



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Patricia Brugnerotto

**Alcaloides pirrolizidínicos em plantas, méis florais e de melato de  
bracatinga (*Mimosa scabrella*)**

Florianópolis

2022

Patricia Brugnerotto

**Alcaloides pirrolizidínicos em plantas, méis florais e de melato de  
bracatinga (*Mimosa scabrella*)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências dos Alimentos da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção do  
título de doutora em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de  
Oliveira Costa

Coorientador: José Bernal del Nozal  
(Universidad de Valladolid, Espanha)

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Brugnerotto, Patricia  
Alcaloides pirrolizidínicos em plantas, méis florais e  
de melato de bracatinga (Mimosa scabrella) / Patricia  
Brugnerotto ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira  
Costa, coorientadora, Jose Bernal Del Nozal, 2022.  
188 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Alcaloides  
pirrolizidínicos. 3. Mel floral. 4. Mel de melato. 5. Flora  
apícola. I. Costa, Ana Carolina de Oliveira . II. Del  
Nozal, Jose Bernal . III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. IV. Título.

Patricia Brugnerotto

**Alcaloides pirrolizidínicos em plantas, méis florais e de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella*)**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Dr.  
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Profa. Maique Weber Biavatti, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profa. Isabela Maia Toaldo, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final do trabalho** de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Ciências dos Alimentos obtido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

---

Profª. Itaciara Larroza Nunes, Dra.

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos

---

Profª. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2022

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Aldecir e Nilva, por todo suporte, dedicação e amor incondicional. Ao meu companheiro Bernardo, pela paciência em me ouvir, pelas inúmeras palavras de apoio e incentivo, por todos os momentos compartilhados e superados durante esta etapa.

A minha orientadora, professora Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa, por todos os momentos convividos, pela amizade, confiança e ensinamentos desde o meu mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Química de Alimentos, pela parceria, ensinamentos e momentos de descontração. Ao Luciano Gonzaga, pela paciência, prontidão e dedicação para ensinar. A professora Dra. Roseane Fett, pelas contribuições, sugestões e positividade. A Siluana K. T. Seraglio, pelas contribuições, apoio e momentos compartilhados de frustrações, otimismo e conquistas. A Mayara Schulz, minha amiga e colega, pela parceria, por compartilhar tantos ensinamentos, momentos de desabafos e diversão.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (Epagri/Ciram), em especial aos Drs. Denilson Dortzbach e Éverton Blainski por aceitarem em apoiar esse trabalho realizando todas as coletas de méis florais e plantas, além de diversas outras informações, todas indispensáveis para a realização desse trabalho. Aos apicultores do estado de Santa Catarina e Paraná pela doação das amostras de mel de melato de bracinga.

Ao Professor Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg por aceitar com tamanha dedicação e paciência, identificar as plantas e transmitir seu conhecimento durante esse trabalho. A Dra. Cynthia Fernandes Pinto da Luz pela disponibilidade em colaborar, realizar as análises de melissopalínologia e contribuir com todo seu conhecimento nesta temática.

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Seção Laboratorial Avançada de São José (SLAV/SC), em especial ao Rodrigo Barcellos Hoff e Heitor Daguer, por disponibilizar toda estrutura e material necessário para as análises de alcaloides pirrolizidínicos, pelo suporte e ensinamentos durante minha permanência na SLAV/SC. A Carolina Turnes Pasini Deolindo e ao Luan Valdemiro Alves de Oliveira, por cederem seu tempo, me auxiliarem em todos os momentos que precisei na SLAV/SC e por todos os ensinamentos compartilhados.

Ao Professor José Bernal del Nozal por sua supervisão, dedicação e enriquecedora experiência proporcionada durante meu doutorado sandúiche no grupo TESEA em Valladolid, Espanha. A Ana Maria Ares Sacristián e Adrián de La Fuente Ballesteros pela dedicação em me acompanharem nas atividades de pesquisa e todos os momentos memoráveis, dentro e fora do laboratório na Espanha.

Aos membros da banca de defesa da tese pelas valiosas contribuições. À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos pela estrutura e suporte ao meu conhecimento e desenvolvimento desse trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, 88887.178578/2018-00) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 203335/2020-1) pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram e acompanharam, de longe ou de perto, minha trajetória, muito obrigada!

## RESUMO

Os alcaloides pirrolizidínicos (AP) são metabólitos secundários de ocorrência natural em alguns gêneros de plantas, correspondentes a algumas tribos de espécies pertencentes majoritariamente às famílias Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae. A ingestão de alimentos com altos níveis de AP não é desejável, uma vez que, essa classe de alcaloides possui potencialidade tóxica. Atualmente, existe a demanda por estudos que avaliem um conjunto de informações relacionado à origem botânica dos méis e à presença de AP nos méis e plantas com potencial apícola que estejam próximas de colmeias. Adicionalmente, avaliar a relação entre a origem botânica e a presença de AP em méis que não provém majoritariamente de néctar, como os méis de melato, também pode resultar em benefícios ao setor apícola e aos consumidores que estejam em busca de alimentos naturais e seguros para consumo. Essa avaliação pode auxiliar no adequado manejo das colmeias e conseqüentemente na diminuição ou ausência da presença de AP em méis. Diante do exposto, este trabalho (a) realizou a caracterização físico-química de méis florais provenientes de colmeias monitoradas no estado de Santa Catarina (*Apis Online/Epagri-Ciram*) e a identificação botânica de plantas com potencial apícola coletadas próximas das colmeias; (b) analisou AP por LC-MS/MS em méis florais e em inflorescências de espécies das famílias Fabaceae e Asteraceae que estavam próximas das colmeias; (c) realizou melissopalínologia para verificar a influência das floradas nos teores de AP nos méis; e analisou AP em méis de melato de bracinga (*Mimosa scabrella*) (MMB). Os resultados físico-químicos indicaram que o manejo das colmeias e as condições higiênico-sanitárias durante a coleta e transporte dos méis foram adequados, apesar de algumas amostras não estarem em conformidade com as legislações vigentes para umidade ( $\leq 20\%$ ), acidez livre ( $\leq 50 \text{ mEq kg}^{-1}$ ) e condutividade elétrica ( $\leq 0,8 \text{ mS cm}^{-1}$ ). A diversidade de plantas identificadas ( $n=157$ ) foi representada por 81 espécies e 68 gêneros em 33 famílias, sendo Asteraceae e Fabaceae predominantes. As mesmas famílias apresentaram predominância de espécies nas regiões de Caçador e São Joaquim. Após verificar que duas regiões (Caçador e São Joaquim) apresentaram as maiores somas de AP nos méis, estas foram selecionadas para análise de AP em plantas Asteraceae e Fabaceae e melissopalínologia nos méis. Mesmo sendo detectados AP em ambas matrizes (méis e plantas), não foi possível identificar com clareza uma relação entre os resultados de melissopalínologia e os AP encontrados nos méis e nas plantas (Asteraceae e Fabaceae). No entanto, foi possível sugerir que todas as plantas das famílias Asteraceae e Fabaceae analisadas contribuíram para a presença dos AP nos méis, uma vez que em todas as amostras avaliadas foi detectado AP, além de serem identificadas pólenes destas famílias nos

méis. Em relação aos AP em MMB, majoritariamente do estado de Santa Catarina, intermedina+licopsamina e senecionina foram detectados em todas as amostras de três diferentes anos de produção, sendo que aproximadamente 74% das amostras de MMB apresentaram somas inferiores a 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A ingestão diária calculada também ficou abaixo da recomendação de ingestão diária de AP em alimentos ( $< 0,0237 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia) e o consumo do MMB sem potencial risco de intoxicação aguda pode variar entre de 1,5 a 24,6 g de mel/dia. Os MMB avaliados também foram caracterizados como de baixo risco ou não preocupante a exposição humana a longo prazo, uma vez que valores de margem de exposição foram  $\geq 10.000$ . Nesse sentido, ainda que provavelmente a *Mimosa scabrella* seja responsável pelos elevados níveis de AP nos MMB, sua presença neste tipo de mel ainda requer atenção e aprofundamento em estudos futuros.

**Palavras-chave:** Alcaloides pirrolizidínicos; mel floral; mel de melato; Flora apícola; segurança alimentar.

## ABSTRACT

The pyrrolizidine alkaloids (PA) are secondary metabolites that occur naturally in some plant genera, corresponding to some tribes of species belonging mostly to the Asteraceae, Fabaceae, and Boraginaceae families. The ingestion of foods with high levels of PA is not desirable, since this alkaloids class has toxic potential. Currently, there is a demand for studies that evaluate a set of information related to the botanical origin of the honey and the PA presence in honey and plants with beekeeping potential that are close to beehives. Additionally, evaluating the relationship between botanical origin and the presence of PA in honey that does not come mainly from nectar, such as honeydew honey, can also produce benefits for the beekeeping sector and for consumers who are looking for natural and safe foods for consumption. This evaluation can assist in the proper beehive management and, consequently, in the honey PA reduction or absence. In this context, this work (a) carried out the physicochemical characterization of floral honey from monitored beehives in the state of Santa Catarina (Apis On-line/Epagri-Ciram) and the botanical identification of plants with beekeeping potential, which were collected close to the beehives; (b) evaluated by LC-MS/MS the presence of PA in floral honey and in inflorescences of species from Fabaceae and Asteraceae families that were close to the beehives; (c) performed melissopalynology to verify the influence of flowering on PA levels in honey; and evaluated the presence of PA in bracatinga (*Mimosa scabrella*) honeydew honey (BHH). The physicochemical results indicated that the management of the beehives and the hygienic-sanitary conditions during the samples collection and transport were adequate, although some samples do not comply with current legislation for moisture ( $\leq 20\%$ ), free acidity ( $\leq 50 \text{ mEq kg}^{-1}$ ), electrical conductivity ( $\leq 0.8 \text{ mS cm}^{-1}$ ) and sucrose ( $\leq 5\%$ ). The potassium and calcium minerals were the majority in all samples ( $n=13$ ). The diversity of plants identified ( $n=157$ ) was represented by 81 species and 68 genera in 33 families, with Asteraceae and Fabaceae being predominant. The same families were the predominant species in Caçador and São Joaquim regions. After verifying that two regions (Caçador and São Joaquim) had the highest amounts of PA in honey, they were selected for PA analysis in Asteraceae and Fabaceae plants and melissopalynology in honeys. Even though PA was detected in both matrices (honey and plants), it was not possible to identify the relationship between the results of melissopalynology and the PA found in honey and plants (Asteraceae and Fabaceae). However, it was possible to suggest that all analyzed plants of the Asteraceae and Fabaceae families contributed to the presence of PA in the samples since, in all evaluated samples, the presence of PA was detected, in addition to the identification of pollens of these families in the honey

samples. To detect the presence of PA in BHH, samples from different regions, mostly from the Santa Catarina state, were evaluated by LC-MS/MS. The PA intermedine+lycopsamine and senecionine were detected in all samples from three different seasons, and approximately 74% of the BHH samples presented sums  $< 500 \mu\text{g kg}^{-1}$ . The calculated daily intake was also below the recommended daily intake of AP in foods ( $< 0.0237 \mu\text{g kg}^{-1}$  of body weight per day) and the consumption of BHH without the potential risk of acute intoxication can vary between 1.5 and 24.6 g of honey/day. The evaluated BHH were also characterized as low risk or not of concern for long-term human exposure since exposure margin values were  $\geq 10,000$ . In this sense, although *Mimosa scabrella* is probably responsible for the high PA levels in BHH, its presence in this type of honey still requires attention and further research.

**Keywords:** Pyrrolizidine alkaloids; floral honey; honeydew honey; beekeeping flora; food safety.

## PREFÁCIO

Os méis são uma matriz complexa devido à sua composição química variada. Assim como as abelhas *Apis mellifera* coletam néctar, pólen, exsudatos e/ou secreções de plantas com objetivo de transportarem nutrientes para as operarias da colmeia, estas também carregam compostos indesejáveis como os alcaloides pirrolizidínicos (AP). Essas substâncias são um grupo de toxinas naturais produzidas exclusivamente por plantas. A maioria das espécies conhecidas que contém AP pertencem aos gêneros *Senecio* e *Eupatorium* (Asteraceae, tribos Senecioneae e Eupatorieae, respectivamente), *Heliotropium* (Boraginaceae, tribos Boragineae, Echiochileae, Lithospermeae e Cynoglosseae), *Crotalaria* (Fabaceae, tribo Crotalarieae) e alguns gêneros da família Orchidaceae como a *Phalaenopsis*. Os AP (base livre ou N-óxidos) são derivados de aminoácidos, possuem propriedades básicas, caráter lipofílico e são solúveis em solventes orgânicos apolares e álcool. Essa classe de alcaloides é cientificamente conhecida por sua potencialidade tóxica que, mesmo dependendo de uma bioativação metabólica, principalmente no fígado, produz metabólitos tóxicos. Estes são reativos e podem se ligar com proteínas e ácidos nucleicos, gerando adutos de DNA e proteínas, os quais resultam em danos ao DNA, mutações genéticas e mutações cromossômicas. Devido à sua origem e o potencial risco que os AP representam, sua investigação em méis e plantas com potencial apícola, não deve ser negligenciada.

O avanço nas pesquisas de méis (florais e de melato) pode ser atribuído às demandas geradas pelo setor apícola e a importância econômica deste produto para o agronegócio, mas também por características de um produto de alta qualidade e seguro para consumo. O Núcleo de Pesquisas Avançadas em Produtos da Colmeia (NUPAC) da Universidade Federal de Santa Catarina tem notória e consolidada experiência na investigação de diferentes classes de compostos em méis florais e de melato e é pioneiro em estudos de caracterização química e potencial biológico de mel de melato de bracinga da região Sul do Brasil, particularmente do Estado de Santa Catarina. Além disso, O NUPAC também atua em colaboração com outras entidades, tais como, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri)/Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (Ciram), Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina (FAASC) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que contribuem com essa temática. No entanto, apesar das pesquisas terem avançado nos últimos anos, ainda existem lacunas a serem preenchidas para os diferentes méis produzidos majoritariamente no Estado de

Santa Catarina, incluindo a investigação de AP, um tema de grande relevância para o setor apícola e à comunidade científica.

O clima e relevo da região Sul do Brasil, em particular do Estado de Santa Catarina, favorece a produção de méis de diferentes origens botânicas durante todo o ano. Muitas plantas, particularmente aquelas com potencial produção de AP, estão naturalmente presentes em regiões próximas de apiários. Diante do exposto, este estudo propôs ampliar o conhecimento dos AP nos méis florais do Estado de Santa Catarina, bem como, trazer dados inéditos dessa classe de compostos em espécies de plantas próximas de colmeias e em méis de melato de bracatinga. Para este efeito, uma colaboração conquistada e essencial para o início do desenvolvimento do trabalho foi com a Epagri/Ciram, que realizou a coleta de amostras para os experimentos de caracterização das amostras de méis florais, provenientes de colmeias monitoradas pela plataforma *Apis online* no Estado de Santa Catarina, e de plantas com flores próximas das colmeias. Pela primeira vez, um sistema de monitoramento digital apícola do Brasil e produtos provenientes deste ou de seu entorno estavam sendo utilizados. Mesmo após verificar que a maioria dos méis atenderam aos parâmetros de identidade e qualidade da legislação, ainda existia uma demanda pelo entendimento da contribuição do néctar e/ou pólen das plantas nos méis, bem como, a relação de espécies que podem transferir substâncias químicas indesejadas – como os AP – da planta à colmeia. Para atender a este propósito, este estudo apresenta a investigação de AP nos méis florais das colmeias monitoradas e em diversas plantas coletadas próximas das colmeias, bem como, uma caracterização das possíveis fontes botânicas visitadas pelas abelhas, a fim de identificar espécies de plantas com maior potencial de transferir ao AP para o produto final. Para este estudo, colaborações com o MAPA/Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo e com o departamento de botânica da UFSC, foram imprescindíveis. A compreensão dessas características contribui para futuros mapeamentos de espécies que podem representar maior ameaça para altos níveis de AP nos méis florais, e para o setor apícola e comunidade científica que, junto aos apicultores, poderão elaborar estratégias de manejo adequadas a atenderem as recomendações de órgãos legisladores, quando estas passarem a ser exigidas.

Além da produção de méis florais, a cada dois anos e em períodos com pequena oferta de néctar e pólen (janeiro-maio) na região Sul do Brasil, também ocorre a produção de um mel proveniente do exsudato de insetos sugadores da planta bracatinga (*Mimosa scabrella*), conhecido como mel de melato de bracatinga. Este produto, mesmo sendo genuinamente brasileiro, possui ampla notoriedade e valorização no mercado estadunidense e europeu,

responsáveis pela importação de quase que a totalidade da produção. Devido as suas características únicas, que os diferencia de outros tipos de méis, em 2021 recebeu o selo de Indicação Geográfica (modalidade Denominação de Origem) pelo Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, promovendo ainda mais notoriedade a este tipo de mel, consolidando o mercado e oportunizando a abertura de novos negócios. Considerando a notoriedade que o mel de melato de bracatinga vem recebendo desde as primeiras pesquisas pelo NUPAC e, por ser majoritariamente proveniente de uma Fabaceae (*Mimosa scabrella*), a qual tem potencial de produzir AP, também surgiu a demanda por investigar essa classe de compostos nesta matriz. O primeiro passo investigativo foi importante para confirmar a hipótese levantada, mas também demonstrou a necessidade de futuros estudos que possam trazer resultados mais conclusivos.

A demanda por estudos de contaminantes químicos, como os agrotóxicos, em méis florais do Brasil eram escassas e inexistentes para mel de melato de bracatinga. Portanto, a partir de um projeto submetido e aprovado para uma bolsa de doutorado sanduíche (CNPq, 203335/2020-1) foi possível realizar um estudo de otimização de preparo de amostra e validação de método por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas entre janeiro e junho de 2022 junto ao Grupo de Técnicas de Separação e Análise Aplicada, na Universidade de Valladolid, Espanha, sob supervisão do professor Dr. José Bernal del Nozal.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1.1** Representação da estrutura química de elementos que constituem os alcaloides pirrolizidínicos e N-óxido.....27
- Figura 1.2** Representação dos grupos de alcaloides pirrolizidínicos de acordo com as bases necinas.....28
- Figura 1.3** Representação da biossíntese da retronecina dos alcaloides pirrolizidínicos..... 30
- Figura 1.4** Estruturas químicas representantes dos cinco principais tipos de AP, I senecionina, II triangularina, III monocrotalina, IV licopsamina, V phalaenopsine e VI heliotrina.....31
- Figura 1.5** Rota metabólica de toxicidade e desintoxicação dos alcaloides pirrolizidínicos....33

### Capítulo II

- Figura 2.1** Estações automatizadas e com telemetria para monitoramento dos dados da colmeia e do ambiente.....64
- Figura 2.2** Gráficos de dispersão da análise de componentes principais para (a) méis florais relacionados à (b) composição físico-química.....73
- Figura 2.3** Gráficos de dispersão da análise de componentes principais para (a) méis florais relacionados à (b) diastase, condutividade elétrica, 5-HMF, K, Ca, Na e Mg.....74

### Capítulo IV

- Figura 4.1** Precipitação e temperatura ambiente registrados pela Epagri/Ciram entre os meses de janeiro e dezembro de 2017 e 2018 nas cidades de Caçador e São Joaquim, estado de Santa Catarina.....116

### Capítulo V

- Figura 5.1** Perfil da soma dos alcaloides pirrolizidínicos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para os méis de melato de bracatinga provenientes de três safras bianuais..... 129
- Figura 5.2** – Ingestão diária estimada (a) e margem de exposição (b) obtidas para as amostras de mel de melato de bracatinga.....133

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela 1.1** Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas....40

**Tabela 1.2** Presença de pólenes de Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae em méis e estudos que investigaram alcaloides pirrolizidínicos em partes destas plantas.....55

### Capítulo II

**Tabela 2.1** Localização das colmeias monitoradas e datas das coletas dos méis em seis cidades do estado de Santa Catarina.....65

**Tabela 2.2-** Resultados das análises de identidade e qualidade de méis florais, expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP).....68

**Tabela 2.3** Resultados das análises de açúcares ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \pm \text{DP}$ ) nos méis florais monitorados em Santa Catarina.....71

**Tabela 2.4** Resultados das análises de minerais ( $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{DP}$ ) nos méis florais de colmeias monitoradas em Santa Catarina.....72

### Capítulo III

**Tabela 3.1** Datas de coleta das plantas próximas às colmeias monitoradas pelo *Apis Online*..... 79

**Tabela 3.2** Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do estado de Santa Catarina.....81

### Capítulo IV

**Tabela 4.1** Características químicas dos alcaloides pirrolizidínicos e seus tempos de retenção ( $t_r$ , min)..... 96

**Tabela 4.2** Alcaloides pirrolizidínicos ( $\mu\text{g kg}^{-1} \pm$  desvio padrão) \* encontrados em treze méis florais de colmeias monitoradas no estado de Santa Catarina.....101

**Tabela 4.3** Caracterização polínica dos méis provenientes de Caçador, estado de Santa Catarina.....105

**Tabela 4.4** Caracterização polínica dos méis provenientes de São Joaquim, estado de Santa Catarina.....108

**Tabela 4.5** Alcaloides pirrolizidínicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ )\* encontrados em espécies de Asteraceae e Fabaceae coletadas no estado de Santa Catarina.....113

**Tabela 4.6** Informações de melissopalínologia, alcaloides pirrolizidínicos em méis e plantas das famílias Asteraceae e Fabaceae.....120

### Capítulo V

**Tabela 5.1** Informações sobre as amostras de mel de melato de bracatinga.....127

## LISTA DE EQUAÇÕES

### Capítulo II

**Equação 2.1** *Acidez livre* =  $\frac{(\text{vol NaOH} \times \text{fator NaOH} \times \text{vol diluição})}{\text{massa (g)}}$  .....66

**Equação 2.2** *HMF*  $\left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)$  =  $\frac{(\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 149,7 \times 5}{P}$  .....67

### Capítulo IV

**Equação 4.1** *Frequência total* =  $\frac{\text{número de grãos do tipo polínicos}}{\text{soma polínica}} \times 100$  .....99

### Capítulo V

**Equação 5.1** *IDE* =  $\frac{C \times M}{PC \times 1000}$  .....128

**Equação 5.2** *MOE* =  $\frac{BMDL_{10}}{IDE}$  .....128

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Alcaloides pirrolizidínico
BfR	Do alemão, <i>Bundesinstitut für Risikobewertung</i>
CONTAM	Do inglês, <i>Panel on Contaminants in the Food Chain</i>
DNA	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ESI	Do inglês, <i>electrospray ionization</i>
EFSA	Do inglês, <i>European Food Safety Authority</i>
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAASC	Federação das Associações de Apicultores e Meliponicultores de Santa Catarina
GC-MS	Do inglês, <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HVOD	Do inglês, <i>hepatic veno-occlusive diástase</i>
LC-MS/MS	Do inglês, <i>Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry</i>
RASFF	Do inglês, <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
SIM	Do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>
SLAV-SC	Seção Laboratorial Avançada de São José - Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
5-HMF	5-Hidroximetilfurfural

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
Objetivo Geral .....	24
Objetivos específicos.....	24
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>25</b>
1.1 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS.....	25
<b>1.1.1 Aspectos gerais de toxicidade e casos de intoxicações em humanos .....</b>	<b>32</b>
<b>1.1.2 Regulamentação.....</b>	<b>36</b>
1.2 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM MÉIS .....	39
2.3 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM PLANTAS APÍCOLAS.....	52
<b>2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MÉIS FLORAIS PROVENIENTES DO MONITORAMENTO DE COLMEIAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA....</b>	<b>61</b>
<b>Resumo 61</b>	
2.1 Introdução.....	62
2.2 Materiais e métodos.....	64
<b>2.2.1 Área de estudo no Estado de Santa Catarina .....</b>	<b>64</b>
<b>2.2.1 Coleta das amostras.....</b>	<b>65</b>
<b>2.2.2 Análises físico-químicas .....</b>	<b>65</b>
<b>2.2.3 Análise de dados .....</b>	<b>68</b>
2.3 Resultados e discussão .....	68
2.4 Conclusões.....	75
<b>3 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS COM POTENCIAL APÍCOLA PROVENIENTES DE REGIÕES CATARINENES COM MONITORAMENTO DIGITAL DE COLMEIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>Resumo 76</b>	
3.1 Introdução.....	77
3.2 Materiais e métodos.....	79
<b>3.2.1 Coleta das amostras.....</b>	<b>79</b>
<b>3.2.2 Identificação botânica das plantas .....</b>	<b>80</b>
3.3 Resultados e Discussão.....	80
<b>3.3.1 Identificação botânica .....</b>	<b>80</b>

3.4 Conclusões .....	91
----------------------	----

## **4 ANÁLISE MELISSOPALINOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM PLANTAS E MÉIS FLORAIS POR LC-ESI-MS/MS .....93**

### **Resumo 93**

4.1 Introdução .....	94
4.2 Materiais e métodos .....	95
<b>4.2.1 Reagentes e padrões analíticos.....</b>	<b>95</b>
<b>4.2.2 Preparo das soluções.....</b>	<b>96</b>
<b>4.2.3 Instrumentação e condições cromatográficas.....</b>	<b>96</b>
<b>4.2.4 Amostras .....</b>	<b>97</b>
<b>4.2.5 Análise melissopalínológica .....</b>	<b>98</b>
4.3 Resultados e discussão .....	100
<b>4.3.1 Determinação de alcaloides pirrolizidínicos em méis .....</b>	<b>100</b>
<b>4.3.2 Análise de pólen nos méis selecionados .....</b>	<b>103</b>
<b>4.3.3 Alcaloides pirrolizidínicos em Asteraceae e Fabaceae.....</b>	<b>111</b>
<b>4.3.4 Melissopalínologia e alcaloides pirrolizidínicos em méis e plantas das famílias Asteraceae e Fabaceae .....</b>	<b>117</b>
4.5 Conclusões .....	122

## **5 DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella*) POR LC-ESI-MS/MS 123**

### **Resumo 123**

5.1 Introdução .....	124
5.2 Materiais e métodos .....	126
<b>5.2.1 Reagentes e padrões analíticos.....</b>	<b>126</b>
<b>5.2.2 Preparo das soluções.....</b>	<b>126</b>
<b>5.2.3 Instrumentação e condições cromatográficas.....</b>	<b>126</b>
<b>5.2.4 Coleta das amostras .....</b>	<b>126</b>
<b>5.2.5 Preparo das amostras .....</b>	<b>127</b>
<b>5.2.6 Ingestão diária estimada e margem de exposição .....</b>	<b>128</b>
<b>5.2.7 Análise dos dados .....</b>	<b>129</b>
5.3 Resultados e discussão .....	129
5.4 Conclusões .....	135

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>136</b>
<b>Referências .....</b>	<b>139</b>
<b>Apêndice A – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Araranguá, Estado de Santa Catarina. ....</b>	<b>158</b>
<b>Apêndice B – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Miguel do Oeste, Estado de Santa Catarina.....</b>	<b>163</b>
<b>Apêndice C – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Caçador, Estado de Santa Catarina. ....</b>	<b>164</b>
<b>Apêndice D – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Mafra, Estado de Santa Catarina. ....</b>	<b>167</b>
<b>Apêndice E – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Joinville, Estado de Santa Catarina. ....</b>	<b>168</b>
<b>Apêndice F – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Joaquim, Estado de Santa Catarina.....</b>	<b>171</b>
<b>APÊNDICE G - Alcaloides pirrolizidínicos (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>) encontrados em méis de melato de bracatinga.....</b>	<b>175</b>
<b>APÊNDICE H – Determinação de agrotóxicos em méis florais e de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i>) da região Sul do Brasil por GC-MS: Um estudo de caso .....</b>	<b>176</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>176</b>
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>179</b>
2.1 Padrões analíticos e reagentes .....	179
2.2 Preparo das soluções.....	179
2.3 Amostras .....	180
2.4 Preparo de amostras.....	180
2.5 Condições cromatográficas e do espectrômetro de massas .....	181
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>182</b>
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>185</b>
<b>Referências .....</b>	<b>186</b>



## INTRODUÇÃO

As plantas possuem em sua composição diversos compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo proteínas, lipídeos, clorofila, enzimas, aminoácidos, minerais, terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os alcaloides pirrolizidínicos (AP) pertencem ao grupo de compostos que contém nitrogênio e são considerados toxinas naturais encontrados em diversas espécies de plantas, especialmente as procedentes das famílias Asteraceae, Apocynaceae, Boraginaceae e Fabaceae (BANDINI; SIANI; SPISSO, 2020; KOPP; ABDEL-TAWAB; MIZAIKOFF, 2020). Os AP 1,2-insaturados podem ser bioativados, principalmente no fígado pela ação do citocromo P450, formando metabólitos reativos capazes de alquilar nucleófilos celulares incluindo, proteína e ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês, *deoxyribonucleic acid*) (CHEN; HUO, 2010; WANG et al., 2005). A formação desses adutos pode danificar a função celular e a homeostase, que conseqüentemente podem representar uma necrose, fibrose, proliferação epitelial biliar, megalocitose, fibrose vascular, ou doença hepática veno-oclusiva (HVOD do inglês, *hepatic veno-occlusive disease*) (HE et al., 2021; STEGELMEIER; COLEGATE; BROWN, 2016).

As possíveis rotas de exposição da dieta humana aos AP geralmente ocorre pela ingestão acidental de plantas contendo esses agentes de risco, de produtos à base de plantas (medicamentos, chás, suplementos alimentares), além dos produtos de origem animal, como o mel (EFSA, 2007) e outros produtos apícolas (pólen apícola<sup>1</sup>, geleia real<sup>2</sup>, própolis<sup>3</sup>). Uma vez presente nas plantas ofertantes de néctar, pólen, e/ou exsudatos, as abelhas transportam os AP para a colmeia (KEMPF; REINHARD; BEUERLE, 2010). Plantas do gênero *Senecio* (CARPINELLI DE JESUS et al., 2019; COLEGATE et al., 2018; FLADE et al., 2019; VAN WYK; STANDER; LONG, 2017), *Echium* (BOPPRÉ; COLEGATE; EDGAR, 2005), *Crotalaria* (ZHANG et al., 2017), *Eupatorium* (EDGAR; ROEDER; MOLYNEUX, 2002), entre outras (EDGAR; ROEDER; MOLYNEUX, 2002), são frequentemente avaliadas quanto à presença de AP, devido não somente à sua origem, mas por suas maiores contribuições de

---

<sup>1</sup> Pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia (BRASIL, 2001a).

