormente incubado por 5 minutos, na faixa de temperatura acima indicada.

Por fim, as amostras foram centrifugadas mais uma vez a 4000rpm, por 10 minutos. Ao final do período de

centrifugação, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 300µL±15µL de água ao tubo, e homogeneizou-se o conteúdo por 10 segundos, de forma a desintegrar todo o resíduo do centrifugado. Foram adicionados cerca de 3,00mL do líquido de cintilação, e os tubos foram tampados e agitados por 10 segundos. A contagem foi efetuada durante 60 segundos no canal do trítio, utilizando-se o analisador de luminescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A faixa de aceitação encontrada para o controle negativo foi de 1524 a 2286cpm, a média do controle positivo foi de 1071cpm e o ponto de controle foi 1287cpm.

Os resultados encontrados para as amostras analisadas se são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Resultados

| Amostra | Resultado |
|-------------------------|-----------|
| Controle Positivo | Presença |
| Controle Negativo | Ausência |
| A1 | Ausência |
| A2 | Ausência |
| A3 | Ausência |
| A4 | Ausência |
| A5 | Ausência |
| Controle Positivo | Presença |
| Controle Negativo | Ausência |
| A6 | Ausência |
| A6 com adição de padrão | Presença |
| A7 | Ausência |
| A8 | Ausência |
| A9 | Ausência |
| A10 | Ausência |
| Controle Positivo | Presença |
| Controle Negativo | Ausência |
| A11 | Ausência |
| A12 | Ausência |
| A13 | Ausência |

Quadro 3 – Informações sobre os estudos descritos na literatura

| País de origem das amostras | Amostras analisadas | Método utilizado | LDM (($\mu\text{g Kg}^{-1}$)) |
|-----------------------------|---------------------|--|---------------------------------|
| China | 08 | CLAE com detecção por UV | 5-12 |
| Espanha | 11 | CLAE com detecção por UV e CLAE com detecção por Espectrometria de massas (MS) | 0,02-2,50 |
| Itália, Espanha | 07 | Eletoforese com detecção por UV | 23,9-41,7 |
| Japão | 57 | CLAE com detecção por Fluorescência | 0,005-0,009 |
| Portugal, Espanha | 57 | CLAE com detecção por Fluorescência | 20 (OTC) e 21(TC) |

De acordo com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) para o ano de 2008, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o limite máximo de resíduos (LMR's) permitido para essas substâncias é de $25\mu\text{g Kg}^{-1}$ para o mel²¹. Dessa forma, os resultados apresentados indicam a conformidade de todas as amostras analisadas neste experimento junto ao PNCRC 2008.

No ano de 2007, o PNCRC analisou 09 amostras de mel, coletadas pelo MAPA em estabelecimentos de todo o país que possuem cadastro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), e nenhuma violação aos limites estabelecidos foi detectada²². Esses resultados, associados àqueles encontrados neste trabalho, reforçam o valor que o mel brasileiro possui, pela sua pureza comprovada pela ausência de resíduos de medicamentos antibióticos da família das tetraciclina em todas as amostras analisadas.

Considerando-se os Limites de Detecção dos Métodos (LDM's), resultados semelhantes aos aqui descritos estão disponíveis na literatura para países como a China⁷, Espanha^{6,10}, Japão¹⁵, Itália^{11,10} e Portugal⁸. No Quadro 3, estão listadas algumas informações sobre esses estudos.

Por outro lado, existem estudos realizados na Grécia⁵, nos Estados Unidos¹⁴, na Suíça⁹ e na própria China¹² que justificam a preocupação mundial com o problema da existência de resíduos de tetraciclina no mel. Os percentuais de amostras positivas nesses estudos variaram entre 29 e 60%. Esses resultados foram obtidos utilizando-se métodos e LDM's compatíveis aos utilizados nos estudos acima apresentados.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados anteriormente indicam que o mel brasileiro está realmente isento de resíduos de medicamentos antibióticos da família das tetraciclina, considerando-se os Limites de Detecção dos Métodos aplicados, que são compatíveis com os LMRs estabelecidos pelo MAPA no PNCRC. É importante ressaltar que esses resultados já eram esperados, uma vez que os apicultores brasileiros não têm a necessidade e, portanto, o hábito, de fazer uso desses medicamentos em suas colmeias. Trabalhos como este podem servir

de embasamento em discussões técnicas no âmbito do comércio exterior, pois reforçam os resultados do PNCRC e agregam confiabilidade a esse plano de monitoramento.