<sup>2</sup> Geleia Real é produto proveniente da secreção do sistema glandular cefálico (glândulas hipofaríngeas e mandibulares) das abelhas operárias jovens e fornecida as larvas e a rainha (BRASIL, 2001b).

<sup>3</sup> Própolis é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (BRASIL, 2001c).

pólen detectados em méis. Porém, ainda é necessário ampliar o conhecimento relacionado à presença de AP em outras plantas, levando em consideração a grande disponibilidade de espécies de Asteraceae, Boraginaceae e Fabaceae que possuem potencial apícola (CARVALHO; MARCHINI, 1999; KEMPF; REINHARD; BEUERLE, 2010; MAKHLOUFI et al., 2010; NISHIDA; NAIDE; PAGNIN, 2014) e que ainda não foram estudadas quanto à presença de AP. Por outro lado, devido a frequência com que os AP vem sendo encontrados, principalmente em méis, grupos de pesquisas de diversos países vem intensificando estudos dessa categoria (BODI et al., 2014; CELANO et al., 2019; KAST et al., 2014; KEMPF et al., 2008; KOWALCZYK; KWIATEK, 2018; MARTINELLO et al., 2017; PICRON et al., 2019; VALESE et al., 2016; WANG et al., 2019a; ZHU et al., 2018). Se por um lado, os níveis de AP encontrados nos méis avaliados são reduzidos e/ou insuficientes para causar efeito tóxico agudo, por outro, esses mesmos compostos representam um efeito cumulativo. Portanto, se os méis contendo AP são consumidos frequentemente e em quantidades que excedem a ingestão diária máxima sugerida pelas autoridades para estes compostos em alimentos (0,0237 µg AP/kg de peso corpóreo/dia) (BFR, 2011; EFSA, 2011; EFSA et al., 2017), ao longo do tempo, este pode ser um fator importante para o desenvolvimento de doenças hepáticas crônicas.

Em 2020 a região Sul do Brasil foi líder nacional na produção de mel, responsável por 38% de mel produzido (IBGE, 2020). Com base neste potencial e com o propósito de auxiliar os apicultores do Estado de Santa Catarina, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina desenvolveu e colocou em prática em 2018 o projeto *Apis On-line* (<https://ciram.epagri.sc.gov.br/apicultura/>). Este é um sistema de monitoramento digital de colmeias automatizado que monitora e envia dados em tempo real em relação a diversos parâmetros (temperatura, peso de produção de mel, umidade) que podem ser importantes para avaliar impactos climáticos e/ou de doenças na colmeia. Além disso, é possível realizar o cadastramento de floradas e a partir do conhecimento dos apicultores, determinar um calendário de floração apícola. É importante destacar que fatores favoráveis, como o clima e a vasta disponibilidade de espécies com flores, aliado ao projeto de monitoramento de colmeias pode potencializar a exploração da atividade apícola com vistas a maximizar a produção de mel na região Sul, especialmente no Estado de Santa Catarina. Por outro lado, ainda existem lacunas a serem preenchidas sobre a rastreabilidade de espécies que ofertam néctar, pólen e/ou exsudatos, além da caracterização química de compostos com potencial tóxico nas espécies vegetais e nos produtos apícolas na região Sul. Em relação a estudos desta grandeza e que compreendem a

região Sul do Brasil, Valese et al. (2021) avaliaram AP em méis, pólen apícolas além de *Senecio brasiliensis* de três regiões do Estado de Santa Catarina. De fato, alguns méis e pólen apícolas, bem como a *S. brasiliensis*, apresentaram elevados teores de AP e, de acordo com a melissopalínologia, além de *Senecio*, outras espécies de Asteraceae e Fabaceae podem ter contribuído para os níveis AP encontrados nos méis, porém estas plantas não foram coletadas e avaliadas no estudo. Portanto, ainda são desconhecidos ou inexistentes estudos que ao mesmo tempo realizaram um levantamento e identificação de espécies que estão próximas às colmeias, de investigação de AP nestas espécies e nos méis produzidos, bem como, análise melissopalínológica para verificar a contribuição das plantas com flores coletadas pelas abelhas. Estudos de AP em méis de melato ainda são escassos (KAST et al., 2014; KOWALCZYK; KWIAŁTEK, 2018), talvez por este tipo de mel não ser proveniente majoritariamente do néctar ou pólen das flores, estão sendo negligenciados em termos da presença dessa classe de alcaloides.

Frente ao exposto, este trabalho está estruturado da seguinte maneira:

**Capítulo 1:** Contempla uma revisão da literatura acerca dos AP, incluindo características químicas e formação desses compostos, além da potencialidade tóxica e regulamentação. Na revisão também é apresentado e discutido estudos que encontraram os AP em méis de diferentes origens botânica e geográficas, bem como sua presença em plantas com potencial apícola.

**Capítulo 2:** Apresenta o sistema de monitoramento digital das colmeias no Estado de Santa Catarina e a localização das colmeias, bem como a caracterização físico-química, análises de açúcares e minerais nos méis florais das colmeias monitoradas.

**Capítulo 3:** Trata da identificação botânica das plantas, as quais foram coletadas flores próximas das colmeias monitoradas e da estimativa de distâncias teóricas percorridas pelas abelhas entre a colmeia monitorada e flores coletadas.

**Capítulo 4:** Apresenta e discute sobre a melissopalínologia nos méis e os AP em méis e plantas, bem como, relaciona esses três parâmetros para avaliar a influência das floradas nos teores de AP determinados.

**Capítulo 5:** Apresenta e discute a presença de AP em méis de melato de bracinga (*Mimosa scabrella*) de diferentes anos de produção dos estados de Santa Catarina e Paraná, Brasil.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar a influência de flores ofertantes de néctar e pólen nos teores de alcaloides pirrolizidínicos em méis florais provenientes de sistema de monitoramento digital apícola no Estado de Santa Catarina, Brasil, além de analisar essa classe de compostos em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella*).

### Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química, análises de açúcares e minerais em méis provenientes de colmeias monitoradas;
- Realizar a identificação taxonômica de plantas provenientes das regiões de monitoramento de colmeias;
- Verificar a contribuição de espécies nectaríferas e/ou poliníferas na produção do mel floral por meio de análise melissopalínológica;
- Avaliar a presença de oito alcaloides pirrolizidínicos em méis e flores utilizando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas em tandem;
- Relacionar os pólenes identificados nos méis com o perfil de alcaloides pirrolizidínicos das plantas e méis;
- Verificar a presença de oito alcaloides pirrolizidínicos em méis de melato de bracatinga utilizando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas em tandem.

## CAPÍTULO I

### 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura acerca dos assuntos relacionados a este trabalho. Primeiramente, serão apresentadas as características dos alcaloides pirrolizidínicos (AP) e classificações de acordo com os tipos de AP. Na sequência, uma breve abordagem sobre a potencialidade tóxica e regulamentações existentes para AP em alimentos. Além disso, serão apresentadas e discutidas as informações referentes à presença de AP em méis de diferentes origens (botânicas e geográficas), seus teores e possíveis ingestões diárias recomendadas que não representariam risco agudo para os seres humanos. Por fim, uma abordagem sobre plantas com potencial apícola e estudos de investigação de AP nessas matrizes.

Partes das informações desse capítulo foram publicadas em: BRUGNEROTTO, P., SERAGLIO, S. K. T., SCHULZ, M., GONZAGA, L. V., FETT, R., COSTA, A. C. O, Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review, **Food Chemistry**. v. 342, p. 1-18, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128384>

#### 1.1 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

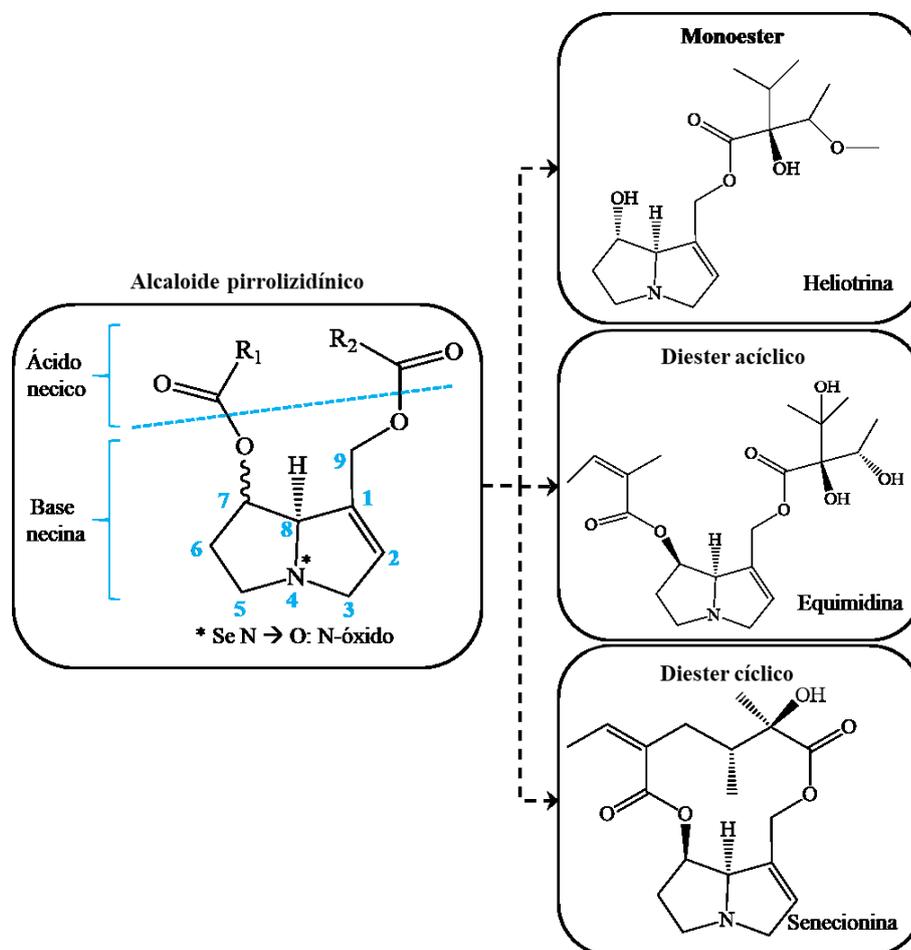
Durante milhares de anos, as plantas desenvolveram uma ampla variedade de metabólitos secundários como um meio de defender-se contra herbívoros, microorganismos e outras plantas (ROBERTS; WINK, 1998). Em geral, o metabolismo secundário das plantas pode ser considerado como o nível funcional das interações químicas destas com o meio ambiente (HARTMANN, 1999). Entre os mais de 50.000 metabólitos secundários conhecidos, mais de 12.000 são alcaloides, sendo que, por muitos anos estes foram considerados produtos residuais ou moléculas sem função, ilustrando o virtuosismo bioquímico da natureza (ROBERTS; WINK, 1998). Atualmente, alcaloides são definidos de uma maneira mais pragmática; incluindo todas as substâncias naturais contendo nitrogênio que não são classificados como peptídeos, aminoácidos não proteicos, aminas, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, cofatores, fito-hormônios ou metabólitos primários (como bases de purina e pirimidina). Inclusive os antibióticos produzidos por bactérias ou fungos estão incluídos no grupo dos alcaloides (WINK, 2016). Os AP representam uma classe de compostos secundários presentes em diversas espécies de plantas (HARTMANN, 1999; MOREIRA et al., 2018).

Quimicamente, estas substâncias são ésteres de 1-metilhidroxilpirrolizidinas, formados a partir de aminoálcoois pirrolizidínicos (base necina) e um ou mais ácido(s) alifático(s) ramificado(s) (ácido néxico) (Figura 1.1) (MARTINELLO et al., 2014; MEDICINES AGENCY, 2014). A oxidação do nitrogênio na base necina é uma reação catalisada via enzimática, enquanto a redução de AP N-óxido ocorre espontaneamente na presença de agentes redutores químicos ou biológicos (EFSA, 2011). Portanto, os AP podem ser identificados na forma de bases terciárias (base livre) ou N-óxidos (MARTINELLO et al., 2014; MEDICINES AGENCY, 2014; MOREIRA et al., 2018). Comparativamente com as bases terciárias, são solúveis em solventes orgânicos apolares e em alguns solventes orgânicos polares, enquanto os N-óxidos são hidrossolúveis ou solúveis em solventes orgânicos polares (EFSA, 2011). Os N-óxidos são considerados menos tóxicos que os AP de base livre e representam a forma predominante nas plantas (SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019). Portanto, a enorme diversidade estrutural de AP é resultado da combinação de bases necinas e um número considerável de diferentes ácidos néxicos. Além da oxidação do nitrogênio terciário da base necina, a variabilidade de estruturas é ampliada quando ocorre a hidroxilação da base necina e/ou ácido néxico e a acetilação de grupos hidroxil da fração ácida (SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019).

Os ácidos néxicos são ácidos carboxílicos que podem ser classificados como alifáticos monocarboxílicos (acético, láctico, angélico, tíglico, seneciólico, sarracínico, isovalérico, viridiflórico, trachelântico, echimidínico, lasiocarpico, heliótico, latifólico e *hackélico*) (EL-SHAZLY; WINK, 2014; MOREIRA et al., 2018; SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019) ou dicarboxílicos (senécico e isatinécico) (MOREIRA et al., 2018), além de monocarboxílicos aromáticos (benzoico, salicílico, *p*-cumárico, 4-metoxibenzoico e nervogênico) (SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019) e ácidos dicarboxílicos com onze e/ou doze membros que formam AP macrocíclicos (monocrotálico, crotaleschenico, incânico, trichodésmico, globiférico, senecico, isatinico, retronecico, seneciofílico, riddélico, jacolinecico, jaconinecico, jacobinecico, entre outros) (SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019).

Os ácidos alifáticos, genericamente denominados de ácidos néxicos, esterificam os grupos hidroxilas ligados ao anel heterocíclico (base necina), com capacidade de esterificação de uma ou duas hidroxilas, por isso, os AP podem ser encontrados na forma de monoésteres, diésteres acíclicos e diésteres cíclicos (Figura 1.1) (MARTINELLO et al., 2014; MEDICINES AGENCY, 2014).

**Figura 1.1-** Representação da estrutura química de elementos que constituem os alcaloides pirrolizidínicos e N-óxido.



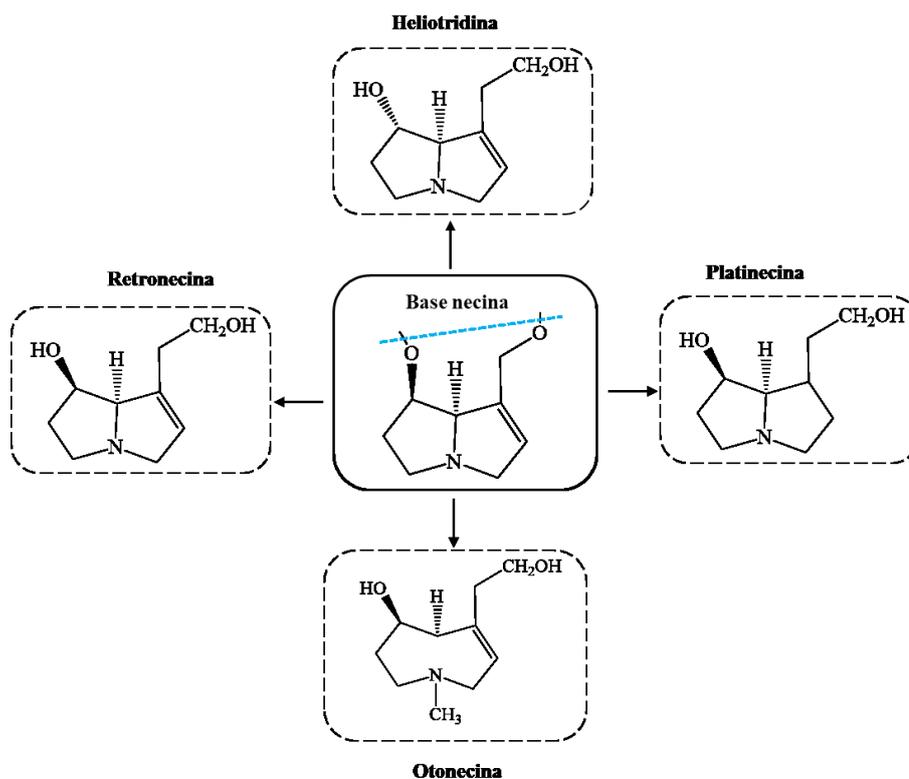
Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

Ademais, os ácidos néicos normalmente são derivados dos aminoácidos de cadeia ramificada, tais como, valina, leucina, isoleucina e treonina, por diferentes rotas biossintéticas. Os ácidos néicos monocarboxílicos com 5 átomos de carbono (angélico, tíglico e sarracínico) são biossintetizados a partir da treonina, porém para os monocarboxílicos com 7 átomos de carbonos (seneciólico, viridiflorico e trachelanthic) o precursor envolvido é o aminoácido valina (MOREIRA et al., 2018; ROEDER, 1995; SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019). Outros ácidos néicos, como os dicarboxílicos com 10 carbonos, são formados pela união de duas unidades de aminoácido. Por exemplo, o ácido néico do AP tricodesmina (ácido tricodésmico) isolado de *Crotalaria globifera*, é derivado de leucina (e seu precursor treonina), e a outra de valina ou de leucina (SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019). A valina também é um aminoácido precursor da biossíntese dos ácidos traquelântico, viridiflórico ou seneciólico

(MOREIRA et al., 2018), todos ácidos monocarboxílicos. Por outro lado, para o ácido dicarboxílico senécico, os aminoácidos precursores são isoleucina e treonina (MOREIRA et al., 2018; SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019).

Enquanto os ácidos nécicos apresentam ampla diversidade estrutural, as bases necinas compartilham uma estrutura em comum, a qual geralmente inclui a pirrolizidina. Caracterizada por um hidrocarboneto alifático bicíclico com um átomo de nitrogênio terciário como “cabeça de ponte”, além de um grupamento hidroximetila em C1, uma hidroxila em C7 e, por vezes, apresenta uma ligação dupla na ligação C1-C2. Estas características são responsáveis pela estrutura central de uma variedade de alcaloides conhecidos como AP (EFSA, 2011; MOREIRA et al., 2018). De acordo com a estrutura da base necina, os AP podem ser classificados em quatro grupos: tipos retronecina, heliotridina e otonecina que são bases insaturadas, além do tipo platinecina saturada (Figura 1.2). Com exceção do tipo otonecina, todos são capazes de formar derivados N-óxidos.

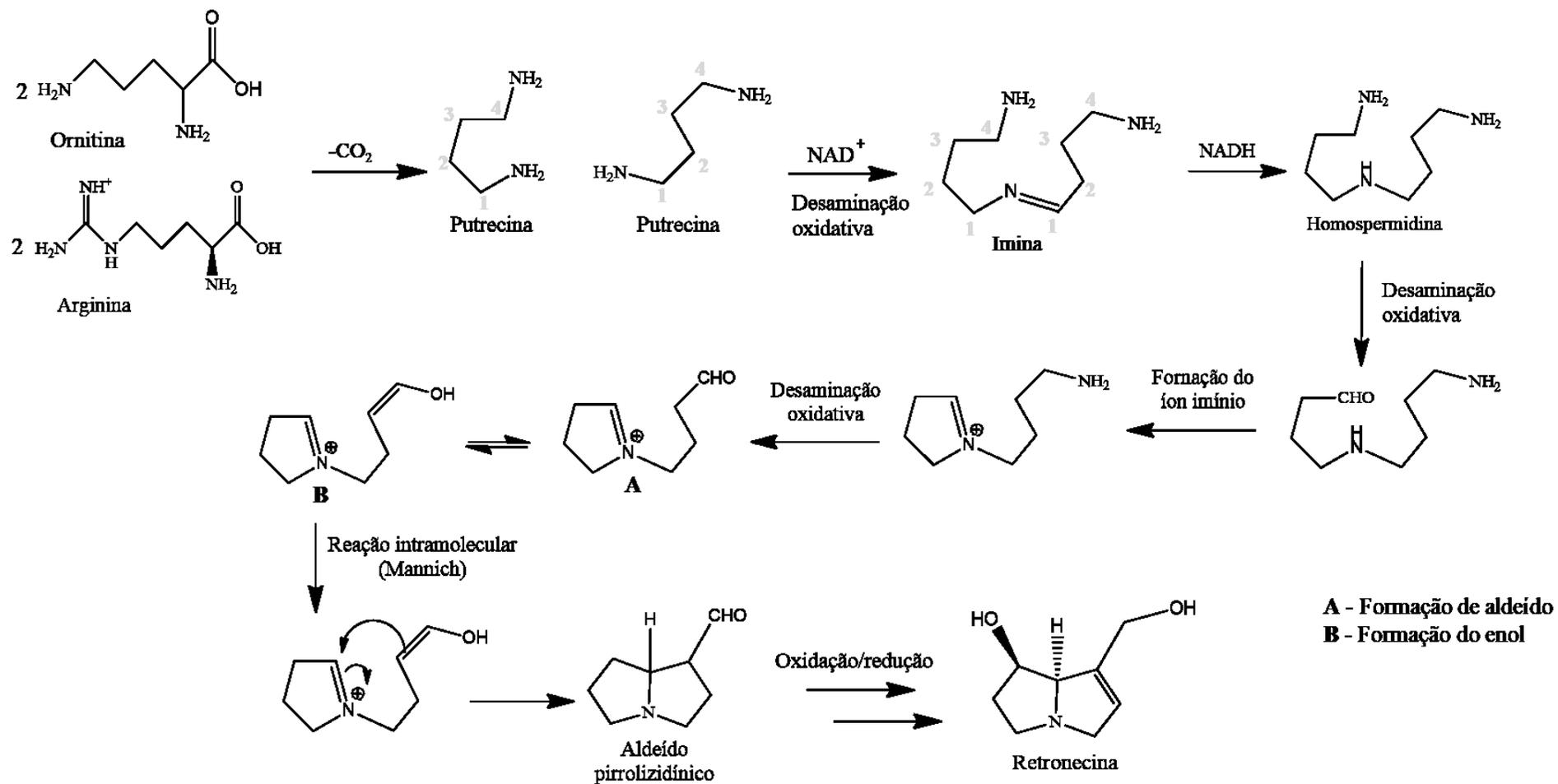
**Figura 1.2** – Representação dos grupos de alcaloides pirrolizidínicos de acordo com as bases necinas.



Fonte: Adaptado Brugnerotto et al. (2021a).

Estudos laboratoriais pioneiros demonstraram que o núcleo pirrolizidínico é proveniente da ornitina ou arginina via putrescina (ROBINS; SWEENEY, 1983). Conforme apresentado na Figura 1.3, duas moléculas de putrescina são condensadas em uma reação de desaminação oxidativa (enzima  $\text{NAD}^+$ ) para formar a imina, que é então reduzida (NADH) em homospermidina pela ação da enzima homospermidina sintase (DEWICK, 2002). Após a desaminação oxidativa ocorre uma sequência de reações, entre elas, a ciclização com formação de um íon imínio; desaminação oxidativa; e uma reação do tipo Mannich intramolecular, que leva à formação do aldeído pirrolizidínico. A retronecina é a base necina mais comum encontrada nos AP mais conhecidos, podendo ser formada a partir do aldeído pirrolizidínico e por meio de etapas de oxidação e redução.

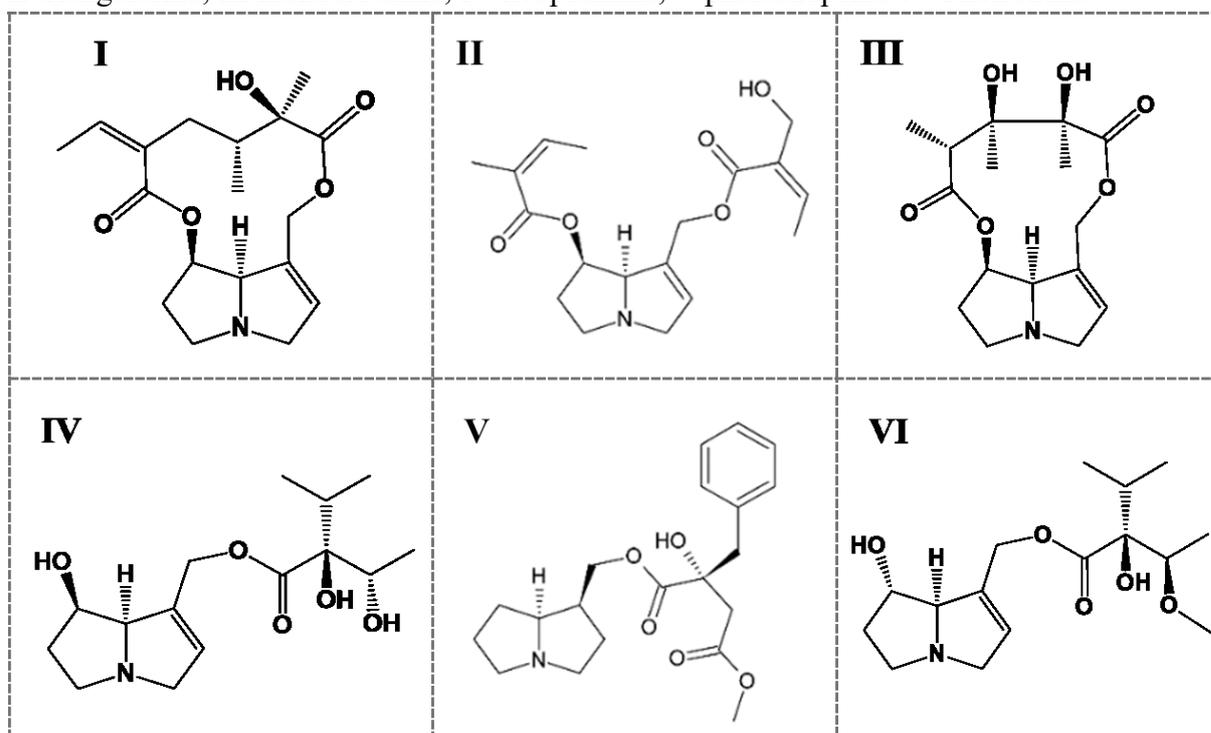
Figura 1.3 – Representação da biossíntese da retronecina dos alcaloides pirrolizidínicos.



Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

Os AP compreendem um grupo diversificado de cerca de 360 estruturas com ocorrência restrita em certos táxons (tribo, família, gênero, espécie) de plantas superiores<sup>4</sup>. Com base em implicações taxonômicas e biogenéticas, a combinação de bases necinas e ácidos nécicos, foram classificados grupos com cinco tipos de AP (HARTMANN, 1999; SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019). Os tipos I *Senecionina* (> 100 compostos conhecidos, Asteraceae) e III *Monocrotalina* (> 30 compostos, Fabaceae) são classificados em diésteres macrocíclicos, tipo II *Triangularina* (> 55 compostos, Asteraceae, Boraginaceae) em diéster de cadeia aberta e os tipos IV *Licopsamina* (> 100 compostos, Eupatorieae), V *Falaenopsina* e VI *Heliotrina* em monoésteres (> 20 compostos, Orchidaceae) (HARTMANN, 1999) (Figura 1.4).

**Figura 1.4** - Estruturas químicas representantes dos cinco principais tipos de AP, I senecionina, II triangularina, III monocrotalina, IV licopsamina, V phalaenopsine e VI heliotrina.



Fonte: Brugnerotto et al. (2021a).

Geralmente os AP dos tipos I, IV e VI são os mais estudados. O tipo I (senecionina) compreende os AP jacobina, retrorsina, senecionina, senecifillina, senkirkina e seus N-óxidos;

<sup>4</sup> Plantas superiores ou vasculares são espécies vegetais que possuem tecidos/vasos condutores de seiva, compreendendo as gimnospermas e angiospermas (OLIVEIRA, 2011).

o tipo IV (licopsamine) compreende os AP echimidina, indicina, intermedina, licopsamina e seus N-óxidos; enquanto o tipo VI (heliotrina) compreende europina, heliotrina e lasiocarpina (HUNGERFORD et al., 2019). Estes três tipos (I, IV, e VI) podem ser encontrados em plantas do gênero *Senecio*, *Tussilago*, *Eupatorium*, *Echium* e *Heliotropium* (BOPPRÉ et al., 2008; CARPINELLI DE JESUS et al., 2019; HUNGERFORD et al., 2019; KAST et al., 2018; NEDELICHEVA; KOSTOVA; SIDJIMOV, 2015a; SKONECZNY et al., 2015). O tipo II compreende a triangularina, tipo III a monocrotalina e tricodesmina (*Crotalaria*) e tipo V a phalaenopsine (*Phalaenopsis*) (FRÖLICH; HARTMANN; OBER, 2006; MOREIRA et al., 2018; SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019).

### 1.1.1 Aspectos gerais de toxicidade e casos de intoxicações em humanos

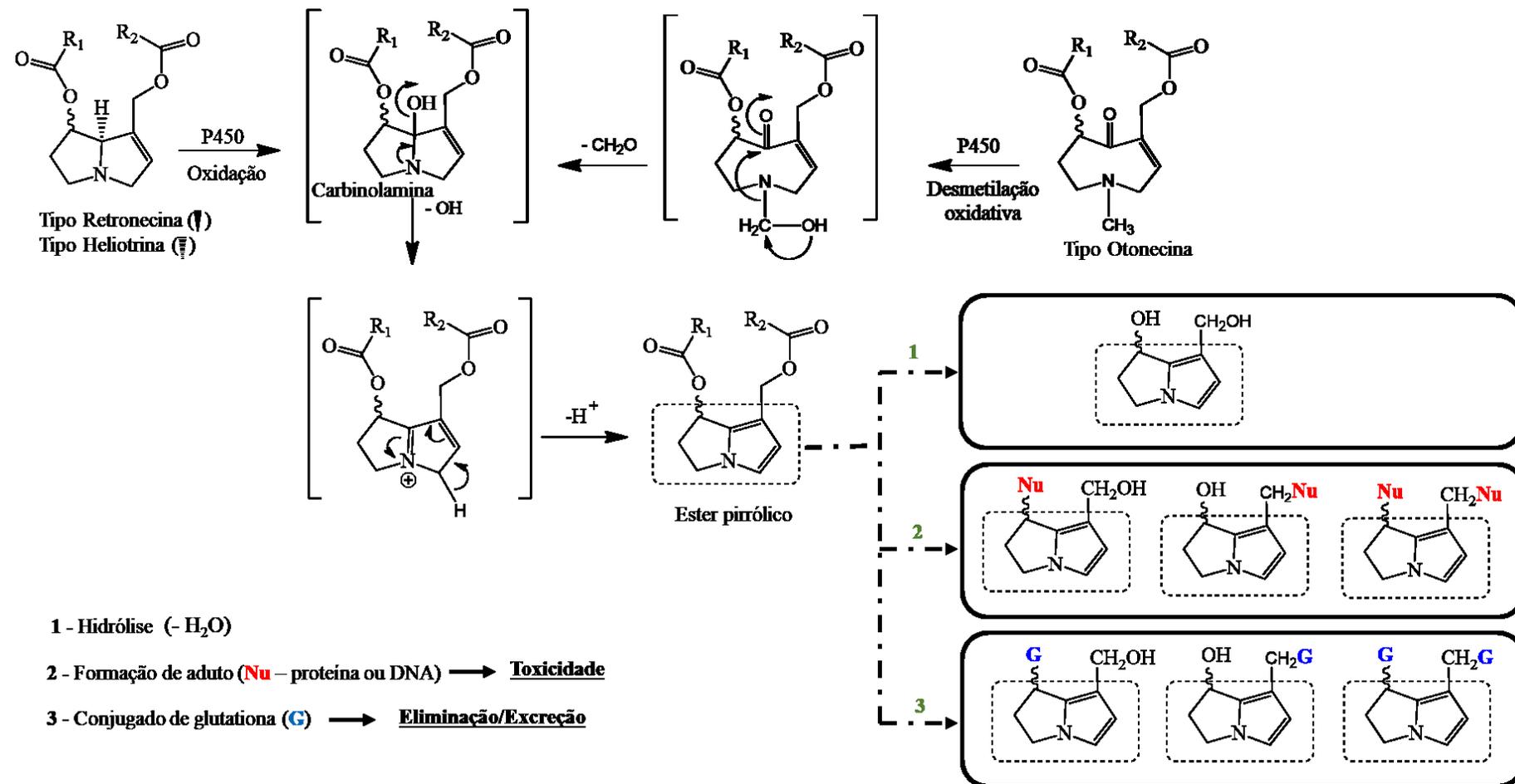
Os AP são bioativados principalmente no fígado pelas enzimas microsossomais hepáticas do citocromo P-450 (ou CYP450<sup>5</sup>) em particular as subfamília CYP3A e CYP2B (EFSA, 2011; MERZ; SCHRENK, 2016; MOREIRA et al., 2018; RUAN et al., 2014). As reações do metabolismo dos AP resultam em compostos alquilantes altamente reativos (ésteres pirrólicos) e podem ligar-se rapidamente a centros nucleofílicos como DNA, proteínas e aminoácidos podendo formar complexos de pirróis, os quais, podem persistir nos tecidos e gerar toxicidade aguda, principalmente no fígado, mas também em outros órgãos, como o pulmão (CHEN; HUO, 2010; EBMEYER et al., 2019a; HARTMANN, 1999; MARTINELLO et al., 2014; RUAN et al., 2014). Os mecanismos bioquímicos, metabólicos e de iniciação à pneumotoxicidade induzida por AP permanecem pouco esclarecidos na literatura. Em contrapartida, uma importante via de desintoxicação pode ser formada se os ésteres pirrólicos se conjugarem com a glutatona, formando compostos solúveis podendo ser eliminados pela urina (RUAN et al., 2014).

Na Figura 1.5 é demonstrado um exemplo de ativação metabólica dos AP dos tipos retronecina/heliotrina e otonecina para formação de ésteres pirrólicos que interagem com glutatona ou macromoléculas biológicas nucleofílicas (Nu, representadas por DNA e/ou proteína), para gerar conjugados de pirrol-glutatona ou adutos de pirrol-Nu.

---

<sup>5</sup> Citocromo P450 (abreviado CYP, P450 ou **CYP450**) é uma superfamília ampla e diversificada de proteínas responsáveis por oxidar um grande número de substâncias para torná-las mais polares e hidrossolúveis.

Figura 1.5 – Rota metabólica de toxicidade e desintoxicação dos alcaloides pirrolizidínicos.



Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

Inicialmente o tipo retronecina é oxidado pela monoxigenase do CYP450 em um intermediário de carbinolamina instável, que se decompõe espontaneamente em dehidroretrorsina, um éster pirrólico eletrofilico. No tipo otonecina, é necessário uma N-desmetilação oxidativa. Para ambos os AP, a hidrólise do éster pirrólico pode gerar o álcool pirrólico, considerado um composto estável e de menor toxicidade (LIN; CUI; HAWES, 1998; MOREIRA et al., 2018; RUAN et al., 2014) desde que não apresente níveis elevados de impedimento estérico das ligações ésteres para favorecer a hidrólise, além de compreender poucas ramificações de ácidos néricos para diminuir a resistência à hidrólise. Portanto, os diésteres cíclicos com porções ácidas mais complexas apresentam maior risco devido à menor taxa de desintoxicação hidrolítica (WIEDENFELD, 2011). No entanto, é importante avaliar a potencialidade toxicológica em modelos *in vivo*, visto que a intoxicação por AP em seres humanos é afetada por diversos fatores, incluindo a absorção e metabolismo de cada tipo de AP. É importante destacar que durante o metabolismo dos AP pode ocorrer a formação de adutos ou conjugados de glutathione (LIN; CUI; HAWES, 1998; MOREIRA et al., 2018; RUAN et al., 2014), este último representa uma importante via de desintoxicação.

Os AP que possuem uma ligação dupla em C1-C2 (1,2-insaturada) apresentam maior potencial para a toxicidade, uma vez que, são capazes de serem metabolizados no fígado a intermediários hepatotóxicos (CHEN; HUO, 2010; EFSA, 2011; GRIFFIN et al., 2014). No caso dos N-óxidos, como não podem ser diretamente oxidados a metabólitos pirrólicos, mas podem ser parcialmente reduzidos em bases livres (ou aminas terciárias) correspondentes no trato digestivo, são equivocadamente considerados não tóxicos (EDGAR; ROEDER; MOLYNEUX, 2002; GOTTSCHALK et al., 2018).

Há diversos registros de casos de intoxicação em humanos pelo consumo de alimentos contaminados por AP na África, Paquistão, Afeganistão e Índia (DUSEMUND et al., 2018). Conforme relatado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA do inglês, *European Food Safety Authority*), no noroeste do Afeganistão, 7200 habitantes de aldeias sofreram intoxicação pelo consumo de pão de trigo contaminado com sementes de *Heliotropium popovii*. As sementes continham até 14,9 g kg<sup>-1</sup> de AP e foi estimado que um adulto consumiu pelo menos 700 g de farinha/dia contendo aproximadamente 2 mg de AP, ou seja, 0,023 mg AP kg<sup>-1</sup> peso corpóreo por dia para um adulto com 60 kg (EFSA, 2011). Além de um surto na Índia pela ingestão de painço (*Panicum miliare*) contaminado com sementes de espécies de *Crotalaria* (EFSA, 2011) que apresentavam até 19 g kg<sup>-1</sup> de AP. Com base neste

conteúdo e na ingestão diária média de 400 g de painço/adulto, foi estimado uma ingestão de até 40 mg/dia de AP (0,66 mg AP kg<sup>-1</sup> peso corpóreo por dia para um adulto com 60 kg) (EFSA, 2011).

No Brasil casos de intoxicação e óbitos em animais após ingestão de *Senecio brasiliensis* foram reportados (CORRÊA et al., 2008; LEITE DAU et al., 2019), e mais recentemente um caso de intoxicação com óbito foi registrado após uma mulher ingerir chá de *Senecio brasiliensis*, prescrito como uma terapia para a menopausa (BARCELOS et al., 2021). A este caso, foi confirmado síndrome da obstrução sinusoidal hepática, uma doença vascular hepática caracterizada histologicamente por edema, necrose, destacamento de células endoteliais em pequenas veias hepáticas e interlobulares sinusoidais e congestionamento intra-hepático, que leva à disfunção hepática. De acordo com He et al. (2021), existem relatos de casos de intoxicações por AP em humanos desde 1920, os quais geralmente aconteciam após o consumo de grãos ou cereais que causavam lesões hepáticas ou até mortes. As intoxicações aguda ou sub-aguda por AP em humanos são comumente relacionadas pela frequência de ingestão de grãos e farinha com estes compostos (HE et al., 2021; STEGELMEIER; COLEGATE; BROWN, 2016). De acordo com estudos científicos, comumente os principais sintomas detectados para intoxicações agudas são necrose hemorrágica, hepatomegalia e ascite, que podem levar à insuficiência hepática e à morte; enquanto a intoxicação sub-aguda é caracterizada por hepatomegalia e ascite recorrente, hiperplasia endotelial sinusoidal, e hipertrofia medial que resulta em uma oclusão das veias hepáticas, denominadas síndrome de obstrução sinusoidal hepática (HE et al., 2021). O avanço dessas intoxicações pode levar a uma lesão hepática crônica, embora seja mais difícil identificar e relacionar diretamente esta intoxicação pelo consumo constante de alimentos com AP (STEGELMEIER; COLEGATE; BROWN, 2016). Zhu et al. (2017) sugeriram que investigar apenas a toxicidade aguda causada por dose única pode subestimar a consequência causada por exposições múltiplas com doses relativamente mais baixas, mas por períodos prolongados, que seria o padrão normal de intoxicação por AP em humanos (ZHU et al., 2017). Outros casos de intoxicações causadas por AP ainda podem não ter sido registradas devido à falta de um sistema de registro mundial bem estabelecido e à indisponibilidade de diagnósticos específicos e confirmativos.

Estudos *in vivo* (CHEN et al., 2019; HE et al., 2017; ZHU et al., 2017) e *in vitro* (EBMEYER et al., 2019a, 2019b; LOUISSE et al., 2019; LUCKERT et al., 2015; YANG et al., 2017) vem demonstrando que os AP 1,2-insaturados e seus N-óxidos (convertidos a base livre

após a ingestão), principalmente a lasiocarpina e riddelliine (ALLEMANG et al., 2018; DUSEMUND et al., 2018) podem ser consideradas substâncias genotóxicas e cancerígenas mais potentes. O Programa Nacional de Toxicologia, administrou riddelliine (0 a 1 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo) por alimentação forçada em ratos F344 machos (70 semanas) e fêmeas (105 semanas) e (0,01 ou 0,33 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo) em ratos B6C3F1 (72 semanas). Os resultados demonstraram que a riddelliine induziu uma alta incidência de hemangiosarcoma no fígado e rim devido à presença de neoplasia em 86 e 76% dos machos e fêmeas, respectivamente, que receberam 1 mg kg<sup>-1</sup> de riddelliine. Um aumento significativo também foi observado no adenoma hepatocelular e leucemia de células mononucleares (1 mg kg<sup>-1</sup>), além dos oito adutos de DNA no tecido hepático de ratos femininos tratados com riddelliine por 3 ou 6 meses (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2003). Além de lasiocarpina e riddelliine, a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer também classificou a lasiocarpina, riddelliine e monocrotalina como possivelmente carcinogênico para humanos (COMMITTEE ON TOXICITY, 2008; IARC, 2002). Extratos de méis de *Echium plantagineum* (Boraginaceae) foram utilizados para avaliar a citotoxicidade em células adenocarcinoma gástrico humano e em células de fibroblastos de pulmão fetal humano, no entanto, como não foram detectados AP nos extratos, os resultados obtidos no estudo de Moreira et al. (2020) não puderam ser atribuídos a este classe de alcaloides.

Mesmo que haja evidências científicas das potencialidades de hepatotoxicidade e genotoxicidade dos AP e pelo semelhante modo de ação entre animais de laboratório e humanos, o real risco de câncer em humanos ainda não foi possível ser quantificado (MERZ; SCHRENK, 2016). Até o presente momento, também não foram encontrados na literatura científica estudos clínicos a respeito de intoxicações por AP em humanos relacionados ao consumo de méis e/ou produtos apícolas. De acordo com EFSA (2011) a possibilidade de toxicidade aguda em seres humanos, decorrente da exposição a AP no mel é baixa porém, não deixa de ser uma possível preocupação para a toxicidade crônica.

### 1.1.2 Regulamentação

Os AP vem sendo objeto de estudos em diversos alimentos (chás, leite, ovos, carnes e produtos da colmeia) (CHUNG; LAM, 2017) devido aos potenciais riscos de toxicidade aos seres humanos (COMMITTEE ON TOXICITY, 2008; IARC, 2002). Portanto, a pedido da Comissão Europeia, em 2007 a EFSA emitiu o primeiro parecer científico reconhecendo os AP

como substâncias indesejáveis na alimentação animal (EFSA, 2007). Novos pareceres científicos foram publicados em 2011 e 2017, sobre os riscos para a saúde humana e animal relacionados à presença de AP em alimentos e rações (EFSA, 2011), bem como, riscos para a saúde humana relacionados à presença destes alcaloides no mel, chá, infusões de ervas e suplementos alimentares (EFSA et al., 2017), respectivamente. Considerando os últimos pareceres, até 2011, era recomendado uma ingestão diária de até 0,007 µg de AP 1,2-insaturado por kg de peso corpóreo/dia (correspondente a 0,42 µg de AP 1,2-insaturado por dia para adultos com 60 kg), mas em 2017 ocorreu uma nova orientação, passando a uma ingestão diária recomendada de 0,0237 µg de AP 1,2-insaturado por kg de peso corpóreo/dia. Esta última dose foi considerada como ponto de referência para a avaliação do risco crônico, devido à incidência de hemangiosarcoma hepático em ratos fêmeas expostos à riddelliine (BFR, 2018; EFSA et al., 2017). A frequência do consumo de alimentos (vegetal e animal) associada a elevados teores de AP também representam uma preocupação à saúde dos consumidores.

O Instituto Federal de Avaliação de Riscos da Alemanha (BfR do alemão, *Bundesinstitut für Risikobewertung*) também contribui regularmente no levantamento de informações sobre a presença de AP em alimentos e suplementos alimentares, e identificou que chás e méis são as principais fontes que contribuem para a intoxicação de indivíduos principalmente para os que vivem em países ocidentais (BFR, 2011, 2013; DUSEMUND et al., 2018). O Comitê Conjunto de Especialistas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura/Organização Mundial da Saúde sobre Aditivos Alimentares, com base nos pareceres científicos da EFSA, também reconhece o elevado risco para os consumidores de chá e mel (FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2015).

Conforme relatado por Michel & Raezke (2009) e Ma et al. (2018), desde 1992 diferentes organizações da Alemanha, Reino Unido, Áustria, Países Baixos, Europa e Austrália/Nova Zelândia vem restringindo a exposição oral e/ou ingestão diária tolerável de AP, levando em consideração a frequência de ingestão (por exemplo: 1 µg/dia, máximo de 6 semanas por ano) ou pelo risco que determinada concentração pode causar (por exemplo: 0,007 µg/kg de peso corpóreo por dia, improvável de câncer). Geralmente as limitações de ingestão estão baseadas em 0,007 µg do total de AP em alimentos e ração/dia a 0,007 µg/kg de peso corpóreo por dia para todas as fontes (MA et al., 2018). Na Holanda, é aplicada uma recomendação de 0,1 µg de AP em 100 g de alimento (MICHEL; RAEZKE, 2009). No Brasil,

a RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, estabelece requisitos mínimos para fitomedicamentos e determina que a exposição diária de AP das espécies utilizadas (não listadas) deve ser menor que 1 µg/g.

Portanto, é importante observar que não há consenso no limite de ingestão diária de AP, embora todos concordem que essa classe de alcaloides é considerada indesejável nos alimentos. Apesar dos graves efeitos tóxicos atribuídos a estes compostos, ainda não foi estabelecido limites máximos de resíduos em alimentos e não há qualquer regulamentação para méis. Por outro lado, recentemente a União Europeia atualizou o regulamento nº 1881/2006, no que diz respeito aos níveis máximos de AP em certos alimentos, e incluiu um limite máximo de 500 µg kg<sup>-1</sup> para suplementos alimentares à base de pólen e produtos de pólen (EUROPEAN COMMISSION, 2020). De acordo com as informações do Regulamento nº 2020/2040 de 11 de dezembro de 2020, a tomada de decisão para os teores estabelecidos foi com base em estudos científicos (EFSA, 2011, 2016; EFSA et al., 2017; MULDER et al., 2015).

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), de competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pelo monitoramento de resíduos e contaminantes utilizados e/ou encontrados em produtos de origem animal e alimentação animal, e suas diretrizes e protocolos estão contidos na Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999). No âmbito deste plano estão incluídas análises de drogas veterinárias (autorizadas e proibidas), agrotóxicos, contaminantes inorgânicos, micotoxinas, dioxinas e antimicrobianos em carnes, pescados, ovos, leite e mel (BRASIL, 2015). Mesmo diante dos esforços contínuos de monitoramento, é importante destacar que os AP ainda não são contemplados no escopo desse plano. Considerando a potencial relevância toxicológica dos AP em produtos apícolas, é importante que o MAPA, juntamente com outros departamentos ou órgãos brasileiros legisladores incluam essa classe de compostos em programas de monitoramento pois pode ser um passo inicial para futuras determinações de limites máximos de resíduos e/ou de estudos de avaliações de risco frente aos teores monitorados.

O Painel dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM) recomendou que devem ser realizados esforços contínuos para coletar dados analíticos sobre a ocorrência de AP e seus N-óxidos em produtos alimentícios (EFSA, 2011). O monitoramento da qualidade dos alimentos por meio do rastreamento de dados analíticos pode ser fundamental e imprescindível

para estabelecer limites legalmente obrigatórios, além de minimizar os casos de intoxicações existentes e prevenir intoxicações futuras.

## 1.2 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM MÉIS

As abelhas da espécie *Apis mellifera*, normalmente, são responsáveis pela maior parte do mel produzido em todo o mundo. Esses insetos coletam o pólen e/ou néctar das flores, as secreções de partes vivas das plantas ou de insetos sugadores da seiva de plantas, transformam, combinam com substâncias específicas próprias e armazenam nos favos das colmeias para madurar e produzir o mel (BRASIL, 2000). As abelhas que se alimentam de plantas nectaríferas e/ou poliníferas que contêm AP, podem lixiviar tais toxinas para o mel. Dessa maneira, a presença de AP em méis pode comprometer a qualidade dos produtos apícolas e colocar em risco a saúde do consumidor, uma vez que, esses compostos representam um potencial risco de toxicidade (EFSA et al., 2017).

Mesmo existindo publicações desde 1977, esta seção resumiu e discutiu pesquisas mais recentes. Portanto, as principais informações relacionadas às amostras de mel (origem botânica e geográfica), bem como os AP e seu N-óxidos investigados e determinados em cada estudo são apresentadas na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Continuação.						
Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
MARTINELLO et al., 2014)	Não	Méis comerciais da Itália ( $n = 17$ ); União Européia (EU) ( $n = 22$ ); blends da EU e não UE ( $n = 31$ )	Echimidina, Heliotrina, Intermedina, Lasiocarpina, Licopsamina, Retrorsina, Senkirquina, Senecionina, Senecifillina	Echimidina (169,0) Intermedina (31,0) Licopsamina (42,0) Demais (não informado)	172	Até 8,0
(BODI et al., 2014)	Não	Méis comerciais ( $n = 87$ ) da área de Berlin, Alemanha	Echimidina, Heliotrina e seu N-óxido, Intermedina, Lasiocarpina e seu N-óxido, Licopsamina, Monocrotalina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirquina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Trichodesmina	Não informado	234 para produtos de marca	Até 6,0
KAST et al., 2014)	Sim	Méis de Montanhas de Jura (Suiça) ( $n = 11$ ), Platô Suiço ( $n = 23$ ) e regiões alpinas ( $n = 37$ ). Origem botânica: poliflorais, uniflorais ( <i>Brassica</i> , <i>Tilia</i> , <i>Robinia</i> e <i>Castanea</i> ) e blends de méis florais e de melato,	Acetilechimidina e seu N-óxido, Echimidina e seu N-óxido, Echiumina e seu N-óxido, Echiuplatina e seu N-óxido, Echivulgarina e seu N-óxido, Heliotrina, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina, Retrorsina, Senkirquina, Senecionina, Senecifillina	Não informado	55 para méis poliflorais e de castanha de regiões alpinas	Até 26,0
(GRIFFIN et al., 2015a)	Não	Méis comerciais da Austrália ( $n = 48$ ), Tasmânia ( $n = 8$ ), Nova Zelândia ( $n = 1$ ), blends da Austrália e Nova Zelândia ( $n = 2$ ). Origem botânica: claros ( $n = 22$ ), florais ( $n = 25$ ), manuka ( $n = 4$ ) e orgânicos ( $n = 7$ )	Echimidina, Heliotrina, Licopsamina, Monocrotalina e seu N-óxido, Otosenina, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirquina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Trichodesmina	Echimidina (n.d – 28,08), Heliotrina (n.d – 121,0), Licopsamina (n.d – 867,0), Senecionina (n.d – 26,0) Senecifillina (n.d – 6,0) Demais (n.d)	932 para méis orgânicos da Austrália	Até 1,5

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017).

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Continuação.	
					Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
(GRIFFIN et al., 2015b)	Não	Méis de Supermercados ( $n = 68$ ), lojas de alimentos saudáveis ( $n = 62$ ), loja de produtos naturais ( $n = 15$ ), produtores locais ( $n = 5$ ) Origens geográficas: Nova Zelândia, Austrália, <i>blends</i> da EU e não UE, Espanha, <i>blends</i> da Austrália e Nova Zelândia, não UE, México e Bulgária, México, América do Sul	Echimidina, Heliotrina, Licopsamina, Monocrotalina e seu N-óxido, Otosenina, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido	Echimidina (n.d – 545,0), Licopsamina (n.d – 393,0), Senecionina (n.d – 8,4) Senecifillina (n.d – 5,7) Demais (n.d)	545 para méis de manuka da Nova Zelândia	Até 2,6
(VALESE et al., 2016)	Não	Méis comerciais do Brasil, estados de Santa Catarina ( $n = 45$ ), Paraná ( $n = 8$ ), Rio Grande do Sul ( $n = 10$ ), São Paulo ( $n = 7$ ), Rio de Janeiro ( $n = 2$ ), Minas Gerais ( $n = 8$ ), Mato Grosso do Sul ( $n = 1$ ), Espírito Santo ( $n = 4$ ), Bahia ( $n = 4$ ), Ceara ( $n = 1$ ), Para ( $n = 1$ ) e Piauí ( $n = 1$ )	Echimidina, Licopsamina+intermedina, Monocrotalina, Retrorsina, Senecionina, Retrorsina N-óxido Senecionina N-óxido	Echimidina (n.d – 17,7), licopsamina+intermedina (n.d – 21,8), Monocrotalina (n.d - 16), Retrorsina (n.d – 32,2), Senecionina (n.d - 180), Retrorsina N-óxido (nd – 55,7), Senecionina N-óxido (n.d - 248)	423	Até 3,3
(LUCATELLO et al., 2016)	Não	Méis poliflorais ( $n = 46$ ) e monoflorais ( $n = 16$ , acácia, castanha, lima e dente-de-leão) ou de melato da região de Veneto, Itália	Echimidina, Heliotrina, Licopsamina, Retrorsina, Senecionina, Senecifillina	Echimidina (0.3 - 1.0), Retrorsine (0.9 - 14.5), Senecionine (0,8 – 2,1), Seneciphylline (0,6 – 1,1) Demais (n.d)	17,8	Até 79,7

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017).

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Continuação.		
				Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
(CHUNG; LAM, 2017)	Não	Méis comerciais ( $n = 6$ ) de diferentes regiões (regiões de Kowloon, Novos territórios e ilha de Hong Kong)	Echimidina e seu N-óxido, Erucifolina seu N-óxido, Europina seu N-óxido, Heliotrina seu N-óxido, Intermedina seu N-óxido, Jacobina seu N-óxido, Lasiocarpina seu N-óxido, Licopsamina seu N-óxido, Monocrotalina seu N-óxido, Retrorsina seu N-óxido, Senkirkina, Senecionina seu N-óxido, Senecifillina seu N-óxido, Senecivernina seu N-óxido, Trichodesmina	Não informado	17,0	Até 83,5
(LETSYO et al., 2017)	Sim	Méis comerciais ( $n = 48$ ) de Ghana	Echimidina, Heliotrina e seu N-óxido, Intermedina, Lasiocarpina e seu N-óxido, Licopsamina, Monocrotalina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirkina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Tricodesmina,	Não informado	2639 para méis da região de Hoezo com 18% de polen de <i>Chromolaena odorata</i>	Até 0,5
(MARTINELLO et al., 2017)	Não	Méis comerciais ( $n = 40$ ) rotulados como Italianos ou <i>blends</i> de origem Européia. Origem botânica: multifloral e de acácia ( <i>Robinia pseudoacacia</i> )	Echimidina, Heliotrina, Intermedina, Lasiocarpina, Licopsamina, Retrorsina, Senkirkina, Senecionina, Senecifillina	Echimidina (0,4 – 3,3), Licopsamina (0,2 – 74,7) Demais (não informado)	Não informado	-
(ZHU et al., 2018)	Sim	Méis comerciais ( $n = 120$ ) de quatro regiões da China: Hong Kong, Macau, Shanghai e Beijing ( $n = 30$ /região)	Clivorina, Echimidina, Heliotrina, Integerrimina, Lasiocarpina, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina, Retrorsina e seu N-óxido, Riddelliina e seu N-óxido, Senkirkina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido	Clivorina (dq), Echimidina (dq), licopsamina (dq), Retrorsina (dq), senkirkina (dq) Demais (não informado)	Não informado	-

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017).

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Continuação.
						Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
(KOWALCZYK; KWIATEK, 2018)	Não	Méis Polifloral, acáci e de melato ( $n = 50$ ) da Polónia	Echimidina, Heliotrina, Intermedina, Jacobina, Lasiocarpina, Licopsamina, Retrorsina, Senkirkina, Senecionina, Senecifillina	Echimidina (3,3), Intermedina (4,8), Licopsamina (9,8), Retrorsina (1,1), Senecionina (1,0) Demais (n.d)	52,4	Até 27,1
(KOWALCZYK; SIERADZKI; KWIATEK, 2018)	Não	Méis polifloral do território polonês ( $n = 40$ ) e Asiático ( $n = 14$ )	Derivado de Heliotridina Derivado de Retronecina	Não informado	116,7	Até 12,2
(PICRON et al., 2019)	Sim	Méis comerciais, monoflorais e <i>blends</i> ( $n = 116$ ) adquiridos na Bélgica (todos de diferentes orifens geográficas), além de méis comerciais adquiridos na Turquia ( $n = 17$ ) e méis produzidos na região flamenga de Bélgica ( $n = 141$ ) e Valónia em Bruxelas ( $n = 233$ )	Echimidina e seu N-óxido, Erucifolina e seu N-óxido, Europina e seu N-óxido, Heliotrina e seu N-óxido, Indicina e seu N-óxido, Intermedine e seu N-óxido Jacobina e seu N-óxido, Lasiocarpina, e seu N-óxido, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirkina, Senecionina, Senecifillina e seu N-óxido, Senecivermina e seu N-óxido, Trichodesmina	Echimidina (63,0), Europina (49.0 – 135,0), Heliotrina (17,0), Licopsamina (90,0), Monocrotalina (ni), Senkirkina (23,55 – 42,44), Trichodesmina (ni) Demais (dq)	182 para mel orgânico de castanha da Grécia	Até 7,8

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017).