Outros estudos devem ser realizados visando à avaliação da presença de resíduos das demais famílias de medicamentos antimicrobianos, bem como dos resíduos de pesticidas e contaminantes inorgânicos no mel.

AGRADECIMENTOS

Ao SENAI-CETIND, pela excelente estrutura disponibilizada e pelo apoio de toda a equipe.

REFERÊNCIAS

- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex standard for honey** - Codex Stan 12-1981. Rome: FAO, 2001. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/310/cxs_012e.pdf> Acesso em: 2 dez. 2008.
- SOLOMON, R.D.J.; SHANTI, V.S.; JAYARAJ, V. Prevalence of antibiotics in nectar and honey in South Tamilnadu, India. **Integr. Biosci.**, Melbourne, v.10, n.3, p.163-167, 2006.
- HUQ, S.; GARRIQUES, M.; KALLURY, K.M.R. Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean up of tetracycline and oxytetracycline from honey. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1135, n.1, p.12-18, Nov. 2006.
- VIÑAS, P. et al. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1022, p.125-129, 2004.
- SRIDAKI-PAPAKONSTADINO, M. et al. Determination of tetracycline residues in greek honey. **Trakia Journal of Sciences**, Stara Zagora, v.4, n.1, p.33-36, 2006.
- REYBROECK, W. et al. Validation of the tetrasensor honey test kit for the screening of tetracyclines in honey. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, DC, v.55, n.21, p.8359-8366, 2007.
- LI, J. et al. Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. **Talanta**, Amsterdam, v.75, p.1245-1252, 2008.
- PENA, A. et al. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, DC, v.53, n.10, p.3784-3788, 2005.
- HAMMEL, Y. et al. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1177, p.58-76, 2008.

10. CARRASCO-PANCORBO, A. et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1195, p.107-116, 2008.
11. CASADO-TERRONES, S. et al. Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection. **Electrophoresis**, Weinheim, v.28, p.2882-2887, 2007.
12. WAN, G. et al. Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with potassium permanganate-sodium sulfite- α -cyclodextrin chemiluminescence detection. **J.Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, v.824, p.57-64, 2005.
13. NAVARRO, N.P. et al. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues, application to honey samples. **Analytica Chimica Acta**, New York, v.594, p.211-218, 2007.
14. SALTER, R. Charm II system: comprehensive residue analysis system for honey. **Apiacta**, Bucharest, v.38, p.198-206, 2003.
15. HALVATZIS, S.A.; TIMOTHEOU-POTAMIA, M.M.; CALOKERINOS, A.C. Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with n-bromosuccinimide. **Analyst**, London, v.118, p.633-637, 1993.
16. FUJITA, K. et al. Analysis of trace residues of tetracyclines in dark-colored honeys by high-performance liquid chromatography using polymeric cartridge and metal chelate affinity chromatography. **Food Hyg. Safety Sci.**, Tokyo, v.49, n.3, p.196-203, 2008.
17. PAULA FILHO, J.F. de. **Mel do Brasil**: as exportações brasileiras de mel no período 2000/2006 e a contribuição do SEBRAE. 2007. 66f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Curso de Pós-graduação Lato Sensu a Distância, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, 2007. Disponível em: <www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/tcc_juarez.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2008.
18. LEGG, D.R. et al. ROSA (Rapid One Step Assay) for antibiotics in honey. **Apiacta**, Bucharest, v.38, p.207-217, 2003.
19. ALFREDSSON, G.; BRANZELL, C.; GRANELLI, K.; LUNDSTRÖM, Å. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by dipstick test and LC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, New York, v.529, p.47-51, 2005.
20. CHARM SCIENCES. **Charm II tetracycline test for honey**. Lawrence, MA, 2006.21 BRASIL. Instrução Normativa nº 10, de 14 de abril de 2008. Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2008, em conformidade com o disposto no art. 6º, da Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, no Processo nº 21000.001138/2008-61 e no anexo da presente Instrução Normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 abr. 2008. Seção 1, p.29.
22. BRASIL. Instrução Normativa Nº 9, de 10 de abril de 2008. Publica os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2007, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 abr. 2008. Seção 1, p.28.