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Continuação.	
					Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
(CELANO et al., 2019)	Não	Méis comerciais de países europeus ( $n = 22$ ). Origem botânica: multifloral ( $n = 11$ ) e monofloral ( $n = 3$ acácia, $n = 2$ citros, $n = 2$ <i>sulla</i> , $n = 2$ eucaliptos, $n = 1$ tomilho, $n = 1$ lavanda, $n = 1$ alecrim, $n = 1$ cereja e $n = 1$ morango)	Echimidina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Licopsamina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senecionina e seu N-óxido	Echimidina (3,54 – 15,6), Echimidina N-óxido (1,98), Intermedina N-óxido (0,20), Intermedina (0,45 – 0,67), Licopsamina (0,08 – 0,58), Licopsamina N-óxido (0,12), Retrorsina (< 0,02), Retrorsina N-óxido (0,22), Senecionina (< 0,01 – 0,15), Senecionina N-óxido (0,10)	17,5	Até 81,4
(DRAIAIA et al., 2019)	Sim	Méis ( $n = 46$ ) poliflorais ( <i>Eucalyptus</i> , manuka, Fabaceae) produzidos em diferentes regiões da Argélia.	Echimidina, Heliotrina, Intermedina, Lasiocarpina, Licopsamina, Retrorsina, Senkirkina, Senecionina, Senecifillina	Echimidina (0-232), Heliotrina (0 – 8,0), Intermedina (0 – 26,0), Lasiocarpina (0 – 6,0), Licopsamina (0 – 21,0), Retrorsina (0 – 21,0), Senkirkina (0 – 9,0), Senecionina (0 – 3,0), Senecifillina (0 – 11,0)	258 para méis de <i>Echium</i> da região de Ain Assal	Até 5,5
(WANG et al., 2019b)	Não <sup>a</sup>	Méis comerciais ( $n = 32$ ) de trevo branco, flores silvestres, de urze, de maçã, ameixa e colza originárias de pelo menos 10 países, incluindo Espanha, Romênia, Argentina, Ucrânia, China, México, Brasil, Dinamarca e Nicarágua	Echimidina, Intermedina e seu N-óxido, Lasiocarpina e seu N-óxido, Licopsamina, Retrorsina e seu N-óxido, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido	Echimidina (< 1,07 – 3,4), Intermedina (< 0,81 – 11,1), Licopsamina (< 0,56 – 1,7), Retrorsina (1,6 – 8,2), Retrorsina N-óxido (< 1,27) Senecionina (0,91 – 2,4) Demais (nd)	14,2	Até 100
(SIXTO; NIELL; HEINZEN, 2019)	Não	Méis comerciais ( $n = 5$ )	Acetillicopsamina, Echimidina Echiumina, Licopsamina e seu N-óxido, Senecionina	Acetillicopsamina (22,0), Echimidina (15,0 – 44,0), Echiumina (14,0), Licopsamina (9,0 – 25,0), Licopsamina N-óxido (10,0 - 19,0), Senecionina (dq)	40,0	Até 35,5

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017); <sup>a</sup> informou a origem botânica e geográfica no rótulo. Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Continuação.	
					Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
(HUNGERFORD et al., 2019)	Não <sup>b</sup>	Méis ( $n = 465$ ) de supermercados de Queensland, lojas de frutas, mercados locais e produtores	Echimidina e seu N-óxido, Erucifolina e seu N-óxido, Europina e seu N-óxido, Heliotrina e seu N-óxido, Indicina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Jacobina e seu N-óxido, Lasiocarpine e seu N-óxido, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirkina e seu N-óxido, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Senecivernina e seu N-óxido, Trichodesmina	Echimidina (36,0), Europina (30,0), Europina N-óxido (11,0), Heliotrina (23,0), Heliotrina N-óxido (9,0), Indicina (120,0) Indicina N-óxido (86,0), Intermedina (32,0), Intermedina N-óxido (86,0), Lasiocarpine (20,0), Licopsamina (210), Retrorsina (20,0), Senecionina (13,0), Senecivernina (24,0). Demais (n.d)	3.300	Até 0,4
(CARPINELLI DE JESUS et al., 2019)	Não	Méis de supermercados de Queensland, lojas de frutas, mercados locais e produtores ( $n =$ não informado)	Echimidina e seu N-óxido, Erucifolina e seu N-óxido, Europina e seu N-óxido, Heliotrina e seu N-óxido, Indicina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Jacobina e seu N-óxido, Lasiocarpina e seu N-óxido, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirkina e seu N-óxido, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Senecivernina e seu N-óxido, Trichodesmine	Indicina (dq), Intermedina (dq), Indicina N-óxido (dq), Intermedina N-óxido (dq) Demais (n.d)	-	-
(HE et al., 2020)	Sim	Amostras ( $n = 255$ ) comerciais adquiridas em 17 regiões da China Continental e Taiwan	Clivorina, Echimidina, Heliotrina, Integerrimina, Lasiocarpina, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina, Retrorsina e seu N-óxido, Riddelliina e seu N-óxido, Senkirkina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido	dq	281,1	Até 5,0

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017); <sup>b</sup> com base nos perfis de AP, os méis são provenientes de *Parsonsia straminea* ou *Heliotropium amplexicaule*.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Continuação.	
					Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
(GOTTSCHALK et al., 2020)	Sim	Amostras ( $n = 437$ ) de 73 diferentes locais do distrito de Ostholstein, Alemanha	Echimidina e seu N-óxido, Erucifolina e seu N-óxido, Europina e seu N-óxido, Heliotrina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Jacobina e seu N-óxido, Lasiocarpina e seu N-óxido, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirkina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido	Echimidina (0,23 - 1,62), Echimidine N-oxide (0,10 - 0,60), Erucifolina (0,10 - 16,38), Erucifoline N-oxide (0,30 - 111), Intermedina (0,14 - 3,18), Intermedina N-óxido (0,16 - 6,1), Jacobina (0,12 - 503,9), Jacobina N-óxido (0,10 - 324,8), Licopsamina (0,14 - 2,8), Licopsamina N-óxido (0,11 - 4,95), Retrorsina (0,10 - 136,0), Retrorsina N-óxido (0,11 - 119,6), Senkirkina (0,10 - 0,34), Senecionina (0,20 - 481,5), Senecionina N-óxido (0,10 - 710,5), Senecifillina (0,23 - 609,0), Senecifillina N-óxido (0,10 - 629,9). Demais (n.d)	2912	Até 0,5
(BANDINI; SPISSO, 2021)	Não	Amostras ( $n = 80$ ) multiflorais (silvestre) e monoflorais (eucalipto, laranjeira, assa-peixe, morrão-de-candeia e cipó-uva) comerciais adquiridas no Rio de Janeiro, Brasil	Echimidina e seu N-óxido, Erucifolina e seu N-óxido, Europina e seu N-óxido, Heliotrina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Jacobina e seu N-óxido, Lasiocarpina e seu N-óxido, Licopsamina e seu N-óxido, Monocrotalina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirkina e seu N-óxido, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Trichodesmina	Senecionina (141,8) Demais (Não informado)	-	-
(VALESE et al., 2021)	Sim	Amostras de Bocaina do Sul ( $n=2$ ), São Joaquim ( $n=2$ ) e Urupema ( $n=2$ ), Estado de Santa Catarina, Brasil	Echimidina, Intermedina, Licopsamina, Monocrotalina, Retrorsina e seu N-óxido, Senecionina e seu N-óxido	Echimidina (9,60), Intermedina+licopsamina (3,1 - 10,7), Retrorsina N-óxido (2,1 - 15,6) Senecionina (53,7 - 307,0), Senecionina N-óxido (6,0 - 301,0). Demais (n.d)	623	Até 2,3

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017). Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

**Tabela 1.1** - Alcaloides pirrolizidínicos investigados em méis florais, informações sobre a origem botânica e geográfica, teores quantificados e percentuais de amostras contaminadas.

Estudos	Análise de pólen (sim/não)	Informações gerais das amostras	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos investigados	Alcaloides pirrolizidínicos e seu N-óxidos determinados ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou não detectados	Conclusão.	
					Soma máxima do total de AP e seu N-óxidos encontrados nos méis ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ingestão diária máxima do mel (g/dia) para uma pessoa com 60 kg, considerando a ingestão diária recomendada de 1.42 $\mu\text{g AP}$ em alimentos <sup>#</sup>
(LUCATELLO et al., 2021)	Não	Amostras adquiridas com apicultores da região de Basilicata ( $n=42$ ) e Veneto ( $n=547$ ) na Itália. Amostras comerciais italianas ( $n=93$ ) e estrangeiras ( $n=93$ ).	Echimidina e seu N-óxido, Heliotrina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Jacobina e seu N-óxido, Licopsamina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Senkirquina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Senecivernina e seu N-óxido, Senkirquina, Trichodesmina	Jacobina (n.d) Demais (Não informado)	911,4	Até 1,5
(PEARSON et al., 2021)	Sim	Amostras da Nova Zelândia de cinco diferentes safras: 2013/2014 ( $n=122$ ), 2016/2017 ( $n=65$ ), 2017/2018 ( $n=255$ ) e 2018/2019 ( $n=334$ )	Echimidina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Indicina Lasiocarpina e seu N-óxido Licopsamina e seu N-óxido, Retrorsina e seu N-óxido, Riddelliina, Senecionina e seu N-óxido, Senecifillina e seu N-óxido, Senecivernina e seu N-óxido e Senkirquina	Licopsamina+indicina+intermedina (nd – 1210,6), Licopsamina N-óxido +intermedina N-óxido (n.d – 1956,1), Echimidina (n.d - 494,3), Echimidina N-óxido (n.d – 421,3), Retrorsina (nd - 1300), Retrorsina N-óxido (n.d – 29,2), Senecionina (n.d – 17,0), Senecifillina (n.d -71,3) Senecifillina (n.d -21,3) Senkirquina (n.d – 12,0). Demais (n.d)	2277,0	Até 0,6
(RIZZO et al., 2022)	Não	Amostras adquiridas no mercado ( $n=51$ ) e de apicultores ( $n=20$ ) da Itália	Echimidina e seu N-óxido, Intermedina e seu N-óxido, Licopsamina, Retrorsina e seu N-óxido, Senecionina e seu N-óxido	Echimidina (1,64) e seu N-óxido (0,1), Intermedina (3,6) e seu N-óxido (< LOD), Licopsamina (0,5), Retrorsina (0,2) e seu N-óxido (0,2), Senecionina (0,3) e seu N-óxido (0,1)	4,3	> 5,0

Legenda: (-) - não investigado; n.d - não detectado nas amostras; dq – dado qualitativo indicando que foi detectado nas amostras, mas não foram relatados valores de quantificação; \* representa a soma da intermedina e licopsamina; <sup>#</sup> de acordo com a recomendação de ingestão diária da EFSA (2017).

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021a).

A partir das informações apresentadas na Tabela 1.1, 25 AP e 20 N-óxidos foram investigados em méis mono e multiflorais de diferentes origens geográficas. Os AP mais investigados foram echimidina, licopsamina, retrorsina, senecionina, senecifilline, heliotrina, senkirquina, intermedina, lasiocarpina e monocrotalina, enquanto os N-óxidos foram senecionina, retrorsina, monocrotalina e senecifilina. De acordo com as informações disponíveis em cada estudo, pelo menos um dos AP investigados foi encontrado nos méis e a contaminação das amostras (quando informadas) variou de 17% (LUCATELLO et al., 2016) a 91,3% (VALESE et al., 2016). Na maioria dos casos, echimidina e licopsamina foram os principais AP responsáveis pela contaminação dos méis, porém, alguns estudos também atribuíram essa contaminação a clivorina, indicina, retrorsina e senecionina (GRIFFIN et al., 2015a, 2015b; HE et al., 2020; HUNGERFORD et al., 2019; KOWALCZYK; KWIA TEK, 2018; LETSYO et al., 2017; MARTINELLO et al., 2017; VALESE et al., 2016; ZHU et al., 2018). Ainda são escassos estudos de avaliação e monitoramento de AP em méis de melato (KAST et al., 2014; KOWALCZYK; KWIA TEK, 2018), talvez porque estes méis não são provenientes do néctar e/ou pólen das flores e, portanto, estão sendo negligenciados em termos da presença de AP.

Nesta revisão foram enfrentados alguns desafios para extrair todas as informações dos trabalhos apresentados na Tabela 1.1. Embora os AP determinados sejam geralmente os mesmos na maioria dos estudos, as informações reportadas foram de diferentes formas, tornando difícil de agrupar e discutir estudos que apresentam informações similares no texto desta revisão. Ainda assim, muitos estudos não deixam claro se todos os AP investigados foram quantificados; Muitas vezes não relatam as concentrações individuais de cada AP em cada amostra; e outros preferem apresentar apenas as porcentagens de AP mais abundantes mesmo não sendo o que foi encontrado em maior concentração. Nesse sentido, a discussão dos dados se tornou complexa, o que pode ser uma consequência negativa para a consulta e tomada de decisões futuras por agências reguladoras de alimentos.

A maioria dos méis investigados (Tabela 1.1) são de origem comercial e adquiridos de produtores locais ou em supermercados da Alemanha, Itália, Suíça, União Europeia, Austrália, Brasil, Espanha, México, Bélgica, China, Nova Zelândia e Queensland. No entanto, independentemente da origem geográfica, os méis não apresentaram um perfil de composição de AP. Principalmente para echimidina e licopsamina, que mesmo sendo os AP encontrados em maiores concentrações em alguns méis, variando de 169 a 545  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 210 a 867  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (DRAIAIA et al., 2019; GRIFFIN et al., 2015a, 2015b; HUNGERFORD et

al., 2019; MARTINELLO et al., 2014), em outros méis, os teores destes compostos não ultrapassaram  $63 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (GOTTSCHALK et al., 2020; PICRON et al., 2019; VALESE et al., 2021). Para indicina e heliotrina também foram encontrados concentrações de até  $120 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $121 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (GRIFFIN et al., 2015a; HUNGERFORD et al., 2019).

Os AP são metabólitos secundários restritos a algumas espécies de plantas e, portanto, além da origem botânica, condições climáticas e ambientais, bem como a fase de crescimento das plantas, são fatores que podem influenciar na composição e concentração desses compostos (HARTMANN; OBER, 2000). Geralmente, os apicultores alocam as colmeias em regiões e estações do ano mais conhecidas para as abelhas forragearem, mas na maioria das vezes podem ter um conhecimento empírico sobre as floradas predominantes. A análise de pólen em méis, além de caracterizar a flora visitada por abelhas (VON DER OHE et al., 2004), pode ser de fundamental importância para identificar quais espécies contribuíram para a presença de AP neste produto.

Embora exista um número considerável de estudos de AP em méis, ainda são limitadas informações sobre origem botânica e sua relação com os teores de AP (Tabela 1.1). Aproximadamente 30% dos estudos apresentados na Tabela 1.1 realizaram análise de pólen nos méis. No estudo de Zhu et al. (2018), os méis investigados tinham pólenes de *Echium vulgare*, *E. Plantagineum* e *Cynoglossum officinal*, que são espécies da família Boragiaceae e *Senecio* sp., e *Tussilago* sp. que pertencem à família Asteraceae. Em relação aos AP identificados nos méis foi realizada a análise de pólen, os resultados indicaram que para a família Boraginaceae, os AP predominante foram licopsamina, echimidina e retrorsina, enquanto para a família Asteraceae foram senkirquina, licopsamina, retrorsina e senecionina. A intermedina também foi associada como um AP típico das espécies pertencentes a Asteraceae, como *Eupatorium*, e Boraginaceae, que além de *Echium*, também inclui os gêneros *Anchusa*, *Borago* e *Symphytum* (DRAIAIA et al., 2019). Nos méis avaliados por Letsyo et al. (2017) indicaram que os níveis mais altos da soma dos AP ( $0,1$  a  $2639 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) foram para aqueles que tinham pólen de *Chromolaena odorata* (1-18%) do que aqueles méis que tinham *Ageratum* sp. ( $1,4$  a  $173,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e *Eupatorium* sp. ( $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Embora métodos analíticos robustos e sensíveis já existam para determinar AP em méis (CELANO et al., 2019; VALESE et al., 2016), ainda não foram encontrados que contemplam análises de pólen em méis e de AP em méis e plantas (coletadas próximas das colmeias) para avaliar a influências das espécies (pólen e/ou néctar) nos teores de AP em méis.

Principalmente considerando mais de uma coleta das amostras, visto que, o período de floração e produção desses méis pode ocorrer por diversos meses. Um estudo que se aproximou desta observação foi o de Valse et al. (2021), o qual compreendeu a coleta de uma amostra de mel de três regiões catarinenses, além de análise de pólen, de AP em méis e em *Senecio brasiliensis*. No entanto, a contribuição de pólen de *Senecio* sp. nos méis foi inferior a outras espécies (*Baccharis* sp., *Senecio* sp., *Vernonia* sp., *Crotalaria* sp., *Mimosa scabrella*, *Echium* sp.) pertencentes a famílias que produzem ou podem produzir AP. Mesmo com soma de AP inferiores a 122 e 49,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  nos méis de São Joaquim e Bocaina do Sul, nestas amostras de méis, foram encontrados elevadas contribuições de pólen de *Mimosa scabrella* (70,2 e 85,9 %) (VALESE et al., 2021). Além disso, foi observado que os méis com maiores somas de AP foram aqueles que tinham a contribuição de pólen de mais espécies de Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae (VALESE et al., 2021).

Mesmo na ausência de análise de pólen nos méis, alguns estudos também sugerem possíveis plantas que podem ser fontes de AP e que transferem este composto para os méis. De acordo com Hungerford et al. (2019) e Carpinelli De Jesus et al. (2019), com base nos perfis de AP e seus N-óxidos identificados (licopsamina, licopsamina N-óxido, indicina, intermedina e echimidina) nos méis e em espécies de *Parsonsia straminea* (licopsamina predominante) e *Heliotropium amplexicaule* (indicina predominante), os autores sugeriram que estas espécies provavelmente contribuem fortemente para a presença dos AP em méis.

O número de produtos de origem vegetal ou vegetal-animal contemplados na atual regulamentação para AP (EUROPEAN COMMISSION, 2020) ainda é muito restrito, no entanto, entre as mais diversas matrizes estudadas, estas são as que comumente possuem relato de níveis mais elevados de AP. Apesar disso, até o momento, não existe regulamentação para AP em méis. Com base nas recomendações de ingestão diária de AP em alimentos e uma estimativa de consumo diário de 20g de mel (~2 colheres de sopa) por um adulto de 60 kg, a soma dos AP em cada amostra deve ser inferior a 21  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (EFSA, 2011) ou 71,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (EFSA, 2017), respectivamente. Sendo assim, com base nos estudos apresentados na Tabela 1.1, entre 2014 e 2017, a soma de AP foi superior a 21  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , incluindo todas as amostras ( $n=84$ ) adquiridas no supermercado de Berlin (BODI et al., 2014), além de *blends* provenientes da União Europeia/não União Europeia ( $n=31$ ) (MARTINELLO et al., 2014) e de outras origens geográficas e botânicas ( $n=21-34$ ) (GRIFFIN et al., 2015a, 2015b; LETSYO et al., 2017). É importante destacar que apenas uma das 28 amostras provenientes da região dos Alpes Suíços apresentou soma de AP > 21  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (KAST et al., 2014). Por outro lado, para os

estudos publicados após 2018 (Tabela 1.1), seis dos 14 estudos ultrapassaram a soma de 71,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AP, especialmente méis ( $n=8$ ) da Alemanha (GOTTSCHALK et al., 2020) e outros méis comerciais ( $n=391$ ) (HUNGERFORD et al., 2019).

No Brasil, entidades do setor apícola e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística não possuem dados sobre consumo ou estimativa de consumo de mel. Na Alemanha o consumo médio e alto de mel é estimado em 0,05 e 0,28 g/kg peso corpóreo por dia, respectivamente. Isso corresponde ao consumo de 3 ou 16,8 g de mel por um adulto com 60 kg (GOTTSCHALK et al., 2020). Nesse caso, se considerar uma ingestão diária de 3 ou 16,8 g de mel e a recomendação de ingestão diária de 1,42  $\mu\text{g}$  de AP/dia (EFSA et al., 2017), a soma de AP no mel não deve ultrapassar de 473,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ou 84,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. A quantidade de ingestão diária de mel pode variar de acordo com a soma de AP detectados em méis. Se a ingestão diária máxima recomendada de AP é de 1,42  $\mu\text{g}/\text{dia}$  (pessoa de 60 kg) (EFSA, 2017), então para méis com a soma máxima de AP de 2639 ou 932  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Tabela 1.1) deve ser limitada a uma ingestão de 0,4 e 1,5 g do mel, respectivamente. Dos 21 estudos que apresentaram soma máxima de AP nos méis (Tabela 1.1), para 67% destes o consumo diário de mel por uma pessoa com 60kg está restrito entre 0,43 e 12,2 g, ou seja, são méis que apresentaram uma soma de AP mais alarmantes (entre 3300 e 116,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Embora seja recomendado consumir até 1,42  $\mu\text{g}$  de AP por dia (para alimentos) para evitar possíveis intoxicações agudas (BFR, 2018; EFSA, 2017), ainda não há registros de casos de intoxicação aguda ou crônica em humanos por AP após o consumo de méis ou outros produtos da colmeia. No entanto, o risco potencial que esses compostos representam para os consumidores de méis, outros produtos da colmeia ou de origem vegetal é latente. Esse potencial risco é ainda mais preocupante ao considerar as crianças que consomem mel (EFSA, 2011, 2019). Além do consumo direto, o mel também encontra espaço na gastronomia, usado como ingrediente na confeitaria e produtos de panificação. Portanto, os AP presentes em uma ampla variedade de alimentos processados podem representar um risco iminente para a saúde dos consumidores.

A Comissão Europeia possui um Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Alimentação (RASFF do inglês, *Rapid Alert System for Food and Feed*), que permite compartilhar informações de maneira eficiente entre seus membros (autoridades nacionais de segurança alimentar dos Estados-Membros, Comissão Europeia, EFSA, Noruega, *Liechtenstein*, Islândia e Suíça) e garantir uma rápida resposta quando riscos para a saúde pública são detectados na cadeia alimentar. Antes de ser disponibilizada uma notificação no RASFF, alguns aspectos são considerados: desde a inspeção de um produto no mercado ou na

fronteira até o fornecimento de detalhes das descobertas e qual o tipo de medida tomada. Até a presente data, apenas uma notificação foi encontrada no RASFF (2016 - *Notification details - 2016.1484*), a qual foi emitida pela Alemanha sobre a presença de AP (soma de 454,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em mel proveniente do México.

Estudos de estabilidade dos AP e seus N-óxidos, principalmente em matrizes como méis, ainda são escassos. Extratos de matriz branca fortificada (1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  e temperatura ambiente por vários dias (1, 2, 5, 10, 15 e 30) não interferiram apresentaram diminuição significativa ( $p > 0,05$ ) nos teores de AP, mas após 30 dias, Valese et al. (2016) observaram que os extratos armazenados a temperatura ambiente apresentaram uma mudança no perfil cromatográfico devido ao surgimento de picos não identificados. Em outro estudos, extratos de matriz branca fortificadas (20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), armazenadas por dias (1, 2, 3, 8, 15 e 32) e temperaturas ( $-18$ ,  $4$  e  $20^{\circ}\text{C}$ ) diferentes indicaram que os teores de AP permaneceram estáveis por até 5 dias quando armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  e  $4^{\circ}\text{C}$ , mas com alterações a  $20^{\circ}\text{C}$  (KOWALCZYK; SIERADZKI; KWIATEK, 2018). Uma diminuição de 20% na soma dos N-óxidos de AP foi observada para méis armazenados por um dia a  $20^{\circ}\text{C}$  e 34% após sete dias, enquanto os teores de AP permaneceram estáveis a mesma temperatura e por 182 dias (KALTNER et al., 2018). Apesar de ainda não estar claro em que momento inicia ou ocorre a redução de N-óxidos - ainda no néctar, depois de ser coletado pela abelha, ou no favo de mel - os autores sugerem que seja resultado da presença de enzimas digestivas das abelhas. Entre os N-óxidos avaliados por Kaltner et al. (2018), a europina, heliotrina e lasiocarpina foram mais resistentes pois apresentaram perdas de 73%, 78% e 69%, respectivamente (após 14 dias de armazenamento a  $20^{\circ}\text{C}$ ) quando comparado aos N-óxidos a jacobina e erucifolina. Portanto, estudos futuros de estabilidade de AP em méis poderiam indicar o melhor tempo de armazenamento para minimizar o conteúdo desses compostos neste produto.

O monitoramento constante dos teores de AP em méis é essencial para contribuir para a manutenção da qualidade desse produto e também para dar subsídio a novas e futuras políticas manejo nos apiários e das vegetações, de fortalecimento de ações de pesquisa e controle em toda cadeia produtiva apícola.

### 2.3 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM PLANTAS APÍCOLAS

Os AP são compostos secundários produzidos por alguns gêneros de plantas, estes presentes em espécies de distribuição filogenética restritos as angiospermas (OBER;

HARTMANN, 1999). Portanto, esta classe de alcalóides geralmente é encontrada em gêneros das famílias de plantas Asteraceae (tribos Eupatorieae e Senecioneae), Boraginaceae (tribos Boragineae, Echiochileae, Lithospermeae e Cynoglosseae) e Fabaceae (tribo Crotonarieae) (AHMAD et al., 2018; EL-SHAZLY; WINK, 2014; OBER; HARTMANN, 1999). Desta maneira, qualquer alimento que tenha sido produzido por partes destas famílias poderá conter AP. Além disso, quanto mais próxima a relação do alimento com a planta, maior será a probabilidade de detectar AP no produto final (EFSA, 2011).

Nas plantas, os AP são transportados na forma de seus N-óxidos (polares) por meio do floema e, portanto, podem ser encontrados em todos os tecidos da planta (LEEPER; VEDERAS, 2007). Os locais onde ocorre a biossíntese desses compostos nas plantas parece ser dependente das espécies, mas geralmente são encontrados em diferentes partes, desde a raiz até as flores (FRÖLICH; HARTMANN; OBER, 2006; LEEPER; VEDERAS, 2007). Mesmo sendo escasso estudo que indiquem a preferência por locais de acúmulo ou armazenamento de AP, bem como de transferência desses compostos entre plantas, Hartmann et al. (1989) reportaram que quantidades consideráveis de senecionina N-óxido foram acumuladas em inflorescências de *Senecio vulgaris*. Além disso, Selmar et al. (2019) também reportaram a transferência de AP de *Senecio jacobaea* para *Petroselinum crispum* (salsa) após ambas serem cultivadas no mesmo recipiente por dez semanas.

Diversas espécies de plantas produtoras de AP e seus N-óxidos (CARPINELLI DE JESUS et al., 2019; KAST et al., 2018; NEDELICHEVA; KOSTOVA; SIDJIMOV, 2015b; SKONECZNY et al., 2015) desenvolvem-se e crescem em sistemas de produção agrícola. Portanto, é compreensível que os AP sejam transferidos para outros locais das plantas, mas também para diversos alimentos. O consumo de espécies com AP pelos animais (aves, bovinos e abelhas) vem demonstrando uma transferência relativamente baixa desses compostos para o leite, ovos e carnes (CHUNG; LAM, 2017; HOOGENBOOM et al., 2011; MULDER et al., 2020), porém mais significativas para os produtos apícolas, especialmente em pólen e méis (BRUGNEROTTO et al., 2021a; INACIO et al., 2020; LUCATELLO et al., 2021; VALESE et al., 2021).

A flora apícola é composta por espécies vegetais que oferecem néctar, pólen ou secreções às abelhas (ALMEIDA et al., 2003; CAMARGO, 2002; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011), e esta pode diferenciar de acordo com o tipo de vegetação, das condições edafoclimáticas e das próprias regiões geográficas (SALOMÉ; ORTH, 2004; SANTOS et al., 2006). Nesse sentido, muitas espécies podem ser consideradas plantas apícolas quando estas

são visitadas pelas abelhas na procura de recursos nectaríferos e/ou polínicos (CARVALHO; MARCHINI, 1999). A espécie *Echium plantagineum*, de origem mediterrânea e conhecida mundialmente por ser responsável pela produção em larga escala de mel, também se tornou mais conhecida na década de 80 pelo relato da presença de AP de méis de *Echium plantagineum* (EDGAR et al., 2011). Muitas outras espécies de plantas que contém AP, tais como, *Senecio*, *Eupatorium*, *Heliotropium*, *Borago*, *Myosotis*, *Ageratum*, *Tussilago*, *Symphytum*, entre outras, também são utilizadas em sistemas de produção apícola como fonte ofertante de néctar e pólen às abelhas para a produção de mel (EDGAR; ROEDER; MOLYNEUX, 2002).

Na Tabela 1.2 foram sumarizados estudos que possuem relação entre a presença de pólen de determinadas espécies de plantas presentes no mel e a investigação de AP na mesma espécie, porém realizada por um distinto grupo de investigadores. Considerando que os AP são metabólitos secundários, sabe-se que, além as diferentes espécies de plantas, a composição e a concentração desses compostos podem variar de acordo com as condições climáticas e ambientais, estágio de crescimento, idade e parte das plantas (BODI et al., 2014; MEDICINES AGENCY, 2014). Além disso, as mesmas espécies que crescem em diferentes locais podem conter diferentes AP (MEDICINES AGENCY, 2014). No entanto, apesar de existirem diferentes características entre os estudos reportados na Tabela 1.2, o principal objetivo é demonstrar o panorama, de maneira geral, das diversificadas espécies de plantas que podem ser consideradas plantas apícolas ou melíferas, além de atentar para os trabalhos que vem sendo realizados a fim de elucidar a presença e os teores de AP nas espécies vegetais.

**Tabela 1.2** - Pólens de Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae encontrados em méis e estudos que investigaram alcaloides pirrolizidínicos (AP) em partes destas plantas.

Continuação

Pólen plantas identificados em mel	Referências	AP investigados nas espécies de plantas (pólen, néctar ou partes da planta)	Referências
<b>Asteraceae</b>	(LAU; BRYANT; RANGEL, 2018; PICRON et al., 2019; PUUSEPP; KOFF, 2014)	-	-
<i>Ageratum</i> sp. <sup>a</sup>	(LETSYO et al., 2017)	Licopsamina, licopsamina N-óxido, dihidro-licopsamina, dihidro-licopsamina N-óxido, acetil-licopsamina e acetil-licopsamina N-óxido	(BOSI et al., 2013) <sup>a</sup>
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Baccharis</i> sp.	(HAIDAMUS et al., 2019; RAMALHO et al., 1991; VALESE et al., 2021)	-	-
<i>Bidens</i> sp.	(DA LUZ; BARTH, 2012) Da Luz, Barth, (2012)	-	-
<i>Centaurea</i> sp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Cichorium intybus</i>	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Cirsium vulgare</i>	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Chuquiraga</i> sp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Chromolaena odorata</i>	(LETSYO et al., 2017)	Acetil-echimidina, Echinatina, Rinderina, Licopsamina, Intermedina, Supinina, Angeloylretronecina	(BILLER et al., 1994)
<i>Cyclolepis genistoides</i>	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Eupatorium</i> sp.	(KEMPF et al., 2008, 2011) (DA LUZ; BARTH, 2012; DÜBECKE; BECKH; LÜLLMANN, 2011; HAIDAMUS et al., 2019; KAST et al., 2014; LETSYO et al., 2017)	Vulgarina-N-óxido, Senecifilina N-óxido, Senecionina N-óxido, Sarracina N-óxido, Retrosrina N-óxido, Retronecina N-óxido, Platinecina N-óxido, Lasiocarpina N-óxido, Integerrimina N-óxido, Heliotrina N-óxido, Erucifolina N-óxido, Echivulgarina N-óxido, Echiuplatina N-óxido, Echiumina N-óxido, Echimidina N-óxido, Vulgarina, Senecionina, Lasiocarpine, Integerrimina, Heliotrina, Echivulgarina, Echimidina	(BOPPRÉ et al., 2008)
<i>Elephantopus mollis</i>	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Gochnatia</i> sp.	(DA LUZ; BARTH, 2012; HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Montanoa</i> sp.	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-

Legenda: <sup>a</sup> – *Ageratum conyzoides*.

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 1.2** - Pólens de Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae encontrados em méis e estudos que investigaram alcaloides pirrolizidínicos (AP) em partes destas plantas.

Continuação

Polens em mel	Referências	AP investigados nas espécies de plantas (pólen, néctar ou partes da planta)	Referências
<i>Mikania</i> sp.	(BANDEIRA; DE NOVAIS, 2020)	-	-
<i>Onopordum acanthium</i>	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Parthenium</i> sp.	(DHAWAN; PAWAR; LOKHANDE, 2018)	-	-
<i>Senecio</i> sp.	(DÜBECKE; BECKH; LÜLLMANN, 2011; FORCONE, 2008; HAIDAMUS et al., 2019; KAST et al., 2014; KEMPF et al., 2011; VALESE et al., 2021; ZHU et al., 2018)	Echivulgarina , echivulgarina N-óxido, equimidina, equimidina N-óxido, vulgarina, vulgarina N-óxido, echiumina, echiumina N-óxido, equiuplatina N- óxido, echinatina N-óxido, echiuplatine, intermedina, licopsamina, echinatina, sarracina, sarracina N-óxido, senecionina, senecionina N-óxido, erucifolina N- óxido	(BOPPRÉ et al., 2008; KAST et al., 2018)
<i>Senecio brasiliensis</i>	-	Intermedina+licopsamina, monocrotalina, equimidina, senecionina, senecionina N-óxido, retrorsina e retrorsina N-óxido, integerrimina usaramina, senecivernina, riddliina, senkirkina, otonesina, florosenina, doronina	(KREBS; CARL; HABERMEHL, 1996; NEDELICHEVA; KOSTOVA; SIDJIMOV, 2015a; TRIGO et al., 2003; VALESE et al., 2021)
<i>Tussilago</i> sp.	(ZHU et al., 2018)	Senecionina, senecifilina, integerrimina e senquirquina	(NEDELICHEVA, KOSTOVA; SIDJIMOV, 2015)
<i>Taraxacum officinale</i>	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Vernonia</i> sp.	(BANDEIRA; DE NOVAIS, 2020; DA LUZ; BARTH, 2012; HAIDAMUS et al., 2019; VALESE et al., 2021)	-	-
<b>Fabaceae</b>	(FORCONE, 2008; LAU; BRYANT; RANGEL, 2018; PAREDES; BRYANT, 2019; PICRON et al., 2019; PUUSEPP; KOFF, 2014)	-	-
<i>Acacia</i> sp.	(BANDEIRA; DE NOVAIS, 2020; FORCONE, 2008; HAIDAMUS et al., 2019; WANG et al., 2019a)	-	-
<i>Adesmia</i> sp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Anadenanthera sp.</i>	(HAIDAMUS ET AL., 2019)	-	-
<i>Cassia bicansularis</i>	(DHAWAN, PAWAR, LOKHANDE, 2018)	-	-
<i>Copaifer</i> sp.	(HAIDAMUS ET AL., 2019)	-	-

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 1.2** - Pólens de Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae encontrados em méis e estudos que investigaram alcaloides pirrolizidínicos (AP) em partes destas plantas.

Continuação

Polens em mel	Referências	AP investigados nas espécies de plantas (pólen, néctar ou partes da planta)	Referências
<b>Fabaceae</b>			
<i>Crotalaria</i> sp.	(VALESE et al., 2021)	Monocrotalina, tipo senecionina, tipo retronecina.	(FLORES; TOZZI; TRIGO, 2009a; RECH et al., 2022; SCUPINARI et al., 2020)
<i>Cesalpinia</i> sp.	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Cytisus scoparius</i>	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Desmodium</i> sp.	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Lathyrus</i> sp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Lotus</i> sp.	(FORCONE, 2008; MOAR, 1985)	-	-
<i>Lupinus</i> sp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Machaerium</i> sp.	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	(BANDEIRA; DE NOVAIS, 2020; HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Mimosa invisa</i>	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Mimosa pudica</i>	(DA LUZ; BARTH, 2012; ORSO et al., 2016)	-	-
<i>Mimosa verrucosa</i>	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Mimosa scabrella</i>	(RAMALHO et al., 1991; VALESE et al., 2021)	-	-
<i>Piptadenia</i> sp.	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Pisum</i> sp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Prosopis</i> spp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	(FORCONE, 2008)	-	-
<i>Schizolobium</i> sp.	(HAIDAMUS et al., 2019)	-	-
<i>Senna</i> sp.	(VALESE et al., 2021)	-	-
<i>Trifolium pratense</i> L.	(FORCONE, 2008; KAST et al., 2019)	-	-
<i>Trifolium repens</i>	(KAST et al., 2019; MOAR, 1985)	-	-
<i>Trifolium</i> spp.	(FORCONE, 2008; PUUSEPP; KOFF, 2014)	-	-
<i>Vicia</i> spp.	(FORCONE, 2008)	-	-
<b>Boraginaceae</b>			
<i>Cynoglossum officinal</i>	(ZHU et al., 2018)	Traquelantamina, Viridiflorina, Rinderina, Equinatina, 3-acetilequinatina, Amabilina, 7-Angeloilheliotridina e Heliosupina	(VAN DAM et al., 1995)

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 1.2** - Pólens de Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae encontrados em méis e estudos que investigaram alcaloides pirrolizidínicos (AP) em partes destas plantas.

Polens em mel	Referências	AP investigados nas espécies de plantas (pólen, néctar ou partes da planta)	Referências
<b>Boraginaceae</b>			
<i>Echium</i> sp.	(DÜBECKE; BECKH; LÜLLMANN, 2011; KAST et al., 2014; KEMPF et al., 2008, 2011; LUCCHETTI et al., 2016; MOAR, 1985)	Equimidina, Equimidina N-óxido, Acetilequimidina, Acetilequimidina N-óxido, vulgarina, vulgarina N-óxido, equivulgarina N-óxido, acetilvulgarina e acetilvulgarina N-óxido	(TAMARIZ et al., 2018)
<i>Echium plantagineum</i>	(ZHU et al., 2018)	Leptantina, Equimiplatina, Uplandicina, Intermedina, Licopsamina, 7-Angeloilretronecina, 7-O-Acetillicopsamina/intermedina, 9-O-Angelilretronecina, Echiuplatina, Equimidina, 3-O-Acetilequimidina, Equiumina, 3-O-Acetilequimina, todos N-óxidos	(COLEGATE et al., 2005)
<i>Echium vulgare</i>	(PICRON et al., 2019; ZHU et al., 2018)	Leptantina, Equimiplatina, Uplandicina, Intermedina, Licopsamina, 7-Angeloilretronecina, 7-O-Acetillicopsamina, 9-O-Angelilretronecina, Equimidina, Equiplatina, 3-O-Acetilequimina, Equiumina, 3-O-Acetilequiumina, todos N-óxidos	(BOPPRÉ et al., 2008; SKONECZNY et al., 2015)
<i>Heliotropium amplexicaule</i>	(CARPINELLI DE JESUS et al., 2019)	Acetilequimidina, Equimidina, Equiumina, Equiumina N-óxido, Equivulgarine, Heliotrina, Intermedina, Licopsamina, Senecionina, Senecionina N-óxido, 7-O-acetilvulgarina-N-óxido, Acetil-equimidina-N-óxido, Equimidina-N-óxido, Equimiplatina-N-óxido, Equivulgarina N-óxido, Lasiocarpina N-óxido, Leptantina-N-óxido, Vulgarina, Vulgarina-N-óxido, Echiuplatina N-óxido, Echinatine N-óxido, Erucifolina N-óxido, Sarracina, Sarracina N-óxido	(BOPPRÉ et al., 2008; BOPPRÉ; COLEGATE; EDGAR, 2005; KAST et al., 2018)
<i>Myosotis</i> spp	(FORCONE, 2008; KAST et al., 2014)	Intermedina, Indicina e helioamplexina	(CARPINELLI DE JESUS et al., 2019)
		Licopsamina e seu N-óxido	(MICHEL; RAEZKE, 2009)

Fonte: Próprio autor.

Conforme observado (Tabela 1.2), espécies das famílias Boraginaceae (*Echium* sp., *Echium plantagineum*, *Echium vulgare*, *Heliotropium amplexicaule*, entre outras) e Asteraceae (*Senecio* spp., *Tussilago* spp. *Eupatorium* spp.) são cientificamente as mais exploradas, tanto para produção de mel, bem como para a investigação de AP. Por outro lado, muitas outras espécies encontradas nos méis não foram avaliadas em relação aos teores de AP.

Recentemente, alguns pesquisadores fizeram um levantamento da ocorrência e distribuição de plantas produtoras de AP no Brasil (BANDINI; SIANI; SPISSO, 2020). Todos os gêneros botânicos conhecidos por produzir estes compostos foram inicialmente compilados pelos autores a partir do banco de dados *RIKILT Institute of Food Safety*. Esse Instituto, além de realizar pesquisas sobre detecção de substâncias em alimentos que podem ter efeitos negativos sobre humanos e animais, também possui um banco de dados de gêneros e espécies botânicas do continente europeu que contém substâncias tóxicas, incluindo os AP. Portanto, após Bandini, Siani & Spisso, (2020) realizarem esta compilação, os dados foram comparados com o Programa REFLORA/CNPq e com o Herbário Virtual da Flora e dos Fungos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia. Neste levantamento, e especialmente no Estado de Santa Catarina, foram encontrados registros da ocorrência de *Erechtites*, *Eupatorium*, *Senecio* (todas Asteraceae), *Borago*, *Cynoglossum*, *Echium*, *Heliotropium*, *Symphytum* (todas Boraginaceae), *Crotalaria* (Fabaceae), consideradas espécies produtoras de AP de acordo com o *RIKILT*. Apesar de algumas destas espécies terem sido avaliadas em relação aos AP (Tabela 1.2), ainda existem inúmeras outras com potencial apícola, provenientes de famílias produtoras de AP, que ainda não foram estudadas. Estudos da diversidade local de flora para abelhas são importantes porque possibilitam a identificação das espécies que constituem a pastagem apícola da região e reconhecem aquelas que contribuíram para o suprimento de alimentos para as abelhas durante a entressafra, e também auxiliam na identificação daquelas que podem representar potencial risco para a cadeia produtiva. A falta ou ineficiência do mapeamento de espécies próximas de colmeias, especialmente para produção de produtos apícolas, pode ser um dos principais fatores que dificultam na identificação da contribuição botânica destas nos produtos apícolas, mas de estudos de mapeamento de substâncias potencialmente tóxicas, como os AP, nestas matrizes

No Estado de Santa Catarina, a produção apícola, especialmente de méis diversificados, tem grande impacto na economia (ABEMEL, 2022; IBGE, 2020). Apesar da vasta gama de produção de produtos das abelhas no Estado catarinense, a rastreabilidade de produção, de qualidade e econômica se concentra nos méis proveniente de exsudato de bracingas (*Mimosa scabrella*) e de inúmeras flores. No entanto, na maioria das vezes, as

espécies botânicas não são identificadas no produto (análise de pólen) e/ou ambiente de produção dos méis florais. Devido a essa deficiência, ainda são desconhecidas análises de AP nas plantas com potencial apícola, à exceção de *Senecio brasiliensis* (VALESE et al., 2021). Embora diversas espécies de plantas sejam exploradas pelas abelhas para a produção de mel, ainda são escassos os estudos científicos que tenham explorado essas espécies para avaliar quais os AP e em que concentração estão presentes nas plantas. Nesse sentido, práticas de manejo ou mitigação para reduzir a exposição de animais a AP e, conseqüentemente minimizar a produção de alimentos com elevados teores de AP poderia ter um efeito positivo para diminuir a concentração de AP no mel (CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS, 2013).

## CAPÍTULO II

### 2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MÉIS FLORAIS PROVENIENTES DO MONITORAMENTO DE COLMEIAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Informações deste capítulo estão publicadas em: BRUGNEROTTO, P., SILVA, B., SERAGLIO, S. K. T., SCHULZ, M., BLAINSKI, B., DORTZBACH, D., GONZAGA, L. V., FETT, R., COSTA, A. C. O. Physicochemical characterization of honeys from Brazilian monitored beehives. **European Food Research and Technology**. v. 247, p. 2709–2719, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03805-y>

#### Resumo

Este estudo avaliou amostras de mel ( $n=14$ ) oriundas de um projeto inovador e pioneiro de monitoramento digital de colmeias no Brasil a fim de caracterizá-las quanto à umidade, acidez, pH, condutividade elétrica, 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), atividade diastásica, frutose, glicose, sacarose e minerais (K, Ca, Na, Mg e Mn). Os resultados de algumas amostras não atenderam os limites estabelecidos no regulamento vigente para identidade e qualidade de méis florais para os seguintes parâmetros: umidade ( $\leq 20\%$ ), acidez livre ( $\leq 50 \text{ mEq kg}^{-1}$ ), condutividade elétrica ( $\leq 0,8 \text{ mS cm}^{-1}$ ) e sacarose ( $\leq 5\%$ ). Os minerais potássio e cálcio foram encontrados em maiores concentrações em todas as amostras, com teores variando de  $0,4 \times 10^3 \pm 0,0$  a  $3,0 \times 10^3 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $27,3 \pm 0,4$  a  $384,8 \pm 4,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Nesse sentido, os parâmetros físico-químicos, teores de açúcares e de minerais foram importantes para elucidar as características dos méis avaliados. Especialmente os parâmetros de acidez e 5-HMF indicaram que o manejo das colmeias e as condições higiênico-sanitárias durante a coleta e transporte das amostras também foram adequados.

**Palavras-chave:** Apicultura; Açúcares; Análises de mel; Minerais; Monitoramento digital de colmeias; *Apis on line*.

## 2.1 Introdução

Os principais parâmetros que caracterizam a qualidade e o frescor de méis, bem como a sua classificação quanto ao tipo – de acordo com a origem botânica utilizada pelas abelhas na sua elaboração – são estabelecidos em legislações internacionais (EUROPEANCOMMISSION, 2002; MERCOSUL, 1999) e nacional (BRASIL, 2000). Portanto, denominam-se méis multifloral ou polifloral, respectivamente, aqueles que são oriundos do néctar e/ou pólen de uma mesma família, gênero ou espécie de flores, ou de diferentes origens florais. Por outro lado, os méis que são produzidos a partir de secreções de plantas ou excreções de insetos sugadores de seiva são denominados de mel de melato (BRASIL, 2000).

Devido às diferentes fontes botânicas que as abelhas coletam a matéria-prima, além das influências de fatores edafoclimáticos<sup>6</sup> e de distintas origens geográficas, os méis podem apresentar diferenças em sua composição química. Estes são considerados uma mistura complexa por conter inúmeros compostos, os quais, podem ser classificados em duas diferentes classes: compostos majoritários e compostos minoritários. Os compostos majoritários incluem os carboidratos, principalmente os monossacarídeos frutose (aproximadamente 38%) e glicose (aproximadamente 38%), além da água (por volta de 10-20%). Os compostos minoritários, incluem os aminoácidos, proteínas, compostos fenólicos e voláteis, ácidos orgânicos, minerais, vitaminas e enzimas (DE-MELO et al., 2017; SILVA et al., 2016). Cada substância presente no mel, de maneira individual ou associada aos demais, tem função de atribuir para as características sensoriais, físicas e químicas a esse produto (MANZANARES et al., 2011; SILVA et al., 2016).

A produção e exportação de méis de qualidade é de extrema importância, não somente para assegurar a saúde dos consumidores, mas devido ao impacto econômico que a atividade produtiva do mel tem representando para o Brasil nos últimos anos (KLOSOWSKI; KUASOSKI; BONETTI, 2020). O Estado de Santa Catarina é líder nacional em produtividade de mel, são aproximadamente 65 kg/km<sup>2</sup>, 13 vezes superior à média do Brasil, sendo que a safra de mel 2019/2020 superou as expectativas, atingindo a marca de 7,5 mil toneladas. Somado a isso, o Estado é um dos principais polos de apicultura orgânica no mundo. Cerca de 9 mil toneladas/ano de mel orgânico de produtores catarinenses e dos demais estados são processadas

---

<sup>6</sup> Condições e/ou características de solo associadas ao conjunto de fatores climáticos ou meteorológicos como clima, temperatura, umidade, pressão atmosférica e precipitação pluviométrica.

por indústrias de Santa Catarina para exportação, principalmente para os Estados Unidos e Europa (ABEMEL, 2022).

O setor apícola vem conquistando um importante espaço na economia nacional devido a elevada escala de produção e exportação de mel no Brasil, principalmente na região sul. No entanto, a disponibilidade de dados da produção e qualidade de méis, associada a tecnologias que disponibilizem informações em tempo real, um desafio enfrentado pelo setor apícola brasileiro, vem sendo minimizados a partir de um projeto inovador e pioneiro no Brasil de monitoramento de colmeias. A plataforma *Apis On-line*, desenvolvida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/ Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (Epagri/Ciram), é um projeto que realiza o monitoramento *online* de diversos fatores relacionados às colmeias, entre eles, temperatura (interna e externa), umidade relativa (interna e externa), precipitação, molhamento foliar, além do peso (kg) máximo e mínimo de produção de mel. Com base nos dados fornecidos de forma livre e gratuita, pesquisadores e produtores podem acessar o monitoramento e acompanhar o impacto de possíveis mudanças climáticas, o aparecimento de doenças (colmeia ou abelhas) e a produção de mel. Além desse projeto representar um grande avanço tecnológico para o setor apícola brasileiro, para produtores e para pesquisadores, o monitoramento digital pode tornar o sistema produtivo mais prático em termos de manejo de colmeia e padronização do ambiente de produção diminuindo a mão de obra requerida. Na plataforma (<http://ciram.epagri.sc.gov.br/apicultura/>) também é disponibilizado informações de associações produtoras de méis e o registro de floradas que são observadas e identificadas pelos apicultores (EPAGRI, 2018).

O monitoramento digital foi implementado em 2018 em colmeias localizadas no Estado de Santa Catarina, compreendendo as seis regiões (1A, 2B, 3A, 3B, 3C e 5) da classificação de zoneamento agroecológico e socioeconômico do Estado de Santa Catarina (THOMÉ et al., 1999). No entanto, as características físico-químicas dos méis produzidos nessas colmeias ainda eram desconhecidas. Portanto, este estudo teve como objetivo determinar a umidade, acidez, pH, condutividade elétrica, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), atividade diastásica, açúcares (frutose, glicose e sacarose) e minerais (K, Ca, Na, Mg e Mn) de méis florais do projeto de monitoramento de colmeias no Estado de Santa Catarina, Brasil.

## 2.2 Materiais e métodos

### 2.2.1 Área de estudo no Estado de Santa Catarina

A distribuição geográfica das estações de monitoramento e consequentemente as áreas de coleta foram determinadas pelas diferenças climáticas existentes – classificação climática de Köppen (Köppen, 1948) e classificação de zonas agroecológicas do zoneamento agroecológico e socioeconômico do Estado de Santa Catarina (Thomé, et al., 1999) – considerando altitudes próxima de zero ao nível do mar no litoral de Santa Catarina (Clima subtropical úmido, Cfa – grupo C: temperado; tipo f: sem estação seca; subtipo a: verão quente) até próximas de 1400 metros de altitude (Subtropical úmido, Cfb). Portanto, as áreas de estudos compreenderam as cidades de Araranguá, Caçador, Joinville, Mafra, São Joaquim e São Miguel do Oeste.

Em cada área, foram instaladas estações meteorológicas compostas por painéis solares, baterias, *dataloggers*<sup>7</sup> e demais sensores ambientais (Figura 2.1) com aquisição dos dados em intervalos horários e armazenados no *datalogger*. Essas informações são transmitidas de hora em hora para o banco de dados da EPAGRI/CIRAM em Florianópolis por tecnologia celular *General Packet Radio Services* (GPRS).

**Figura 2.1** - Estações automatizadas e com telemetria para monitoramento dos dados da colmeia e do ambiente.



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina.

---

<sup>7</sup> Dispositivo eletrônico que monitora e registra dados em tempo real ao longo do tempo ou em relação a uma determinada posição geográfica.

### 2.2.1 Coleta das amostras

Amostras de mel ( $n=14$ ) foram coletadas em colmeias localizadas em seis cidades do Estado de Santa Catarina que possuíam o monitoramento, entre os meses de outubro e dezembro de 2018. As datas de coleta, bem como a localização geográfica das colmeias estão apresentadas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** Localização das colmeias monitoradas e datas das coletas dos méis em seis cidades do Estado de Santa Catarina.

Amostras	Data das coletas	Cidade/Região <sup>a</sup>	Localização das colmeias	
			Latitude (S)	Longitude (W)
ARD	20/12/2018	Araranguá/ 2B	28 <sup>o</sup> 55'59.9"	49 <sup>o</sup> 29'46.0"
CAO	29/10/2018	Caçador/ 3A	26 <sup>o</sup> 49'05.2"	50 <sup>o</sup> 59'30.8"
CAN	22/11/2018			
CAD	18/12/2018			
JVN	01/11/2018	Joinville/ 1A	26 <sup>o</sup> 12'16.9"	48 <sup>o</sup> 55'13.1"
JVD	18/12/2018			
MFN	01/11/2018	Maфра/ 3B	26 <sup>o</sup> 08'20.9"	49 <sup>o</sup> 48'41.0"
MFD	18/12/2018			
SJO	29/10/2018	São Joaquim/ 5	28 <sup>o</sup> 16'26.5"	49 <sup>o</sup> 56'02.0"
SJN	20/11/2018			
SJD	20/12/2018			
SMO	30/10/2018	São Miguel do Oeste/ 3C	26 <sup>o</sup> 46'59.9"	53 <sup>o</sup> 30'47.2"
SMN	21/11/2018			
SMD	19/12/2018			

Legenda: AR – Araranguá; CA - Caçador; JV – Joinville; MF - Maфра; SJ - São Joaquim; SM - São Miguel do Oeste. As letras O, N e D correspondem aos meses de coleta que foram outubro, novembro e dezembro; <sup>a</sup> Classificação do zoneamento agroecológico e socioeconômico do Estado de Santa Catarina.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021b).

Um fragmento (15 x 15 cm) do favo de mel de cada colmeia foi coletado em recipiente de polipropileno, transportado em caixas isotérmicas ( $5 \pm 2$  ° C) para o laboratório, drenado manualmente e armazenado ( $-18 \pm 2$  ° C) até o momento da análise. A cada coleta, o fragmento era retirado do mesmo lugar do quadro da colmeia.

### 2.2.2 Análises físico-químicas

Todos os procedimentos foram realizados em três réplicas independentes para cada amostra e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

O teor de umidade foi determinado em refratômetro de Abbe. As medições foram realizadas a 20 °C e a umidade correspondente foi obtida a partir da Tabela 969.38 (AOAC, 2005).

A condutividade elétrica foi determinada conforme método proposto por Bogdanov et al. (1999). Foi preparada uma solução de mel 20 % (m/v) em água ultrapurificada Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) a 25 °C e a medida foi realizada em seguida em um condutivímetro (TECNAL, São Paulo, SP, Brasil) modelo Tec-4MP. Os resultados foram expressos em mS cm<sup>-1</sup>.

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro modelo MD-20 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil). O teor de acidez livre (mEq kg<sup>-1</sup>) foi determinado pelo método 962.19 da AOAC (AOAC, 2005), em que 5 g de cada amostra foi diluída em 50 mL de água ultrapurificada Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) e, em seguida, a solução de mel foi titulada com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> até pH 8,5 e determinada a acidez livre utilizando a Equação 2.1.

$$\text{Acidez livre} = \frac{(\text{vol NaOH} \times \text{fator NaOH} \times \text{vol diluição})}{\text{massa (g)}} \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde: fator do NaOH foi 1,0489; o “vol NaOH” refere-se ao volume da solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> gasto na titulação; e o “vol diluição” refere-se ao volume de 50 mL, utilizado para diluir a amostra.

O teor de 5-HMF foi determinado pelo método 980.23 da AOAC (AOAC, 2005). Uma massa de 2,5 g de cada amostra foi diluída em 50 mL de água ultrapura Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Com auxílio de um bastão de vidro, a solução de mel foi dissolvida e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, adicionado 0,25 mL da solução de Carrez I<sup>8</sup>, agitado, adicionado 0,25 mL da solução de Carrez II<sup>9</sup>, agitado novamente e o volume foi preenchido com água ultrapura. Em seguida a solução foi filtrada, desprezando-se os primeiros 10 mL do filtrado. Uma quantidade de 2,5 mL da solução resultante de cada amostra foi transferida para dois tubos de ensaio (A e B), sendo que, no tubo A (amostra) também foi

---

<sup>8</sup> Solução de Carrez I: Dissolver uma massa de 15 g de acetato de ferrocianeto de potássio – K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].3H<sub>2</sub>O em água e completar para 100 mL.

<sup>9</sup> Solução de Carrez II: Dissolver uma massa de 30 g de acetato de zinco – Zn (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O em água e completar para 100 mL.

adicionado 2,5 mL de água ultrapura e no tubo B (referência), adicionado 2,5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2 % (m/v). Os tubos foram homogeneizados e posteriormente determinada a absorvância (Abs) das amostras. A medida espectrofotométrica foi realizada na região nos comprimentos de onda 284 e 336 nm. A Abs obtida em 336 nm (Abs<sub>336</sub>) foi subtraída do valor obtido em 284 nm (Abs<sub>284</sub>), como é demonstrado na Equação 2.2, a fim de se obter a concentração do 5-HMF.

$$HMF \left( \frac{mg}{kg} \right) = \frac{(Abs_{284} - Abs_{336}) \times 149,7 \times 5}{P} \quad \text{Equação 2.2}$$

O valor 149,7 é uma constante baseada na massa molar e absorvidade molar do 5-HMF, a massa da amostra em gramas é representada por “P” e 5 representa a massa teórica (em gramas) do mel.

A atividade diastásica foi determinada pelo método espectrofotométrico 958.09 da AOAC (AOAC, 2005) usando o espectrofotômetro UV-visível (Spectro Vision SB 1810–60 S, Pequim, China). O preparo das amostras foi realizado com 5 g de mel em 1,5 mL de NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e diluído com água ultrapura até 25 mL. Em seguida, uma alíquota de 10 mL desta solução foi adicionada a 5 mL da solução padrão de amido (1% m/v) e deixada em banho maria por 15 min a 40 °C. A cada 5 min, uma alíquota de 0,5 mL dessa solução foi adicionada aos tubos que já continham 0,5 mL de solução de iodo 0,7 mmol L<sup>-1</sup>. A absorvância foi medida em 660 nm, e este procedimento foi repetido até que a absorvância da solução fosse < 0,2 nm. Os resultados foram expressos em unidades de Göthe.

A determinação de frutose, glicose e sacarose foi realizada de acordo com método descrito por Rizelio et al. (2012b). Aproximadamente 0,25 g de cada amostra foi diluída em balão volumétrico de 5 mL com água ultrapurificada Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). A solução da amostra foi transferida para microtubos de polipropileno, centrifugadas (MiniSpin<sup>®</sup> Plus) a 9861 g por 8 min. O sobrenadante foi transferido para frascos de polipropileno e injetado no equipamento de eletroforese capilar (modelo 7100, Agilent Technologies, Alemanha). A quantificação foi realizada a partir da interpolação da curva analítica, construída com cinco níveis de concentração, variando de 0,2 a 3,6 g L<sup>-1</sup> para frutose e glicose e 0,2 a 1,2 g L<sup>-1</sup> para sacarose.

Os teores dos minerais potássio, sódio, cálcio, magnésio e manganês foram determinados conforme método descrito por Rizelio et al. (2012a). Aproximadamente 0,30 g de amostra foi diluída em balão de 1 mL com água ultrapura. As amostras foram transferidas

para tubos de polipropileno com padrão interno bário (concentração final de 5 mmol L<sup>-1</sup>) e injetadas no sistema de eletroforese capilar (modelo 7100, Agilent Technologies, Alemanha). As diluições foram realizadas de acordo com o perfil apresentado pelas amostras. A quantificação foi realizada a partir da interpolação da curva analítica com seis níveis de concentração variando de: 117,3 a 586,5 mg L<sup>-1</sup> para potássio; 2,0 a 60,1 mg L<sup>-1</sup> para cálcio; 1,1 a 34,5 mg L<sup>-1</sup> para sódio; 1,2 a 18,2 mg L<sup>-1</sup> para magnésio e 0,5 a 5,5 mg L<sup>-1</sup> para manganês.

### 2.2.3 Análise de dados

Todas as análises foram realizadas usando o Statistica<sup>®</sup> 13.5 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, EUA) ou Microsoft Excel 2016. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três réplicas independentes para todos os ensaios. Foi aplicada análise de componentes principais para classificar as amostras de méis floral com base nos parâmetros físico-químicos avaliados.

### 2.3 Resultados e discussão

Os resultados de umidade, acidez, pH, condutividade elétrica, 5-HMF e atividade diastásica das amostras avaliadas foram apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2-** Resultados das análises de identidade e qualidade de méis florais, expressos como média ± desvio padrão (DP).

Amostras	Umidade (%)	Acidez (mEq kg <sup>-1</sup> )	pH	Condutividade elétrica (mS cm <sup>-1</sup> )	5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Atividade diastásica (Göthe)
SMO	17,4 ± 0,0	36,6 ± 0,3	3,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	n.d	9,4 ± 0,1
SMN	16,4 ± 0,0	14,9 ± 0,3	4,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	n.d	17,2 ± 0,0
SMD	16,7 ± 0,1	17,1 ± 0,7	4,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,5 ± 0,1	8,5 ± 0,4
SJO	17,4 ± 0,0	45,9 ± 0,1	4,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0	3,6 ± 0,3	20,0 ± 0,5
SJN	28,6 ± 0,0	-	-	-	-	-
SJD	16,2 ± 0,0	46,3 ± 0,1	3,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0	6,7 ± 0,1	22,4 ± 0,8
CAO	18,6 ± 0,0	48,1 ± 1,9	3,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	5,2 ± 0,1	43,4 ± 1,5
CAN	18,2 ± 0,0	15,9 ± 0,2	5,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	14,6 ± 0,3	60,5 ± 0,7
CAD	19,4 ± 0,0	38,7 ± 1,4	4,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	16,6 ± 0,6	38,1 ± 1,2
MFN	16,9 ± 0,1	52,6 ± 0,1	3,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	n.d	21,8 ± 0,8
MFD*	16,2 ± 0,0	-	-	-	-	-
ARD	19,0 ± 0,0	51,8 ± 1,3	4,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	22,5 ± 1,6	74,8 ± 0,6
JVO	27,4 ± 0,0	-	-	-	-	-
JVD	20,0 ± 0,0	37,2 ± 0,2	3,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	8,0 ± 0,3	18,8 ± 0,3

Legenda: n.d – não detectado; AR – Araranguá; CA - Caçador; JV – Joinville; MF - Mafra; SJ - São Joaquim; SM - São Miguel do Oeste. As letras O, N e D correspondem aos meses de coleta que foram outubro, novembro e dezembro; \* MF – quantidade de amostra limitada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021b).

O teor de umidade é um parâmetro fortemente relacionado com a maturidade dos méis, em que valores superiores a  $20 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  (BRASIL, 2000) podem indicar colheita precoce e levar à ocorrência de processos fermentativos. Portanto, inicialmente foi realizada a análise de umidade para verificar se os méis coletados estavam maduros e então determinar quais amostras deveriam continuar sendo avaliadas para os outros parâmetros previsto em legislação. Com exceção das amostras SJN e JVO, que apresentaram umidade superior ao limite máximo estabelecido ( $28,6 \pm 0,0$  e  $27,4 \pm 0,0$  % respectivamente), todas as demais amostras estavam em conformidade, com teores de umidade que variaram de  $16,2 \pm 0,0$  a  $20,0 \pm 0,0$  %. As duas amostras não conforme foram excluídas das próximas etapas de análises.

A falta de condições higiênico-sanitárias durante a manipulação e processamento, aliadas a elevados teores de umidade e de condições inadequadas de armazenamento, podem resultar em uma fermentação indesejada do mel e, dessa maneira, favorecer a ocorrência de valores elevados de acidez (BERGAMO et al., 2019; SERAGLIO et al., 2019a). Por outro lado, mesmo que a acidez seja considerada um parâmetro de deterioração do mel e seu teor não deva ser superior a  $50 \text{ mEq kg}^{-1}$ , conforme a Instrução Normativa no 11 de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000). É importante ressaltar que os teores de acidez também podem sofrer variação devido as diferentes fontes de néctar coletadas pelas abelhas e pela ação de micro-organismos durante o processo de maturação. Além disso, a acidez em méis também pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos, voláteis e especialmente de ácidos orgânicos (BRUGNEROTTO et al., 2019a). Considerando que as 11 amostras de méis avaliadas não apresentavam evidência de fermentação, a acidez levemente acima de  $50 \text{ mEq kg}^{-1}$  das amostras MFP e ART ( $52,6 \pm 0,1$  e  $51,8 \pm 1,3 \text{ mEq kg}^{-1}$ ) podem indicar a influência de um ou mais fatores mencionados anteriormente. Com exceção das amostras MFN e ARD, as demais apresentaram acidez livre de acordo com os limites preconizados, com resultados variando entre  $14,9 \pm 0,3$  e  $48,1 \pm 1,8 \text{ mEq kg}^{-1}$ .

As legislações que tratam dos parâmetros de identidade e qualidade de méis não estabelecem valores de pH. No entanto, considerando a complexidade dos compostos presentes nestas matrizes, que contribuem para a acidez e, conseqüentemente para o pH, esta é uma medida que comumente apresenta variações entre amostras. Em méis florais o pH geralmente varia entre 3,5 e 5,5 (BERGAMO et al., 2019; PITA-CALVO; VÁZQUEZ, 2017), os quais são valores próximos aos encontrados nos méis avaliados nesse estudo, em que o pH variou de  $3,5 \pm 0,0$  a  $5,8 \pm 0,1$ .

A condutividade elétrica dos méis pode ser influenciada principalmente por compostos inorgânicos, e outros naturalmente presentes como ácidos orgânicos e proteínas (FECHNER et al., 2016). Este parâmetro não está previsto na legislação brasileira (BRASIL, 2000), no entanto está preconizado na legislação internacional com limite máximo de  $0,8 \text{ mS cm}^{-1}$  (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Consideradas as amostras avaliadas nesse estudo, foi observado que a condutividade elétrica variou de  $0,2 \pm 0,0$  a  $1,3 \pm 0,0 \text{ mS cm}^{-1}$ . Apesar de serem detectadas três amostras com condutividade elétrica acima do estabelecido, sendo elas CAN ( $0,8 \text{ mS cm}^{-1}$ ), SJP ( $0,9 \text{ mS cm}^{-1}$ ) e ARD ( $1,3 \text{ mS cm}^{-1}$ ), esses resultados podem ser considerados comuns, devido às influências da fonte de néctar utilizada pela abelha, e tipos de solo onde estas plantas se desenvolveram.

O 5-HMF é composto orgânico derivado da desidratação de determinados açúcares presentes em méis e é considerado um importante parâmetro de qualidade do mel (SERAGLIO et al., 2019a). Mesmo podendo ocorrer de maneira natural e lentamente ao longo do tempo, seja na colmeia ou armazenado em locais com temperaturas expressivas, a maior contribuição para o surgimento e conseqüente aumento do teor de 5-HMF pode ser atribuída a méis submetidos a aquecimento não controlado (BERGAMO et al., 2019; SILVA et al., 2016). Desta forma, a partir dos limites máximos para 5-HMF estabelecidos pela legislação brasileira ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (BRASIL, 2000) foi observado que todas as amostras avaliadas apresentaram conformidade, uma vez que o maior teor de 5-HMF encontrado foi de  $22,5 \pm 1,6 \text{ mg kg}^{-1}$ .

As enzimas  $\alpha$  e  $\beta$  amilase, secretadas pelas abelhas, são responsáveis pela hidrólise do amido e a sua ação frente a este composto é avaliada pela determinação da atividade diastásica. Este é um parâmetro utilizado em conjunto com outras análises para avaliar a identidade e qualidade do mel. Em estudo realizado por Fechner et al. (2016), amostras avaliadas apresentaram um decréscimo da atividade diastásica com o avanço do tempo de armazenamento e quando submetidas a aquecimento ( $T > 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Devido a estas características, a atividade diastásica deve ser de no mínimo 8 unidades Göthe (BRASIL, 2000). Nas amostras avaliadas, a atividade diastásica variou de  $8,5 \pm 0,4$  a  $74,8 \pm 0,6$  unidades Göthe, sendo consideradas, portanto, amostras de méis frescas, bem acondicionadas e provenientes de colmeias com bom manejo.

Os teores de açúcares estão apresentados na Tabela 2.3. Frutose e glicose são os principais monossacarídeos encontrados em méis de diferentes origens botânicas e/ou geográficas (DA SILVA et al., 2016; SERAGLIO et al., 2019b). Estes açúcares, além de estarem naturalmente presentes no néctar das flores, também são formados pela hidrólise da

sacarose, por meio da ação de enzimas depositadas no mel pelas abelhas *Apis mellifera* (DA SILVA et al., 2016). Nas amostras estudadas, as concentrações variaram de  $31,6 \pm 0,2$  a  $42,6 \pm 1,1$  g  $100$  g<sup>-1</sup> para frutose e  $25,1 \pm 0,8$  a  $35,6 \pm 0,6$  g  $100$  g<sup>-1</sup> glicose. Os resultados deste estudo foram similares aos encontrados por Bergamo et al. (2018a) e Da Silva et al. (2020) para outros méis florais catarinenses.

**Tabela 2.3** – Resultados das análises de açúcares (g  $100$  g<sup>-1</sup>  $\pm$  DP) nos méis florais monitorados em Santa Catarina.

Amostras	Frutose	Glicose	Sacarose	F+G
SMO	$40,3 \pm 1,5$	$29,4 \pm 0,9$	n.d	$69,7 \pm 2,4$
SMN	$31,6 \pm 0,2$	$25,1 \pm 0,8$	n.d	$56,7 \pm 1,0$
SMD	$36,2 \pm 2,2$	$26,5 \pm 1,7$	$3,9 \pm 0,1$	$62,7 \pm 3,9$
SJO	$38,3 \pm 0,4$	$30,8 \pm 0,2$	n.d	$69,1 \pm 0,6$
SJD	$40,9 \pm 0,9$	$35,6 \pm 0,6$	n.d	$76,5 \pm 1,6$
CAO	$37,2 \pm 1,1$	$26,9 \pm 0,1$	n.d	$64,1 \pm 1,2$
CAN	$35,7 \pm 1,9$	$30,4 \pm 1,3$	n.d	$66,1 \pm 3,2$
CAD	$42,6 \pm 1,1$	$31,6 \pm 0,3$	n.d	$74,3 \pm 1,4$
MFN	$39,6 \pm 0,9$	$27,7 \pm 0,2$	n.d	$67,3 \pm 1,1$
ARD	$39,6 \pm 1,7$	$25,7 \pm 1,2$	n.d	$65,2 \pm 2,9$
JVD	$40,0 \pm 1,5$	$30,1 \pm 0,4$	n.d	$70,1 \pm 1,9$

Legenda: n.d – não detectado; AR – Araranguá; CA - Caçador; JV – Joinville; MF - Mafra; SJ - São Joaquim; SM - São Miguel do Oeste. As letras O, N e D correspondem aos meses de coleta que foram outubro, novembro e dezembro; F+G - soma de frutose e glicose (açúcares redutores).

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021b).

A sacarose e os açúcares redutores também representam um importante parâmetro de maturidade de méis. Teor de sacarose acima de 6 % (BRASIL, 2000) pode indicar uma maturação incompleta do mel, demonstrando que a sacarose não foi totalmente convertida em frutose e glicose. Dessa forma, o mel provavelmente irá apresentar teores abaixo do estabelecido pelas legislações para açúcares redutores, as quais indicam um valor mínimo de 65 % (BRASIL, 2000). Neste estudo, a sacarose foi determinada em apenas uma amostra (SMD) com teor de  $3,9 \pm 0,1$  %, o qual está de acordo com o limite preconizado pela legislação. Por outro lado, três amostras (SMN, SMD e CAO) apresentaram teores de açúcares redutores inferiores ao mínimo exigido pela legislação (65%).

Os resultados dos teores de minerais: potássio, cálcio, sódio, magnésio e manganês estão apresentados na Tabela 2.4. O perfil e os teores de minerais são influenciados pela origem botânica e geográfica dos néctares, incluindo fatores como tipo de planta de onde o néctar e/ou o pólen são coletados pelas abelhas *Apis mellifera*, além da composição do solo (RIZELIO et al., 2012b; SERAGLIO et al., 2019a; SILVA et al., 2016).

**Tabela 2.4** - Resultados das análises de minerais ( $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{DP}$ ) nos méis florais de colmeias monitoradas em Santa Catarina.

Amostras	Potássio ( $\times 10^3$ )	Sódio	Cálcio	Magnésio	Manganês
SMO	$1,2 \pm 0,1$	$36,4 \pm 0,7$	$162,1 \pm 4,5$	$50,3 \pm 1,9$	$2,7 \pm 0,2$
SMN	$0,4 \pm 0,0$	$6,0 \pm 0,3$	$27,3 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,1$	< LOD
SMD	$0,5 \pm 0,0$	$8,8 \pm 0,5$	$45,6 \pm 0,9$	$12,1 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,0$
SJO	$3,0 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,2$	$158,8 \pm 3,2$	$36,9 \pm 0,8$	$5,3 \pm 0,4$
SJD	$1,4 \pm 0,1$	$20,5 \pm 0,6$	$208,8 \pm 6,5$	$44,9 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,4$
CAO	$2,2 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,4$	$153,1 \pm 7,2$	$43,6 \pm 1,5$	$4,3 \pm 0,2$
CAN	$2,3 \pm 0,1$	$35,5 \pm 0,6$	$110,9 \pm 3,0$	$31,4 \pm 1,5$	$0,8 \pm 0,1$
CAD	$1,6 \pm 0,5$	$17,2 \pm 0,5$	$128,9 \pm 2,4$	$31,2 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,1$
MFN	$1,1 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,4$	$68,6 \pm 2,1$	$19,7 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,0$
ARD	$3,3 \pm 0,1$	$144,3 \pm 1,9$	$384,8 \pm 4,5$	$121,2 \pm 2,6$	< LOD
JVD	$0,9 \pm 0,0$	$53,9 \pm 0,7$	$127,9 \pm 1,5$	$55,4 \pm 0,3$	< LOD

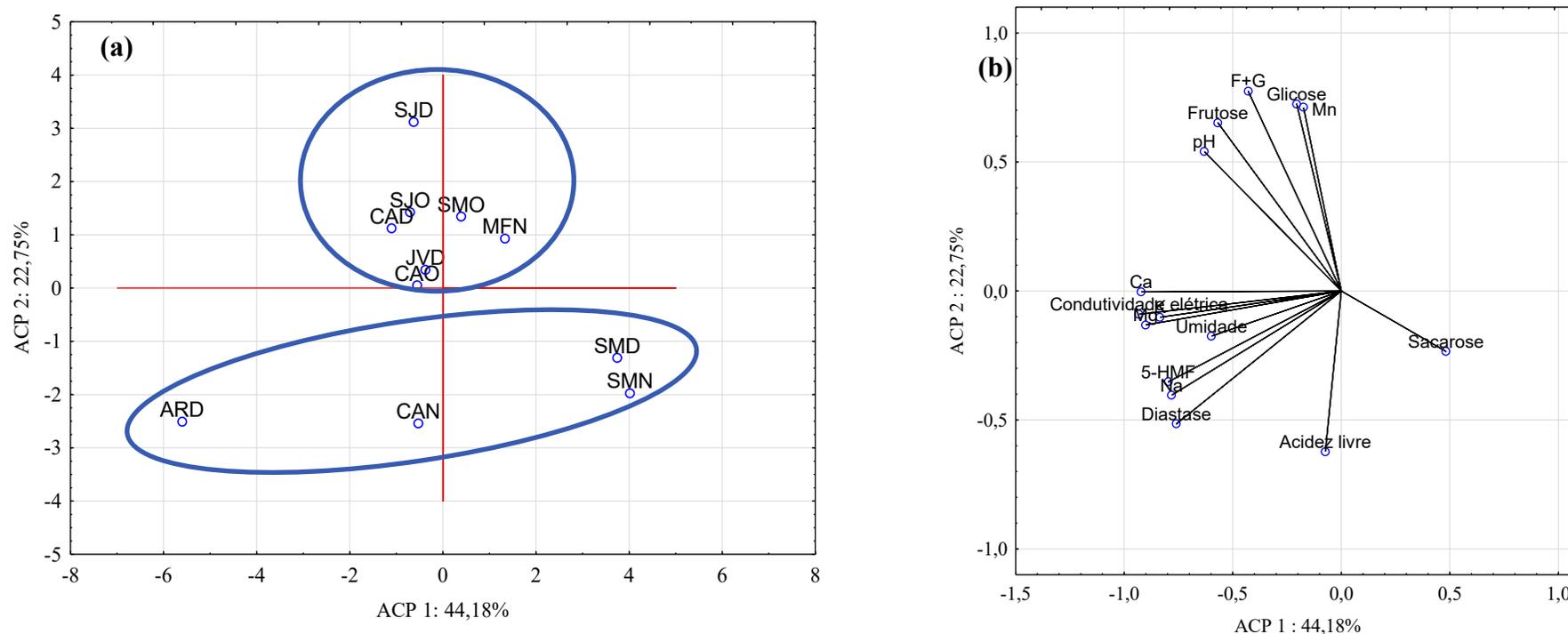
Legenda: AR – Araranguá; CA - Caçador; JV – Joinville; MF - Mafra; SJ - São Joaquim; SM - São Miguel do Oeste. As letras O, N e D correspondem aos meses de coleta que foram outubro, novembro e dezembro; LOD, limite de detecção; LOD do manganês  $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ .

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021b).

Os minerais não foram avaliados na amostra MFD por não haver quantidade suficiente de amostra. Para as demais amostras (Tabela 2.4), o potássio foi o oligoelemento majoritário com concentrações que variaram de  $0,4 \times 10^3 \pm 0,00$  a  $3,3 \times 10^3 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  nas amostras SMN e ARD, respectivamente. Para outros méis florais de Santa Catarina (Bom Retiro, Lages, São Joaquim, Urubici e Urupema) o teor de potássio ( $0,9 \times 10^3$  a  $3,3 \times 10^3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foi próximo ao encontrado nesse estudo. Além disso, o cálcio apresentou concentrações intermediárias ( $27,3 \pm 0,4$  a  $384,8 \pm 4,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), sendo que o sódio, magnésio e manganês foram os minerais com menores concentrações, variando de  $6,02 \pm 0,29$  a  $144,3 \pm 1,9 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $5,4 \pm 0,1$  a  $121,2 \pm 2,6 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,4 \pm 0,0$  a  $5,3 \pm 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. É importante ressaltar que a condutividade elétrica está diretamente relacionada com a matéria inorgânica (tais como os minerais) presente nos méis. Nesse estudo, foi observado que as amostras ARD e SJO que apresentaram condutividade elétrica superior a  $0,8 \text{ mS cm}^{-1}$  também foram as amostras que apresentaram a soma do teor de minerais superiores às demais amostras.

Os resultados para as 11 amostras de mel deste estudo foram submetidos a análise de componentes principais (ACP) com a finalidade de determinar possível discriminação entre os méis. Para isso, inicialmente foram considerados todos os parâmetros físico-químicos avaliados neste estudo, conforme apresentado na Figura 2.2.

**Figura 2.2** - Gráficos de dispersão da análise de componentes principais para (a) méis florais relacionados à (b) composição físico-química

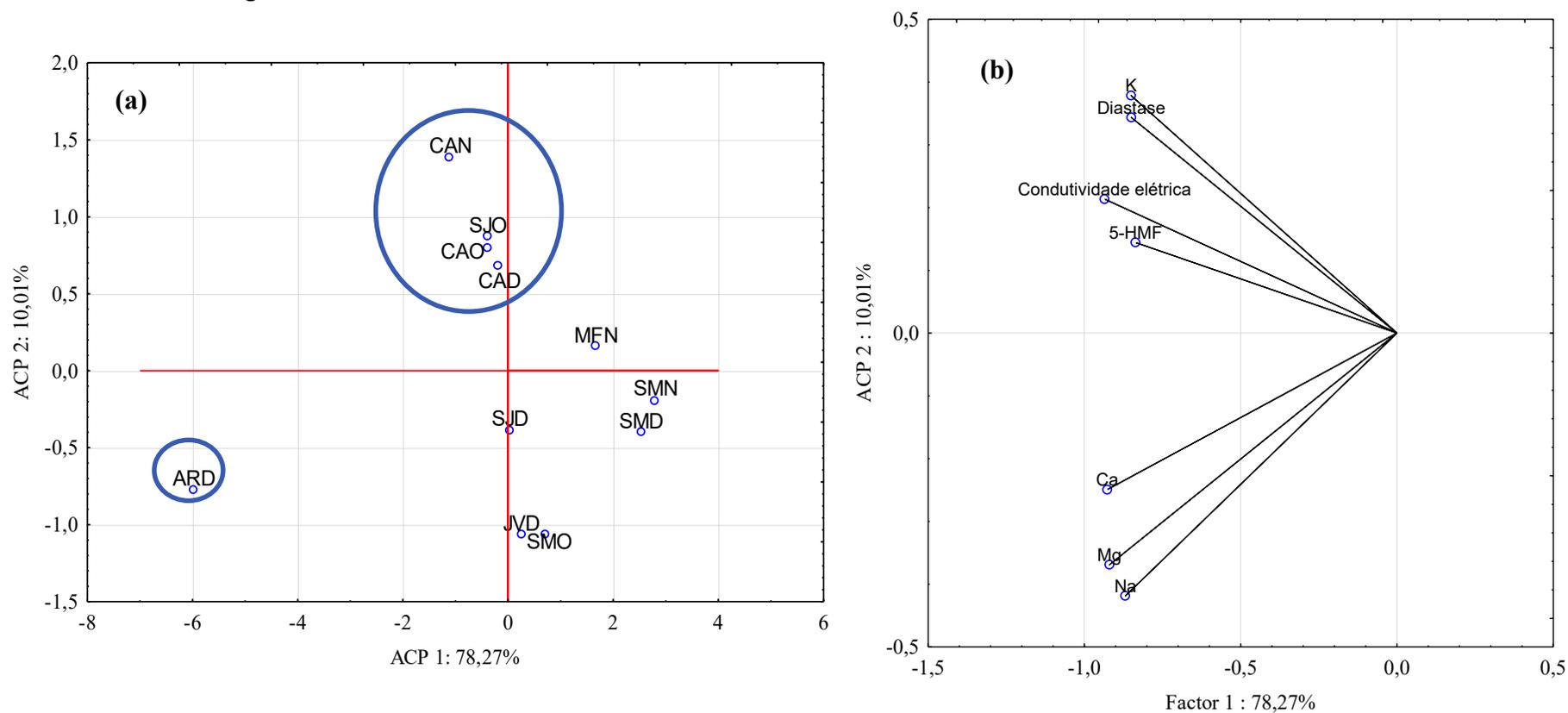


Fonte: Próprio autor (2022).

Na Figura 2.2, o componente 1 explicou 44,18% da variabilidade, o componente 2 explicou 22,75%, totalizando 66,93% da variação dos dados pelo modelo. As variáveis dominantes que contribuíram para a componente 1 foram condutividade elétrica (13,1%), cálcio (12,8%), magnésio (12,3%), potássio (10,5%), 5-HMF (9,6%), sódio (9,2%) e diastase (8,7%). Enquanto para o componente 2 foram F + G (17,6%), glicose (15,4%), manganês (14,9%), frutose (12,4%), acidez livre (11,4%) e pH (8,6%). Dois principais grupos foram identificados. O primeiro apresentou características físico-químicas similares em relação as variáveis contribuintes no componente 1 e foi caracterizado por sete amostras (SMO, SJO, SJD, CAO, CAD, JVD e MFN), enquanto o segundo grupo apresentou características similares em relação as variáveis do componente 2 que

compreenderam quatro amostras (ARD, CAN, SMD e SMN). As sete variáveis (condutividade elétrica, 5-HMF, diastase, potássio, cálcio, magnésio e sódio) que apresentaram as mais significativas contribuições na separação das amostras nos diferentes grupos foram usadas para uma nova análise de componentes principais, apresentada na Figura 2.3.

**Figura 2.3** - Gráficos de dispersão da análise de componentes principais para (a) méis florais relacionados à (b) diastase, condutividade elétrica, 5-HMF, K, Ca, Na e Mg.



Fonte: Próprio autor (2022).

Na Figura 2.3 a nova ACP explicou 88,3% do total da variabilidade dos dados. Para o componente 1 (78,3%), as variáveis dominantes foram condutividade elétrica (15,9%), cálcio (15,7%), magnésio (15,4%), sódio (13,8%), potássio (13,2%), diastase (13,2%) e 5-HMF (12,7%). Enquanto para o componente 2 (10,01%) as variáveis dominantes foram sódio (25,0%), potássio (20,4%), magnésio (19,4%) e diastase (16,8%). Nesse caso, foi observado uma separação com maior clareza das amostras CAN, SJO, CAO e CAD quando comparadas as demais amostras, principalmente pelos elevados valores de condutividade elétrica, potássio, 5-HMF e diastase. Embora a amostra ARD tenha o maior teor de potássio, essa amostra foi separada das outras amostras porque também apresentou os níveis altos de cálcio, magnésio e manganês. Para as amostras MFN, SJD, SMN, SMD, JVD e SMO, não foi observado perfil de separação ou agrupamento, provavelmente devido aos níveis baixos ou intermediários dessas variáveis que não permitiram um perfil de similaridade nos parâmetros considerados na nova ACP.

#### 2.4 Conclusões

Este foi o primeiro estudo que avaliou as características físico-químicas dos méis florais brasileiros de colméias monitoradas e dados importantes foram apresentados e discutidos. Entre os parâmetros investigados, a maioria dos méis não excedeu os limites recomendados pela legislação, indicando que as condições higiênicas-sanitárias foram adequadas durante a coleta e o transporte de méis. Isso também demonstra a importância de avaliar esses parâmetros como uma forma de controle de qualidade nos locais de produção. Ainda assim, foi observada alta variabilidade entre os méis estudados, mas a ACP destacou alguns minerais (K, Ca, Mg e Na) como os melhores contribuintes para a discriminação dos méis. Esses resultados são considerados exploratórios e, portanto, estudos futuros com mais amostras e de outras colméias monitoradas serão avaliadas para validar este estudo.

### CAPÍTULO III

#### 3 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS COM POTENCIAL APÍCOLA PROVENIENTES DE REGIÕES CATARINENES COM MONITORAMENTO DIGITAL DE COLMEIAS

Informações desse capítulo foram publicadas em: BRUGNEROTTO, P., DORTZBACH, D., BLAINSKI, E., FALKENBERG, D. B., VIEIRA, V. F., VIEIRA, H., GONZAGA, L. V., FETT R., COSTA, A. C. O. Identificação de plantas com potencial apícola provenientes de sistemas de monitoramento de colmeias no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, p. 1-16, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16254>

#### Resumo

A caracterização de espécies vegetais com potencial apícola presentes em sistemas de produção apícola pode trazer muitas vantagens. Entre os benefícios, destaca-se a definição do local de implantação das colmeias nos agroecossistemas de acordo com a disponibilidade de recursos florais, permitindo aumentar a produtividade e qualidade dos méis e demais produtos provenientes das abelhas. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi coletar espécies de plantas com flores visitadas por abelhas próximas de sistemas de monitoramento de colmeias em seis zonas agroecológicas do Estado de Santa Catarina, Brasil, bem como realizar a identificação taxonômica e geográfica destas espécies. Para cada amostra coletada foi registrada sua localização a fim de estimar a distância do percurso realizado pelas abelhas, uma vez que as localizações das colmeias eram fixas. Das 157 amostras identificadas, 81 espécies e 68 gêneros foram encontrados em 33 famílias, sendo Asteraceae e Fabaceae predominantes. Para Asteraceae, os gêneros mais relatados foram *Baccharis*, *Tithonia*, *Senecio* e *Sphagneticola*, enquanto que para Fabaceae, o gênero mais relatado foi *Trifolium*. Espécies como *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae), *Trifolium repens*, *T. pratense*, *Cajanus cajan*, *Vicia* sp. (todas Fabaceae), *Verbena litoralis*, *Lantana undulata* (ambas Verbenaceae), *Raphanus sativus* (Brassicaceae) e *Clidemia hirta* (Melastomataceae) podem ser consideradas interessantes do ponto de vista apícola, pois permaneceram com flores entre o primeiro e último dia de coleta em algumas regiões (~60 dias). Apesar das distâncias entre as plantas e as colmeias apresentarem elevada variabilidade (8 a 1154 m), geralmente as distâncias não ultrapassavam 750 m.

**Palavras-chave:** Apicultura; *Apis mellifera*; Asteraceae; Fabaceae; Biodiversidade; Flora apícola.

### 3.1 Introdução

A flora apícola, que compõe o pasto ou pastagem apícola, é caracterizadas por espécies vegetais que oferecem néctar, pólen ou secreções às abelhas (Almeida, et al., 2003; Camargo, 2002; Coradin, et al., 2011), e esta pode variar em função do tipo de vegetação (florestas, caatinga, cerrado, entre outras), das condições edafoclimáticas, das estações do ano e das próprias regiões geográficas (Salomé & Orth, 2004; Santos, et al., 2006). Portanto, diversas espécies podem ser consideradas plantas apícolas quando estas são visitadas pelas abelhas à procura por recursos nectaríferos e/ou polínicos (Carvalho & Marchini, 1999).

O Estado de Santa Catarina possui rica biodiversidade, com vegetações heterogêneas e diversificadas devido, principalmente, às variações climáticas e geomorfológicas existentes (Santos, et al., 2016). Embora ocorrendo no mesmo estado, algumas espécies podem ser comuns e características de determinada região, enquanto em outra região a mesma espécie pode ser considerada rara. Dessa maneira, o conhecimento da presença de espécies de plantas em determinada região, bem como seus ciclos de florescimento (SALOMÉ, 2002), são de fundamental importância, não somente para conservar e explorar racionalmente as abelhas, mas para identificar, preservar e multiplicar as espécies vegetais consideradas mais importantes da região (CARVALHO; MARCHINI, 1999; PIRANI; CORTOPASSI-LAURINO, 1993).

É importante que apicultores e/ou agentes de assistência técnica conheçam as áreas prioritárias, ou seja, regiões de produção de espécies com potencial apícola e seus períodos de floração para um planejamento adequado de manejo e maximização do aproveitamento destes recursos para a produção de méis diversificados e demais produtos apícolas. Essas ações podem deter a perda de biodiversidade e usar sustentavelmente os recursos naturais em cadeias produtivas e em atividades de subsistência de comunidades humanas, metas que fazem parte do Objetivo 15<sup>10</sup> das políticas de desenvolvimento sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU, 2021). Inúmeras espécies da flora catarinense são conhecidas, principalmente por mérito dos botânicos Raulino Reitz e Roberto Miguel Klein, integrantes do Herbário Barbosa Rodrigues e criadores da Flora Ilustrada Catarinense (Reitz, 1965-1989; Reis, 1996-2013). No entanto, até o presente momento, nenhum estudo investigou a caracterização de plantas com potencial apícola próximas de colmeias monitoradas no Brasil.

---

<sup>10</sup> O objetivo de desenvolvimento sustentável de nº 15 da Organização das Nações Unidas pertence a Vida Terrestre e tem como objetivo proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda de biodiversidade

No Brasil, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/ Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (EPAGRI/CIRAM) foi pioneira no desenvolvimento e implementação de um projeto denominado *Apis On-line* (EPAGRI, 2018). Esse projeto é composto por estações automatizadas com telemetria que monitoram colmeias e enviam as informações (de hora em hora) da temperatura e da umidade relativa do ar internas e externas; do peso do mel produzido nas colmeias; e do volume de precipitação pluviométrica para o banco de dados da EPAGRI. O monitoramento automatizado foi implementado em 2018 em seis zonas agroecológicas do Estado de Santa Catarina, as quais compreendem as cidades de Araranguá, Caçador, Joinville, Mafra, São Joaquim e São Miguel do Oeste. Os locais selecionados representam regiões importantes na criação e preservação das abelhas e com grande capilaridade para atuação dos agentes de assistência técnica. Além disso, o monitoramento automatizado de colmeias promove um grande avanço tecnológico para a apicultura brasileira, devido à possibilidade de monitorar pragas e doenças nas colmeias, atividades de difusão e ações de caracterização e monitoramento da oferta de alimentos disponíveis às abelhas, além da qualidade do mel.

A falta de informações sobre a flora apícola próxima das colmeias é uma das limitações no planejamento e exploração responsável da atividade apícola e seus produtos gerados. As plantas produzem inúmeras substâncias químicas que quando ingeridas podem ter potencial benéfico (POSWAL et al., 2019) ou são capazes de provocar efeitos adversos em diferentes graus intoxicações (BARCELOS et al., 2021). Especialmente gêneros das famílias Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae produzem alcaloides pirrolizidínicos (AP) (KOPP; ABDEL-TAWAB; MIZAIKOFF, 2020), que são conhecidos como toxinas naturais e possuem potencialidade tóxica se presentes nas matrizes, ingeridos e metabolizados no fígado de animais e seres humanos (EBMEYER et al., 2019b, 2019a). Muitas espécies destas famílias de plantas são utilizadas pelas abelhas como recurso para produção de mel e, considerando que a presença dessa classe de alcaloides nos alimentos é indesejada, a identificação das espécies e a possibilidade de elaboração de um calendário apícola podem trazer inúmeros benefícios para o setor e consumidores dos produtos da colmeia.

Nesse sentido, a partir da observação direta de plantas visitadas por abelhas *Apis mellifera* em seis zonas agroecológicas catarinenses, nas quais estavam alocadas colmeias monitoradas pelo sistema *Apis On-line*, o objetivo desse estudo foi coletar as espécies com flores e realizar a identificação taxonômica a fim de compreender a disponibilidade das espécies com potencial apícola e que também integram o grupo de famílias que produzem AP.

## 3.2 Materiais e métodos

### 3.2.1 Coleta das amostras

Foram coletados ramos com folhas e flores de plantas ( $n=157$ ) próximas às colmeias monitoradas nas cidades de Araranguá ( $n=48$ ), Caçador ( $n=21$ ), Joinville ( $n=27$ ), Mafra ( $n=11$ ), São Joaquim ( $n=35$ ) e São Miguel do Oeste ( $n=15$ ). As amostras foram acondicionadas em embalagens de papel pardo e transportadas ao Laboratório de Química de Alimentos em caixas térmicas. Para todas as amostras coletadas foram registradas fotos (Apêndices A, B, C, D, E e F) e localização (latitude e longitude). Em cada área de estudo foram realizadas três coletas entre os meses de outubro e dezembro, ano de 2018, com intervalos de aproximadamente 20 dias entre as coletas (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** - Datas de coleta das plantas próximas às colmeias monitoradas pelo *Apis On-line*.

Municípios	Datas das coletas	Municípios	Datas das coletas
Araranguá	Coleta 1: 29/10/2018	Mafra	Coleta 1: 01/11/2018
	Coleta 2: 20/11/2018		Coleta 2: 22/11/2018
	Coleta 3: 20/12/2018		Coleta 3: 18/12/2018
Caçador	Coleta 1: 29/10/2018	São Joaquim	Coleta 1: 29/10/2018
	Coleta 2: 22/11/2018		Coleta 2: 20/11/2018
	Coleta 3: 18/12/2018		Coleta 3: 20/12/2018
Joinville	Coleta 2: 21/11/2018	São Miguel do Oeste	Coleta 1: 30/10/2018
	Coleta 3: 19/12/2018		Coleta 2: 21/11/2018
	Coleta 3: 18/12/2018		Coleta 3: 19/12/2018

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

Coordenadas geográficas (latitude e longitude) também foram registradas para cada amostra de planta por meio de um aparelho digital de localização (GPS - *Global Positioning System*). Para espacialização e cálculos das distâncias em metros dos pontos coletados até cada colmeia, foi utilizado um *software* (*ArcGis*<sup>®</sup> 10.8) de sistema de informações geográficas da *Environmental Systems Research Institute - ESRI* (Redlands, Califórnia, Estados Unidos da América). Após as coletas, as amostras de plantas foram acondicionadas em embalagens e transportadas ao Centro de Ciências Agrárias (CCA), Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CTA), Laboratório de Química de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). No laboratório as inflorescências foram separadas das folhas e caules, submetidas à inativação enzimática por 5 minutos à  $80 \pm 2$  °C e seguidas de secagem por 12

horas à  $45 \pm 2$  °C em uma estufa de ar circulante (Fabbe 170, São Paulo, Brasil). As amostras foram armazenadas separadamente em frascos de polipropileno, ao abrigo da luz e mantidas à  $-18 \pm 2$  °C.

### 3.2.2 Identificação botânica das plantas

A identificação taxonômica das amostras foi realizada no Departamento de Botânica da UFSC por meio de metodologia tradicional (STUESSY, 2009), que consistiu na comparação das imagens das plantas coletadas com exsicatas (Herbário FLOR da UFSC e [slink.org.br](http://slink.org.br)) e literatura especializada (Reitz, 1965-1989; Souza & Lorenzi, 2019).

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Identificação botânica

Das seis regiões delimitadas neste estudo e a partir do número de amostras coletadas, Araranguá e São Joaquim foram as que apresentaram maior riqueza de espécies com flores. Foram identificadas 33 famílias ( $n=157$  amostras), sendo estas: Amaranthaceae ( $n=1$ ), Amaryllidaceae ( $n=1$ ), Anacardiaceae ( $n=3$ ), Apiaceae ( $n=1$ ), Apocynaceae ( $n=1$ ), Arecaceae ( $n=2$ ), Asteraceae ( $n=34$ ), Bignoniaceae ( $n=2$ ), Brassicaceae ( $n=14$ ), Fabaceae ( $n=37$ ), Geraniaceae ( $n=1$ ), Lamiaceae ( $n=7$ ), Lythraceae ( $n=2$ ), Marantaceae ( $n=1$ ), Melastomataceae ( $n=6$ ), Musaceae ( $n=1$ ), Myrtaceae ( $n=6$ ), Oleaceae ( $n=3$ ), Onagraceae ( $n=2$ ), Orobanchaceae ( $n=1$ ), Plantaginaceae ( $n=1$ ), Plumbaginaceae ( $n=1$ ), Rhamnaceae ( $n=4$ ), Rosaceae ( $n=4$ ), Rubiaceae ( $n=1$ ), Rutaceae ( $n=1$ ), Solanaceae ( $n=4$ ), Talinaceae ( $n=1$ ), Tropaeolaceae ( $n=2$ ), Urticaceae ( $n=1$ ), Verbenaceae ( $n=9$ ), Vitaceae ( $n=1$ ) e Zingiberaceae ( $n=1$ ), conforme apresentado na Tabela 3.2. As famílias Asteraceae e Fabaceae abrangeram juntas 45,5% do total de amostras identificadas.

**Tabela 3.2** - Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do Estado de Santa Catarina.

Continuação

Araranguá									
Famílias	Espécies	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Origem	Origem
		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem		
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i>	374	N	<i>Schinus terebinthifolius</i>	368	N	-	-	
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	647	N	-	-	-	-	-	
Arecaceae	<i>Roystonea oleracea</i>	1108	E	-	-	-	-	-	
Asteraceae	<i>Sphagneticola trilobata</i>	368	E	<i>Sphagneticola trilobata</i>	327	E	<i>Sphagneticola trilobata</i>	216	E
	<i>Mikania</i> sp.	461	N	<i>Tithonia diversifolia</i>	454	E	<i>Tithonia diversifolia</i>	483	E
	-	-	-	<i>Helianthus annuus</i>	86	E	-	-	
Bignoniaceae	<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	216	N	<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	220	N	-	-	
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	204	E	<i>Raphanus sativus</i>	189	E	-	-	
	-	-	-	<i>Brassica napus</i>	516	E	-	-	
Fabaceae	<i>Tipuana tipu</i>	189	N	<i>Trifolium pratense</i>	218	E	<i>Cassia fistula</i>	226	E
	<i>Vicia</i> sp.	482	ND	<i>Vicia</i> sp.	188	ND	-	-	
	<i>Trifolium</i> sp.	204	E	<i>Delonix regia</i>	223	E	<i>Delonix regia</i>	234	E
	<i>Cajanus cajan</i>	277	E	<i>Cajanus cajan</i>	460	E	<i>Cajanus cajan</i>	279	E
	<i>Arachis pintoi</i>	454	E	<i>Arachis pintoi</i>	460	E	<i>Arachis pintoi</i>	457	E
	<i>Trifolium repens</i>	378	E	<i>Trifolium repens</i>	197	E	<i>Trifolium repens</i>	341	E
	<i>Schizolobium parahyba</i>	466	N	-	-	-	-	-	

Legenda: E – exótica; N – nativa; ND – não determinada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

**Tabela 3.2** - Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do Estado de Santa Catarina.

Continuação

Araranguá									
		Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
Famílias	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Lamiaceae	-	-		<i>Ocimum basilicum</i>	134	E	<i>Leonurus sibiricus</i>	290	E
	-	-		<i>Marsypianthes chamaedrys</i>	169	ND	-	-	
Lythraceae	<i>Cuphea</i> sp.	211	N	-	-		-	-	
Musaceae	-	-		<i>Musa paradisiaca</i>	290	E	-	-	
Myrtaceae	<i>Psidium cattleianum</i>	444	N	<i>Syzigium cumini</i>	183	E	-	-	
	<i>Psidium guajava</i>	462	E	<i>Psidium guajava</i>	182	E	-	-	
Tropaeolaceae	<i>Tropaeolum majus</i>	185	E	<i>Tropaeolum majus</i>	270	E	-	-	
Verbenaceae	<i>Verbena litoralis</i>	358	N	<i>Verbena litoralis</i>	189	N	<i>Verbena litoralis</i>	451	N
Caçador									
		Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
Famílias	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Arecaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Butia eriospatha</i>	41	N
Asteraceae	<i>Senecio brasiliensis</i>	127	N	<i>Senecio brasiliensis</i>	35	N	-	-	
	<i>Baccharis</i> sp.	118	N	<i>Baccharis</i> sp.	32	N	-	-	
	<i>Baccharis semiserrata</i>	119	N	<i>Baccharis semiserrata</i>	82	N	-	-	
	<i>Bidens</i> sp.	853	E	-	-		-	-	

Legenda: E – exótica; N – nativa; ND – não determinada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

**Tabela 3.2** - Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do Estado de Santa Catarina.

Continuação

<b>Caçador</b>									
		Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
Famílias	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	722	E	<i>Raphanus sativus</i>	48	E	<i>Raphanus sativus</i>	23	E
Fabaceae	<i>Trifolium repens</i>	46	E	<i>Trifolium repens</i>	27	E	<i>Trifolium repens</i>	11	E
	<i>Vicia</i> sp.	55	ND	<i>Vicia</i> sp.	25	ND	<i>Vicia</i> sp.	1154	ND
	<i>Inga</i> sp.	151	N	-	-	-	<i>Inga</i> sp.	25	N
Rosaceae	<i>Malus domestica</i>	17	E	<i>Cotoneaster</i> sp.	69	E	-	-	-
<b>Joinville</b>									
		Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
Famílias	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Asteraceae	<i>Conyza</i> sp.	94	ND	<i>Tithonia diversifolia</i>	132	E	<i>Tithonia diversifolia</i>	129	E
	<i>Sphagneticola trilobata</i>	77	E	<i>Sphagneticola trilobata</i>	36	E	<i>Sphagneticola trilobata</i>	8	E
Fabaceae	-	-	-	<i>Inga luschnathiana</i>	159	N	<i>Inga luschnathiana</i>	160	N
	-	-	-	-	-	-	<i>Delonix regia</i>	179	E
	-	-	-	-	-	-	<i>Mimosa pudica</i>	65	N
Lamiaceae	<i>Marsypianthes chamaedrys</i>	96	ND	-	-	-	-	-	-
Lythraceae	-	-	-	-	-	-	<i>Cuphea hyssopifolia</i>	242	E

Legenda: E – exótica; N – nativa; ND – não determinada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

**Tabela 3.2** - Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do Estado de Santa Catarina.

Continuação

<b>Joinville</b>									
Famílias	Espécies	Coleta 1		Espécies	Coleta 2		Espécies	Coleta 3	
		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
	<i>Clidemia hirta</i>	85	N	<i>Clidemia hirta</i>	22	N	<i>Clidemia hirta</i>	11	N
Melastomataceae	-	-		<i>Tibouchina pulchra</i>	75	N	<i>Tibouchina pulchra</i>	103	N
	-	-		-	-		<i>Pterolepis glomerata</i>	56	N
Myrtaceae	-	-		-	-		<i>Myrcia spectabilis</i>	60	N
Onagraceae	-	-		-	-		<i>Ludwigia octovalvis</i>	55	N
Rubiaceae	-	-		-	-		<i>Pentas lanceolata</i>	242	E
Urticaceae	-	-		<i>Boehmeria caudata</i>	523	N	-	-	
Verbenaceae	<i>Lantana undulata</i>	76	N	<i>Lantana undulata</i>	39	N	<i>Lantana undulata</i>	23	N
	-	-		-	-		<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	19	N
Zingiberaceae	-	-		-	-		<i>Hedychium coronarium</i>	21	E
<b>Mafra</b>									
Famílias	Espécies	Coleta 1		Espécies	Coleta 2		Espécies	Coleta 3	
		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Anacardiaceae	-	-		<i>Schinus terebinthifolius</i>	67	N	-	-	

Legenda: E – exótica; N – nativa; ND – não determinada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

**Tabela 3.2** - Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do Estado de Santa Catarina.

Continuação

<b>Mafra</b>									
		Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
Famílias	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Asteraceae	<i>Baccharis semiserrata</i>	430	N	<i>Cirsium vulgare</i>	69	E	<i>Coreopsis tinctoria</i>	57	E
	<i>Senecio brasiliensis</i>	436	N	<i>Senecio brasiliensis</i>	427	N	-	-	-
Lamiaceae	-	-	-	<i>Leonurus sibiricus</i>	69	E	<i>Leonurus sibiricus</i>	34	E
Oleaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Ligustrum lucidum</i>	110	E
Onagraceae	-	-	-	-	-	-	<i>Ludwigia sericea</i>	196	N
Rhamnaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Hovenia dulcis</i>	64	E
<b>São Joaquim</b>									
		Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
Famílias	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Amaryllidaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Zephyranthes flavissima</i>	253	N
Asteraceae	<i>Leucanthemum vulgare</i>	510	E	<i>Leucanthemum vulgare</i>	506	E	<i>Hypochaeris</i> sp.	29	ND
	<i>Senecio brasiliensis</i>	45	N	<i>Senecio brasiliensis</i>	506	N	<i>Vernonia</i> sp.	207	N
	<i>Baccharis uncinella</i>	27	N	<i>Baccharis uncinella</i>	30	N	-	-	-
	-	-	-	<i>Baccharis</i> sp.	117	N	-	-	-
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	65	E	<i>Raphanus sativus</i>	123	E	<i>Raphanus sativus</i>	39	E
	<i>Raphanus sativus</i>	110	E	-	-	-	-	-	-

Legenda: E – exótica; N – nativa; ND – não determinada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

**Tabela 3.2** - Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do Estado de Santa Catarina.

Continuação

São Joaquim									
Famílias	Espécies	Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	107	E	-	-	-	-	-	-
	<i>Raphanus sativus</i>	477	E	-	-	-	-	-	-
	<i>Raphanus sativus</i>	107	E	-	-	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Trifolium pratense</i>	510	E	<i>Trifolium pratense</i>	520	E	<i>Trifolium pratense</i>	198	E
	<i>Trifolium repens</i>	45	E	<i>Trifolium repens</i>	86	E	<i>Trifolium repens</i>	33	E
Lamiaceae	<i>Stachys arvensis</i>	64	E	-	-	-	-	-	-
Myrtaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Acca sellowiana</i>	247	N
Oleaceae	<i>Ligustrum japonicum</i>	33	E	-	-	-	<i>Ligustrum japonicum</i>	34	E
Orobanchaceae	<i>Agalinis</i> sp.	107	ND	-	-	-	-	-	-
Plantaginaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Plantago lanceolata</i>	43	E
Rosaceae	<i>Rubus</i> sp.	516	ND	-	-	-	-	-	-
	<i>Malus domestica</i>	66	E	-	-	-	-	-	-
Solanaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Solanum variabile</i>	137	N
Verbenaceae	<i>Lantana megapotamica</i>	22	N	<i>Verbena lobata</i>	132	N	-	-	-
Vitaceae	-	-	-	-	-	-	<i>Parthenocissus quinquefolia</i>	34	E

Legenda: E – exótica; N – nativa; ND – não determinada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

**Tabela 3.2** - Identificação taxonômica e localização geográfica de cada amostra de planta proveniente de seis locais do Estado de Santa Catarina.

São Miguel do Oeste									
Famílias	Espécies	Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3	
		Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem	Espécies	Distância da espécie a colmeia (m)	Origem
Apiaceae	-	-		<i>Foeniculum vulgare</i>	708	E	-	-	
Amaranthaceae	-	-		-	-		<i>Iresine diffusa</i>	626	ND
Brassicaceae	-	-		<i>Raphanus sativus</i>	721	E	-	-	
Fabaceae	-	-		-	-		<i>Arachis pintoii</i>	650	E
Geraniaceae	-	-		-	-		<i>Pelargonium</i> sp.	668	E
Marantaceae	-	-		-	-		<i>Maranta</i> sp.	639	E
Plumbaginaceae	-	-		<i>Plumbago scandens</i>	830	E	-	-	
Rhamnaceae	<i>Hovenia dulcis</i>	337	E	<i>Hovenia dulcis</i>	226	E	<i>Hovenia dulcis</i>	222	E
Rutaceae	-	-		-	-		<i>Ruta graveolens</i>	688	E
Solanaceae	-	-		-	-		<i>Solanum mauritianum</i>	727	N
	-	-		-	-		<i>Solanum</i> sp.	622	N
	-	-		-	-		<i>Solanum variabile</i>	626	N
Talinaceae	-	-		-	-		<i>Talinum paniculatum</i>	651	ND

Legenda: E – exótica; N – nativa; ND – não determinada.

Fonte: Adaptado de Brugnerotto et al. (2021c).

A riqueza de plantas nas regiões estudadas apresentou um total de 81 espécies em 68 gêneros, sendo que 15 espécies (13 gêneros) pertenciam à Asteraceae e 13 espécies (10 gêneros) à Fabaceae. Com exceção das plantas provenientes de São Miguel do Oeste e Mafra, essas famílias estavam com maior riqueza em todas as demais regiões nesse estudo. Em relação à origem, 40 espécies foram identificadas como exóticas, 32 espécies como nativas do Estado de Santa Catarina (15 florestais, 10 campestres e 7 indefinidas) e 9 não foram identificadas suas origens (SOUZA; LORENZI, 2019).

Nesse estudo, para Asteraceae, os gêneros *Baccharis*, *Senecio*, *Sphagneticola* e *Tithonia* foram os mais relatados. Enquanto para Fabaceae, os gêneros mais relatados foram *Trifolium* e *Vicia*. Ambas famílias possuem morfologias variadas e apresentam ampla distribuição geográfica ocupando quase todos os *habitats* e formações vegetacionais (Coradin et al., 2011; Souza & Lorenzi, 2019; Vibrans, et al, 2013). *Raphanus sativus* (Brassicaceae), conhecido popularmente como nabo forrageiro, representou 8,3% do total de amostras identificadas (Apêndice A), estando presente nas áreas de estudo de Araranguá, Caçador, São Miguel do Oeste e São Joaquim. Sua presença em diferentes regiões geográficas de Santa Catarina pode estar associada à capacidade adaptativa de brassicáceas às variações agroclimáticas (SÁ, 2005).

Em relação à contribuição das espécies para o setor apícola catarinense, as origens botânicas de muitos méis catarinenses avaliados por Bergamo (2019) e Silva (2016) - provenientes de Lages, Paineira, Urubici, Bom Retiro, São Bonifácio, Vidal Ramos, São Miguel do Oeste, Videira, Vitor Meireles - são declaradas como méis silvestres ou multiflorais, ou seja, foram produzidos a partir de uma grande variedade de espécies de plantas. Por outro lado, de acordo com a declaração do rótulo (florada predominante) ou por meio de análises de pólen em méis catarinenses, algumas espécies tiveram predominância na oferta de alimentos para as abelhas. Entre as espécies relatadas destacam-se: *Clethra scabra* (Clethraceae) em méis de Itaiópolis (Silva, 2016) e Urupema (BERGAMO, 2019), *Baccharis leucephala* (Asteraceae) (Silva, 2016), *Myrcia multiflora* (Myrtaceae) (BERGAMO, 2019) e *Malus domestica* (Rosaceae) (BERGAMO, 2019) em méis de São Joaquim, *Sida* sp. (Malvaceae) em méis provenientes de Bom Retiro e Urupema (BERGAMO, 2019), *Citrus sinensis* (Rutaceae) em São Bonifácio e Alfredo Wagner (BERGAMO, 2019), *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) em méis de Urupema (BERGAMO, 2019), *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae) de Orleans (Silva, 2016) e *Mimosa scabrella* (Fabaceae) de Lages (BERGAMO, 2019). De acordo com as plantas

identificadas nas áreas de estudo desse trabalho e comparadas com as identificadas nos méis reportados acima, muitas plantas são da mesma espécie, mesmo sendo de diferentes regiões do Estado de Santa Catarina. Além da disponibilidade de alimentos, as abelhas podem ter preferências por determinadas espécies em função do odor, tamanho e coloração das flores (Coradin et al., 2011; Nishida, et al., 2014; Pirani & Cortopassi-Laurino, 1993). Apesar dessas preferências ainda serem pouco elucidadas, destaca-se *Schinus terebinthifolius*, um exemplo de preferência pelas abelhas devido ao seu odor, flores pequenas e coloração branca (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011; NISHIDA; NAIDE; PAGNIN, 2014). Além dessas espécies, em um estudo que compreendeu as regiões catarinenses de Cocal do Sul (28°36'08" S e 49°16'42" W), Criciúma (28°36'30" S e 49°47'43" W) e Nova Veneza (28°38'30" S e 49°21'54" W), 22 famílias (64 espécies) foram visitadas por abelhas, sendo Asteraceae predominante por também apresentar maior número de espécies (Silva, 2005) .

A flora apícola tem influência direta nas características sensoriais e físico-químicas dos méis, sendo estas sujeitas à preferência e aceitação do consumidor. Além disso, de acordo com Coradin et al. (2011), um dos aspectos a ser considerado para uma planta apícola é sua capacidade de apresentar intensa floração e por longos períodos, principalmente em épocas de maior escassez de recursos florais. Nesse estudo não foram consideradas as datas de início e final de floração de cada planta, principalmente por ainda serem desconhecidas as espécies que floresciam em cada local. Ainda, eram esperadas diversidade florística e variações sazonais nos ciclos de floração devido às diferenças climáticas e aos diferentes tipos de relevos (planaltos, serras, vales, entre outros) das regiões amostradas, parâmetros que também influenciam na composição química dos méis, mesmo provenientes dos mesmos locais (BRUGNEROTTO et al., 2021c). Dessa forma, foram realizadas três coletas com intervalos de aproximadamente 20 dias (Tabela 3.2) com o objetivo de avaliar a disponibilidade e diversidade de espécies com potencial melífero. O monitoramento do ciclo de floração de espécies que estão próximas da colmeia pode fornecer uma estimativa de quais plantas contribuíram para a produção do mel, uma vez que esse produto apícola é classificado (unifloral ou multifloral) de acordo com a origem da matéria prima utilizada na sua produção (BRASIL, 2000). De acordo com as informações apresentadas na Tabela 3.2, *Sphagneticola trilobata*, *Trifolium repens*, *T. pratense*, *Cajanus cajan*, *Vicia* sp., *Verbena litoralis*, *Lantana undulata*, *Raphanus sativus* e *Clidemia hirta* permaneceram com flores entre o primeiro e último dia de coleta (~ 60 dias) em quatro

(Joinville, Caçador, Araranguá e São Joaquim) das seis zonas agroecológicas de coleta, as quais também foram regiões com maior número de amostras coletadas e identificadas.

Além da identificação taxonômica das plantas com potencial apícola, informações importantes também foram relatadas a respeito da estimativa da distância percorrida pelas abelhas (*Apis mellifera*) entre a colmeia e as plantas de cada região desse estudo. As abelhas possuem alta capacidade de forragear em uma distância aproximada de até 3 km ao redor do apiário (CAMARGO, 2002). Nesse estudo, a estimativa de distâncias de voo variou entre 8 e 1154 m, geralmente não ultrapassando 750 m (Apêndice A). As distâncias apresentaram maior variabilidade para as amostras provenientes de Araranguá e Caçador, respectivamente de 86 a 1108 m e de 11 a 1154 m, enquanto foram menos variáveis para as de Joinville e Mafra, sendo de 8 a 523 m e de 34 a 436 m, respectivamente. Para as amostras de São Joaquim e São Miguel do Oeste as distâncias variaram de 22 a 516 m e de 222 a 830 m, respectivamente. De maneira geral, as abelhas coletam pólen em um raio de 2 km em torno da colmeia, mas podem voar entre 5 e 13 km para procurar outras fontes (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Conforme relatado por Camargo (2002) quanto menor a distância entre colmeia e flora apícola, maior será a produção de mel, uma vez que o transporte do pólen e do néctar será realizado em menor tempo e com menor gasto energético das abelhas nos deslocamentos. O mesmo autor ressalta que, além da distância, o aspecto produtivo é diretamente influenciado pela qualidade (variedade e densidade populacional das espécies e diferentes períodos de floração) das floradas.

Os resultados desse estudo indicam a necessidade de um plano de monitoramento de vegetações que se desenvolvem próximas de sistemas de produção apícola para auxiliar, não somente os apicultores a encontrarem fontes adequadas e de abundante suprimento de alimentos às abelhas, mas também os agentes técnicos e comunidade científica de forma a evitar informações errôneas. Por meio do registro contínuo de vegetações também será possível identificar o surgimento de novas espécies, contribuir para a conservação da flora nativa, bem como contribuir para o setor apícola e para pesquisadores de diversas áreas por meio do fornecimento desses dados. As ações de caracterização e monitoramento de plantas com potencial apícola também poderão auxiliar a comunidade científica e órgãos regulamentadores de alimentos em relação à presença de compostos químicos em produtos apícolas, como os alcaloides pirrolizidínicos (AP). Esses compostos são toxinas naturais produzidas por alguns

gêneros de Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae (BANDINI; SIANI; SPISSO, 2020) e são comumente encontrados em produtos apícolas, principalmente no mel e no pólen (BRUGNEROTTO et al., 2021a). Portanto, a presença de AP em alimentos é considerada indesejável, principalmente se a soma desses compostos estiver acima de  $71 \mu\text{g kg}^{-1}$  em méis (EFSA et al., 2017) e  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  em polens (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Considerando que nesse trabalho as famílias Asteraceae e Fabaceae foram predominantes, é recomendando que os produtos apícolas provenientes das regiões estudadas sejam avaliados em relação ao conteúdo destes compostos.

### 3.4 Conclusões

Esse foi o primeiro estudo que coletou e identificou espécies de plantas com potencial apícola em sistemas de monitoramento digital apícola no Estado de Santa Catarina. Mesmo sendo resultados exploratórios e com limitações – principalmente em relação ao baixo número de amostras e curto período de coleta das plantas –, foi possível identificar uma pequena parte da flora com potencial apícola em espaços específicos em seis zonas agroecológicas, as quais representam as principais mesorregiões de Santa Catarina e que também apresentam volumes consideráveis de produção de mel. Também foi possível estimar a distância que as abelhas percorreriam para possivelmente coletarem néctar e/ou pólen devido ao registro da localização de cada planta coletada. Alguns fatores, entre os quais, a diferença climática e de relevos, podem ser os principais responsáveis pela heterogeneidade das plantas com potencial apícola identificadas nesse estudo, representadas pelas 81 espécies encontradas. Essa diversidade caracteriza Santa Catarina como um Estado com excelentes condições para exploração da atividade apícola, a qual contribui não somente para produção de diversos produtos apícolas, mas também para a produção de frutas e grãos por meio da polinização, na diversificação cultural para agricultores, bem como, para a conservação das vegetações. É importante destacar que, a partir das informações obtidas nesse estudo, o levantamento das pastagens apícolas geralmente será regional, justamente pela variabilidade de clima e relevo que alteram o fluxo de produção de néctar e pólen (épocas de floração). Devido a isso, é fundamental que os agentes técnicos e pesquisadores juntamente com os apicultores desenvolvam um plano de monitoramento de floradas com calendário de floração próprio para cada região de produção, acompanhando o início e término das floradas em relação às mudanças climáticas. Esse plano

também pode ser uma estratégia interessante para introduzir nos apiários plantas com capacidade adaptativa ao clima e relevo das regiões, com períodos de floração diferenciados para proporcionar oferta contínua de néctar e pólen às abelhas e maximizar a produção de mel e outros produtos apícolas. O conjunto dessas informações deixará de ser um conhecimento empírico e passará a contribuir para a conservação da vegetação nativa, da exploração sustentável das espécies e das abelhas, para o fortalecimento da cadeia produtiva de mel e de monitoramento das colmeias.

## CAPÍTULO IV

### 4 ANÁLISE MELISSOPALINOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM PLANTAS E MÉIS FLORAIS POR LC-ESI-MS/MS

#### Resumo

Os alcaloides pirrolizidínicos (AP) são produzidos exclusivamente por alguns gêneros de plantas das famílias Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae, as quais possuem ocorrência na região Sul do Brasil. A presença destas espécies em locais de produção de mel proporciona a transferências dos AP presentes no pólen e/ou néctar para o produto. Portanto, este estudo determinou alcaloides pirrolizidínicos 1,2-insaturados por LC-MS/MS em méis e plantas (Asteraceae e Fabaceae) com potencial apícola provenientes de um sistema de monitoramento digital apícola do Estado de Santa Catarina. Adicionalmente, para verificar a contribuição de pólen das espécies nos méis, também foi realizada a análise melissopalínológica, sem aplicação de acetólise. Pelo menos um dos sete AP investigados foi detectado nos méis, sendo as amostras provenientes de Caçador (CA,  $n=3$ ) e São Joaquim (SJ,  $n=3$ ) com as maiores somas de AP. A análise de pólen nestas amostras de méis identificou de 13 a 14 famílias de plantas, das quais Asteraceae e Fabaceae apresentaram predominância e maior riqueza de espécies. A partir desta análise, uma amostra de mel de CA foi classificada como monofloral de *Trifolium repens* e as três amostras de mel de SJ como monofloral de *Mimosa scabrella*. Para todas as inflorescências de Asteraceae e Fabaceae provenientes de CA ( $n=15$ ) e SJ ( $n=15$ ) avaliadas em relação aos sete AP, com exceção de licopsamina+intermedina e monocrotalina, senecionina e seu N-óxido, além da retrorsina N-óxido foram detectados em pelo menos uma das amostras avaliadas. Senecionina N-óxido foi encontrada em todas as amostras geralmente com concentrações superiores ( $> 0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) à sua base livre ( $< 0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Inflorescências de *Senecio brasiliensis* foram as que apresentaram concentrações superiores de AP comparadas a todas as demais amostras, chegando a  $2589,22 \text{ mg kg}^{-1}$ . Mesmo buscando explorar diversas informações, neste estudo não foi possível identificar com clareza um perfil entre os resultados de melissopalínologia e os AP determinados nos méis e nas plantas (Asteraceae e Fabaceae), no entanto, foi conferido às inflorescências sua influência para os AP presentes nos méis.

**Palavras-chave:** Análise de pólen; mel floral; alcaloides pirrolizidínicos; cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

## 4.1 Introdução

Os terpenos, compostos fenólicos e os que contêm nitrogênio em sua estrutura, são produtos do metabolismo secundário das plantas (SKONECZNY et al., 2019). Os alcaloides pirrolizidínicos (AP) pertencem a este conjunto diversificado de metabólitos, responsáveis pela defesa das plantas contra herbívoros, patógenos, concorrentes vegetais e, em muitos casos, agem em rápida resposta a estressores ambientais (FANG; FERNIE; LUO, 2019; SKONECZNY et al., 2019). Ao contrário dos potenciais efeitos benéficos à saúde proporcionados pelos compostos fenólicos (KASPRZAK-DROZD et al., 2021), os AP com insaturações em C1 e C2 possuem potencialidade tóxica, de acordo com estudos (*in vivo* e *in vitro*) que foram publicados (ALLEMANG et al., 2018; ZHU et al., 2017).

Os AP são sintetizados por diversos gêneros de plantas, especialmente os pertencentes das famílias Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae (BOPPRÉ et al., 2008; COLEGATE et al., 2018; KOPP; ABDEL-TAWAB; MIZAIKOFF, 2020). Além destas famílias de plantas serem mundialmente as mais estudadas e reportadas (KOPP; ABDEL-TAWAB; MIZAIKOFF, 2020), também estão presentes de maneira abundante na região Sul do Brasil (BANDINI; SPISSO, 2021; BRUGNEROTTO et al., 2021b). Os gêneros *Eupatorium* e *Senecio* (ambas Asteraceae), além de *Echium* e *Heliotropium* (ambas Fabaceae) são comumente os mais avaliados em relação aos AP (BOPPRÉ et al., 2008; BOPPRÉ; COLEGATE; EDGAR, 2005; KAST et al., 2018). No entanto, na região Sul do Brasil, apesar de existir uma ampla diversidade de espécies, ainda são limitados ou inexistentes estudos dessa grandeza, especialmente naquelas plantas que possuem potencial apícola. Geralmente espécies de *Senecio* são as mais estudadas (KREBS; CARL; HABERMEHL, 1996; TRIGO et al., 2003; VALESE et al., 2021), embora alguns estudos reportem AP em *Crotalaria* (Boraginaceae) de alguns estados da região Sul (FLORES; TOZZI; TRIGO, 2009b).

Ao mesmo tempo que as abelhas contribuem para o equilíbrio do ecossistema - polinização, reprodução e sobrevivência de plantas -, e para a produção de alimentos diversificados, estas também transportam compostos indesejáveis à colmeia por meio do néctar e/ou pólen das flores, incluindo os AP (BRUGNEROTTO et al., 2021a). Dentre os principais produtos da colmeia, o mel geralmente recebe maior destaque, especialmente devido ao seu potencial produtivo. Além disso, de acordo com a literatura, também é o produto apícola com maior número de estudos em relação aos AP (BRUGNEROTTO et al., 2021a). Nesse sentido,

o reconhecimento da flora no entorno das colmeias é fundamental para estimar o potencial apícola e otimizar a produção de mel, bem como avaliar a contribuição das espécies a fim de identificar sua origem botânica.

O estudo de reconhecimento das fontes ou dos hábitos alimentares das abelhas geralmente pode ser realizado por meio de observações diretas de forrageamento das abelhas ou de forma indireta pela análise polínica do mel (melissopalinologia). A identificação do tipo polínico presente em amostras de mel é uma das principais e mais efetiva maneira de caracterizar a flora visitada pelas abelhas. A melissopalinologia é uma das áreas da palinologia que estuda espectros polínicos em méis e é capaz de identificar as preferências das abelhas por determinadas flores. Dessa maneira, é possível reconhecer a vegetação apícola local ou regional (origem botânica e geográfica), identificando a contribuição das principais fontes nectaríferas e poliníferas utilizadas pelas abelhas, bem como os principais períodos de produção de néctar e pólen. Pelo controle da origem botânica e geográfica do mel através da melissopalinologia valida-se ou não as informações declaradas nos rótulos, garantindo a procedência floral ou de melato das amostras comerciais (LUZ et al., 2021). Além disso, sob observação microscópica, o mel apresenta algumas informações valiosas sobre práticas de apicultura, como uso de fumaça, alimentação de substitutos de pólen, higiene e possível adulteração (VON DER OHE et al., 2004; WANG; LI, 2011). As diversas origens botânicas do mel de *Apis mellifera* do Estado de Santa Catarina ainda necessitam de extensa comprovação pela melissopalinologia, pois raros são os estudos existentes sobre o tema (BARTH, 2004; SOUZA et al., 2018).

Neste contexto, esse trabalho analisou oito AP 1,2-insaturados em méis florais de colmeias monitoradas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI, no Estado de Santa Catarina, e em plantas de Asteraceae e Fabaceae do entorno das colmeias, bem como realizou a análise melissopalinológica nas amostras de méis.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Reagentes e padrões analíticos

Os padrões analíticos senecionina e retrorsina foram adquiridos da (Steinheim, Alemanha), enquanto retrorsina N-óxido e monocrotalina foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Equimidina, intermedina e licopsamina foram adquiridos da Planta Analytica (Danbury, E.U.A.). Todos os analitos foram disponibilizados pelo Laboratório

Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), Seção Laboratorial Avançada de São José/SC (SLAV/SC) e possuem pureza superior a 95%.

#### 4.2.2 Preparo das soluções

As soluções estoque individuais dos padrões de AP foram preparadas individualmente ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) em metanol, com exceção da equimidina que foi dissolvida com uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . A partir das soluções estoque individuais foi preparada uma solução com todos os padrões na concentração de  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para a curva de calibração (1, 5, 10, 20, 30, 40 e  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ).

#### 4.2.3 Instrumentação e condições cromatográficas

As condições empregadas no LC-ESI-MS/MS foram descritas por Valese et al. (2016). Uma coluna ZORBAX  $\text{C}_{18}$  (4,6 x 100 mm  $3,5 \text{ } \mu\text{m}$ ) da Agilent (Palo Alto, CA, E.U.A.) e um cromatógrafo líquido de alta eficiência, da Agilent Technologies, modelo 1290 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, E.U.A.) acoplado a um espectrômetro de massas, modelo QTRAP<sup>®</sup> 5500 (AB Sciex, Foster City, CA), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*) foram utilizados para análise de AP. Informações adicionais dos analitos avaliados estão apresentadas na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Características químicas dos alcaloides pirrolizidínicos e seus tempos de retenção ( $t_r$ , min).

AP	Fórmula molecular	Massa molar ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$t_r$ (min)	Íon de quantificação	Íon de confirmação
Monocrotalina	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_6$	325,4	4,58	120,1	94,1
Intermedina	$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_5$	299,4	5,31	94,1	138,1
Licopsamina	$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_5$	299,4	5,31	94,1	138,1
Retrorsina	$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_6$	351,4	6,39	138,1	119,2
Retrorsina N-óxido	$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_7$	367,4	6,52	119,0	94,1
Senecionina	$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_5$	335,4	6,96	120,1	93,9
Senecionina N-óxido	$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_6$	351,4	7,08	120,1	324,3
Equimidina	$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_7$	397,5	7,13	120,2	220,1

Fonte: Adaptado de Valese et al. (2016).

As condições instrumentais do cromatógrafo líquido foram: fluxo de 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; temperatura do forno de coluna de 30  $^{\circ}\text{C}$ ; temperatura do amostrador automático de 20  $^{\circ}\text{C}$ ; volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ . O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização positivo, seguidos dos parâmetros: tensão aplicada ao capilar de 5500 V; gás de dessolvatação 25 psi; gás nebulizante 50 psi; gás secante 55 psi; gás de interface 55 psi; e temperatura da fonte 650  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.4 Amostras

##### 4.2.4.1 Coleta das amostras

Informações sobre a coleta das amostras podem ser consultadas na sessão 2.2.1 (Capítulo II) desse trabalho.

Informações sobre a coleta das plantas podem ser consultadas na sessão 3.2.3 (Capítulo III) desse trabalho. É importante ressaltar que foram coletadas plantas com flores próximas às colmeias monitoradas, em um raio de aproximadamente 1 km.

##### 4.2.4.2 Preparo das amostras

Para os méis, o preparo dos extratos para determinação de AP foi realizado de acordo com condições otimizadas, descritas por Valese et al. (2016). Em tubo de polipropileno com capacidade de 50 mL, foi adicionado  $2,0 \pm 0,1$  g de amostra e 5 mL de água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Em seguida a mistura homogeneizada em agitador vortex (Morconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) seguida de agitador orbital (Tecnal Equipamentos para Laboratório, SP, Brasil) por 20 min. Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do extrato e 800  $\mu\text{L}$  de fase móvel (98:2, v/v – água + 0,1 % ácido fórmico:acetonitrila + 0,1 % ácido fórmico) foi transferida para microtubo de polipropileno (capacidade 1,5 mL), centrifugada a 4000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi transferido para tubo tipo *vial* e submetida à análise. O preparo das amostras foi realizado em três réplicas independentes.

Em relação as plantas, o preparo dos extratos para determinação de AP foi realizado de acordo com condições otimizadas, descritas por Valese et al. (2021). As inflorescências secas foram trituradas (Moedor ajustável Hamilton Beach, modelo 80393-BZ220) e uma massa de 50 mg foi diluída em 10 mL de uma solução 70:20:10 % (v:v - metanol:ácido fórmico:água),

agitadas em banho maria tipo Dubnoff (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 30 min a 90 °C. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, E.U.A.) por 15 min, 4000 rpm à 4 °C. A partir de injeções prévias, as amostras foram diluídas (400x e 2000x) em fase móvel (98:2, v/v – água + 0,1 % ácido fórmico:acetonitrila + 0,1 % ácido fórmico), transferidas para *vials* e submetidas à análise. O preparo foi realizado em três réplicas independentes. Apenas as amostras de plantas provenientes de Caçador ( $n = 15$ ) e São Joaquim ( $n = 15$ ) foram preparadas para determinação dos AP.

#### 4.2.5 Análise melissopalínológica

##### 4.2.5.1 Preparo das lâminas

A melissopalínologia foi realizada nas amostras de méis provenientes das cidades de Caçador ( $n = 3$ ) e São Joaquim ( $n = 3$ ) por meio de metodologia descrita por Louveaux, Maurizio, Worwohl (1970) *apud* BARTH (1989) sem aplicação de acetólise. As amostras de mel (10 g) foram dissolvidas em 20 mL de água quente destiladas ( $< 40$  °C) e centrifugadas (10 min a 1500 rpm). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi novamente dissolvido em 10 mL de água destilada e o material centrifugado (5 min a 1500 rpm). A este material foi adicionado 5 mL de glicerol:água (1:1, v:v) e deixado em repouso por 30 min para hidratação dos grãos de pólen e posterior centrifugação e descarte do sobrenadante. O sedimento resultante foi incorporado a gelatina glicerinada e posteriormente colocado sobre a lâmina de microscopia e lamínula que foi vedada com parafina (BARTH et al., 2021).

##### 4.2.5.2 Identificação e quantificação de grãos de pólen

A identificação de grãos de pólen no mel foi realizada com base nas características morfológicas de cada tipo polínico utilizando terminologia específica (BARTH; MELHEM, 1988), referência da literatura (BARTH, 1970a, 1970b, 1970c, 1970d, 1970e, 1989, 1990) e também por comparação com a Palinoteca do Laboratório de Palinologia (PALINO-IPA) do Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Um microscópio óptico Olympus BX 50 (Olympus America Inc., Lake Success, NY, USA) com captura de imagens pela câmera Olympus U-CMAD-2 acoplada ao microscópio e programa CellSens Standard 1.5 para Windows, foram utilizados para identificação e

contagem dos grãos de pólen. Para cada amostra de mel, e sempre que possível, a identificação foi determinada em termos de família, gênero e espécie, todos como tipos morfológicos, ou “tipos polínicos”. O termo “tipo polínico” refere-se a uma única espécie de planta ou a um grupo de espécies, ou táxons superiores, com morfologia polínica semelhante (JOOSTEN, KLERK, 2002; KLERK, JOOSTEN, 2007). Ademais, a partir de informações disponibilizadas sobre as prováveis espécies apícolas que crescem nas áreas do estudo e da consulta de bancos de armazenamento sobre a biologia floral, estas foram agrupadas em poliníferas (plantas que produzem muito pólen), nectaríferas (plantas que produzem muito néctar) ou anemófilas (com dispersão dos grãos de pólen pelo vento e que não produzem néctar). Essa classificação contribui para estimar as propriedades de super- ou sub-representação do pólen nectarífero pelos cálculos utilizados para se obter os padrões de origem floral para cada amostra de mel (BARTH, 1970, 1989).

A análise quantitativa representa a contribuição de néctar de cada tipo polínico por dominância em porcentagem. Portanto, para cada amostra buscou-se uma contagem de 300 grãos de pólen, um valor considerado representativo para a caracterização da origem botânica do mel (BARTH, 1989).

Para o cálculo das frequências totais (origem geográfica), uma primeira soma polínica foi realizada contando todos os tipos de grãos de pólen (nectaríferos, poliníferos e anemófilos) identificados em cada amostra. Na sequência, cada tipo polínico identificado foi agrupado em classes de frequência, como, “pólen dominante” ( $D \geq 45\%$  do total de grãos), “pólen acessório” (A, de 16 a 45% do total de grãos), “pólen isolado importante” (I, de 3 a 15% do total de grãos) e “pólen isolado ocasional” (O,  $\leq 3\%$  do total de grãos) (LOUVEAUX; MAURIZIO; VORWOHL, 1978), conforme Equação 4.1

$$Frequência\ total = \frac{\text{número de grãos do tipo polínicos}}{\text{soma polínica}} \times 100 \quad (\text{Equação 4.1})$$

Uma segunda soma polínica foi realizada para obter a frequência nectarífera (origem botânica). Neste cálculo, foram considerados apenas os grãos de pólen de espécies nectaríferas e os de plantas poliníferas que também produzem néctar, excluindo os provenientes de espécies que se utilizam do vento para a polinização (anemófilos) e espécies poliníferas sem néctar.

Os grãos de pólen de algumas flores que produzem néctar estão super-representados, ou seja, a porcentagem de pólen no sedimento de mel é maior que a porcentagem do néctar correspondente no mel, já que são de plantas que produzem muito pólen e pouco néctar (poliníferas). Apenas méis contendo 90% ou mais do pólen dessas plantas poliníferas podem ser considerados monoflorais dessas espécies. Com alguns outros grãos de pólen a situação se inverte; eles estão sub-representados, como é o caso daqueles provenientes da maioria das plantas nectaríferas, sendo que, para determinadas plantas, uma frequência polínica abaixo de 30% já determina a dominância em néctar no mel dessas espécies (LOUVEAUX et al, 1978). Essa estratégia evita super representatividade de pólen de espécies poliníferas ou erros na interpretação dos dados devido à inclusão de espécies sem néctar (anemófilas) nos cálculos. Para se obter a frequência relativa de cada grupo nectarífero foi utilizada a mesma fórmula (Equação 4.1) e classificação da primeira soma polínica. Inúmeras referências bibliográficas foram consultadas para obter informações sobre a contribuição nectarífera das plantas correspondentes aos tipos polínicos observados nas amostras.

#### 4.3 Resultados e discussão

##### 4.3.1 Determinação de alcaloides pirrolizidínicos em méis

Treze amostras de méis florais provenientes das colmeias monitoradas no Estado de Santa Catarina foram avaliadas em relação à concentração de oito AP. Com exceção da equimidina, todos os outros alcaloides foram detectados em pelo menos uma das amostras (Tabela 4.1). A senecionina foi quantificada em todas as amostras, com concentrações variadas, entretanto com teores mais altos nas amostras de Caçador ( $156,9 \pm 11,9$  a  $1627,3 \pm 43,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e São Joaquim ( $731,2 \pm 74,8$  a  $22932,6 \pm 545,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). O mesmo fato foi observado para retrorsina N-óxido, porém sua concentração não ultrapassou  $650 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A soma das concentrações de licopsamina e intermedina foi detectada em quatro das 13 amostras avaliadas, sendo que três foram méis provenientes da mesma região (São Joaquim). Dos poucos estudos que investigaram AP em méis do Brasil, entre 49,0 % e 99,1 % das amostras tinham pelo menos um dos AP investigados (BANDINI; SPISSO, 2022). Em 10% das amostras de méis florais do Rio de Janeiro as concentrações de AP estavam acima de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , sendo a senecionina encontrada em maior concentração ( $141,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), enquanto a jacobina N-óxido ( $10,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) apresentou menores teores entre os AP quantificados (BANDINI; SPISSO, 2022).

**Tabela 4.2** – Alcaloides pirrolizidínicos ( $\mu\text{g kg}^{-1} \pm$  desvio padrão) \* encontrados em treze méis florais de colmeias monitoradas no Estado de Santa Catarina.

Amostras	Licopsamina + Intermedina	Monocrotalina	Senecionina	Senecionina N-óxido	Retrorsina	Retrorsina N-óxido	Soma
ART	n.d	23,1 $\pm$ 5,4	168,7 $\pm$ 6,1	33,8 $\pm$ 2,4	n.d	106,3 $\pm$ 10,5	332,0 $\pm$ 68,0
CAP	307,4 $\pm$ 17,3	33,6 $\pm$ 5,0	156,9 $\pm$ 11,9	< LOQ	807,4 $\pm$ 31,3	212,7 $\pm$ 18,6	1517,9 $\pm$ 294,4
CAS	n.d	< LOQ	523,3 $\pm$ 4,3	48,5 $\pm$ 5,0	2157,5 $\pm$ 66,9	647,1 $\pm$ 112,9	3376,3 $\pm$ 912,8
CAT	14,7 $\pm$ 0,3	50,2 $\pm$ 5,3	1627,3 $\pm$ 43,9	179,6 $\pm$ 24,1	479,9 $\pm$ 25,1	121,3 $\pm$ 13,9	2473,0 $\pm$ 617,9
JVT	n.d	25,0 $\pm$ 4,2	247,9 $\pm$ 49,8	60,0 $\pm$ 8,9	n.d	80,7 $\pm$ 13,5	413,6 $\pm$ 99,0
MFP	n.d	20,6 $\pm$ 4,8	217,9 $\pm$ 31,5	23,2 $\pm$ 4,6	n.d	73,4 $\pm$ 10,4	335,0 $\pm$ 97,2
MFT	n.d	< LOQ	45,6 $\pm$ 7,8	< LOQ	n.d	30,6 $\pm$ 1,2	76,2 $\pm$ 23,2
SMP	n.d	< LOQ	24,6 $\pm$ 0,1	nd	n.d	16,6 $\pm$ 1,2	41,2 $\pm$ 12,5
SMS	n.d	n.d	87,3 $\pm$ 6,3	38,6 $\pm$ 1,2	n.d	25,7 $\pm$ 3,1	151,7 $\pm$ 32,5
SMT	n.d	n.d	75,4 $\pm$ 3,2	12,9 $\pm$ 0,1	n.d	25,2 $\pm$ 2,4	113,5 $\pm$ 33,1
SJP	557,3 $\pm$ 49,8	20,6 $\pm$ 1,0	731,2 $\pm$ 74,8	101,2 $\pm$ 12,9	n.d	31,9 $\pm$ 4,3	1442,3 $\pm$ 319,5
SJS	63,7 $\pm$ 6,8	135,2 $\pm$ 6,3	1638,0 $\pm$ 221,5	83,0 $\pm$ 8,3	564,1 $\pm$ 9,2	157,6 $\pm$ 15,1	2641,6 $\pm$ 615,2
SJT	44,1 $\pm$ 10,0	37,1 $\pm$ 6,0	22932,6 $\pm$ 545,1	474,6 $\pm$ 23,6	7677,1 $\pm$ 457,8	421,7 $\pm$ 14,2	31587,1 $\pm$ 9153,8

Legenda: AR – Araranguá; CA – Caçador; JV – Joinville; MF – Mafra; SM - São Miguel do Oeste; SJ - São Joaquim; P – Primeira coleta; S – Segunda coleta; T – Terceira coleta; n.d – não detectado; LOQ – limite de quantificação; LOQ da monocrotalina e senecionina N-óxido: 0,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

\* Resultados expressos em base seca.

Fonte: Próprio autor (2022).

Os AP vem sendo detectados em méis com somas que atingiram concentrações entre 14,2 e 3300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (BRUGNEROTTO et al., 2021a), considerada uma ampla faixa de variação, assim como a encontrada nesse estudo ( $41,2 \pm 12,5$  a  $31587,1 \pm 9153,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). De acordo com a soma de AP neste estudo e da ingestão diária recomendada de AP em alimentos (EFSA, 2017), o consumo diário destes méis florais pode variar entre 0,04 g a 34,5 g. Um dos fatores responsáveis pela variabilidade dos resultados apresentados na Tabela 4.2 pode estar relacionado as distintas floradas utilizadas como recursos pelas abelhas, possivelmente de Asteraceae e Fabaceae, que segundo Gasper et al. (2013) além de serem famílias comuns no Estado de Santa Catarina, frequentemente representam maior riqueza em número de espécies. No entanto, a origem geográfica dos méis também pode ser um parâmetro de influência direta nesta variação, uma vez que, plantas sob diferentes condições de clima e solo, podem sofrer ações distintas no metabolismo secundário das espécies e conseqüentemente na produção variada desses componentes pela planta.

Casado; Morante-Zarcelero; Sierra, (2022) observaram que 1 % do número de alertas de alimentos com presença de AP relatado pelo RASFF entre 2010 e 2021, corresponde a méis. Esse índice é um dos mais baixos quando comparados a outros produtos, tais como, pólen (7 %), suplementos alimentares (13 %), chás (15 %), especiarias e ervas aromáticas (57 %). Possivelmente por não haver uma legislação para AP em méis e tampouco a possibilidade de se expressar uma inconformidade de amostras avaliadas, sua inspeção (no mercado ou na fronteira) e notificação ainda são limitados. Por outro lado, é compreensível encontrar maiores índices de notificações pelo RASFF para classes de produtos que possuem limites máximos de AP estabelecidos na legislação (EUROPEAN COMMISSION, 2020), os quais apresentam maior probabilidade de serem inspecionados. De acordo com a Abemel, em 2020 aproximadamente 89% (47,7 toneladas) da produção de mel do mercado brasileiro foi exportado, especialmente para o Estados Unidos e Alemanha (Europa) sendo que apenas a região Sul do Brasil contribuiu com aproximadamente 40 % da produção nacional de mel (ABEMEL, 2022). Dessa forma, considerando o potencial produtivo do setor apícola no Brasil e visando dar suporte a estratégias que visem diminuir os teores encontrados na matriz, bem como traçar o perfil destes contaminantes para auxiliarem em futuras legislações a fim de evitar possíveis barreiras de entrada em mercados internacionais, é de fundamental importância

realizar o monitoramento desses compostos em méis e também identificar espécies que contribuam para sua produção.

#### 4.3.2 Análise de pólen nos méis selecionados

O processo de produção de mel inicia a partir da coleta do néctar, pólen, secreções de partes vivas das plantas e/ou de excreções açucaradas de insetos sugadores de plantas (melato) por abelhas (BRASIL, 2000; BRUGNEROTTO et al., 2019b). Ao coletarem o néctar das flores, as abelhas também coletam naturalmente, ou involuntariamente, o pólen que caiu no néctar por gravidade a partir das anteras da flor e que foram ingeridos e regurgitados com o néctar nos alvéolos dos favos de mel; o pólen que pode estar apenas aderido ao seu corpo via cerdas das patas ou de outras partes devido a interação com as anteras das flores em momentos distintos da busca por néctar; ou ainda, aqueles que foram recolhidos em suas corbículas e depois armazenados nos favos especialmente destinados para o pólen (pão da abelha). Além disso, pode ocorrer a introdução dos grãos de pólen de plantas anemófilas no mel por terem caído diretamente do ar na superfície floral de outras espécies atrativas para as abelhas ou serem introduzidos no mel estocado pelas correntes de vento que penetram na colméia (BARTH, 1989). O néctar floral é reconhecido como uma importante fonte de carboidrato para as abelhas, enquanto o pólen fornece à colônia proteína, lipídios, vitaminas e minerais, portanto, ambos fornecem os nutrientes necessários para a manutenção e desenvolvimento da colônia (COOK et al., 2003; KHAN et al., 2021). Apesar do forrageamento de néctar parecer ser dependente da disponibilidade de recursos nectaríferos, e o de pólen por particularidades da colmeia (presença de larvas e ovos) (HOOVER; Ovinge, 2018), é imprescindível que exista diversidade e equilíbrio da ingestão de nutrientes (néctar, pólen, exsudatos ou alimentação artificial energética e/ou proteica) para o adequado desenvolvimento nutricional e manutenção da colônia (HOOVER; Ovinge, 2018; KHAN et al., 2021).

Mesmo diante de inúmeros fatores, os quais são normalmente difíceis de serem controlados, a melissopalinologia fornece uma caracterização geográfica da vegetação apícola da área de produção do mel e uma aproximação da preferência das abelhas pelos recursos florais disponíveis. Nesse sentido, o perfil botânico para amostras de méis de Caçador ( $n=3$ ) e São Joaquim ( $n=3$ ) foi verificado e está apresentado nas Tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente. Para as três amostras de mel provenientes de Caçador foram encontrados 23 tipos polínicos (14

famílias), sendo 18 relacionados a plantas nectaríferas, e dois tipos não identificados (Tabela 4.3). Os demais tipos polínicos foram relacionados a plantas que não produzem néctar, mas produzem muito pólen, ou ainda aquelas que dispersam seus grãos de pólen pelo vento (tipos polínicos de plantas anemófilas) e que ingressaram no mel como “contaminação” pelos estoques de pólen dos favos das colmeias ou trazidos pelas correntes de ar. *Trifolium repens* (nome popular: trevo-branco) foi identificada nos méis de todas as coletas, mas especialmente no mel da primeira coleta onde apresentou maior contribuição (46,28%) e, portanto, foi classificado como mel monofloral de *Trifolium repens*. Além desta espécie, *Galactia* sp. (10,74%), *Schinus* sp. (9,92%), *Raphanus sativus* (9,09%) e *Malus* sp. (8,26%) que são espécies nectaríferas, também apresentaram significativa contribuição no mel da primeira coleta. Em relação às amostras de méis da segunda e terceira coletas, ambas foram classificadas como heteroflorais, porém entre os tipos polínicos encontrados, as nectaríferas *Cotoneaster* sp. (39,47%), *Eucalyptus* sp. (17,54%), *Galactia* sp. (13,16%) e *Matayaba* sp. (13,16%) apresentaram maiores contribuições na segunda coleta. Por outro lado, a amostra de mel da terceira coleta as espécies nectaríferas de *Baccharis* sp. (31,17%), *Cotoneaster* sp. (16,88%), *Ligustrum* sp. (15,58%), *Eucalyptus* sp. (14,29%) e *Galactia* sp. (12,69%) foram as que se destacaram. Das 14 famílias encontradas, Asteraceae (*Baccharis* sp., *Hypochaeris* sp.) e especialmente Fabaceae (*Acacia* sp., *Galactia* sp., *Mimosa scabrella*, *Trifolium repens*, *Vicia* sp.) foram identificadas em pelo menos uma das coletas dos méis.

**Tabela 4.3** - Caracterização polínica dos méis provenientes de Caçador, Estado de Santa Catarina.

Continuação

Tipos polínicos	Caçador – coleta 1			Caçador – coleta 2			Caçador – coleta 3		
	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen
<b>Anacardiaceae</b>									
<i>Schinus</i> sp.*	8,57	9,92	I	-	-	-	-	-	-
<b>Aquifoliaceae</b>									
<i>Ilex</i> sp.*	2,14	2,48	O	2,34	2,63	O	2,05	3,90	I
<b>Arecaceae</b>									
<i>Butiá eriospatha</i> *	-	-	-	0,78	0,88	O	0,68	1,30	O
<b>Asteraceae</b>									
<i>Baccharis</i> sp. *	5,00	5,79	I	0,78	0,88	O	16,44	31,17	A
<i>Hypochaeris</i> sp. *	-	-	-	-	-	-	1,37	2,60	O
<b>Brassicaceae</b>									
<i>Raphanus sativus</i> *	7,86	9,09	I	0,78	0,88	O	0,68	1,30	O
<b>Euphorbiaceae</b>									
<i>Sebastiania</i> sp.*	1,43	1,65	O						
<b>Fabaceae</b>									
<i>Acacia</i> sp.*	1,43	1,65	O	-	-	-	-	-	-
<i>Galactia</i> sp.*	9,29	10,74	I	11,72	13,16	I	6,85	12,99	I
<i>Mimosa scabrella</i> *	0,71	0,83	O	-	-	-	-	-	-
<i>Trifolium repens</i> *	40,00	46,28	D	-	-	-	-	-	-
<i>Vicia</i> sp. *	-	-	-	4,69	5,26	I	-	-	-
<b>Myrtaceae</b>									
<i>Eucalyptus</i> sp.*	1,43	1,65	O	15,63	17,54	A	7,53	14,29	I
<i>Myrcia</i> sp. #	8,57	----	I	9,38	----	I	41,78	----	A

Legenda: \* - Tipos polínicos de plantas nectaríferas; # - Tipos polínicos de plantas políferas; D - pólen dominante (> 45% do total de grãos de pólen contados); A - pólen acessório (15 - 45% do total de grãos de pólen contados); I - pólen importante (3 - 15% do total de grãos de pólen contados); O - pólen isolado ocasional (< 3% do total de grãos de pólen contados); “ - “ refere-se a não encontrado; “ ---- “ apenas para tipos polínicos de plantas não nectaríferas.

Fonte: Próprio autor (2022).

**Tabela 4.3** - Caracterização polínica dos méis provenientes de Caçador, Estado de Santa Catarina.

Tipos polínicos	Caçador – coleta 1			Caçador – coleta 2			Caçador – coleta 3			Conclusão.
	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	
<b>Malpighiaceae</b> #	0,71	----	O							
<b>Oleaceae</b>										
<i>Ligustrum</i> sp. *	-	-	-	-	-	-	8,22	15,58	A	
<b>Poaceae</b> #	1,43%	----	O				0,68	----	O	
<i>Zea mays</i> #	2,86%	----	O	-	-	-	-	-	-	
<b>Polygonaceae</b>										
<i>Rumex</i> sp.#	-	-	-	-	-	-	4,11	----	I	
<b>Rosaceae</b>										
<i>Malus</i> sp.*	7,14%	8,26%	I	-	-	-	-	-	-	
<i>Cotoneaster</i> sp*	-	-	-	35,16	39,47	A	8,90	16,88	A	
<b>Sapindaceae</b>										
<i>Cupania</i> sp.*	1,43%	1,65%	O	5,47	6,14	I	-	-	-	
<i>Matayba</i> sp. *	-	-	-	11,72	13,16	I	-	-	-	
Não identificado1#	-	-	-	0,78	----	O	-	-	-	
Não identificado2#	-	-	-	0,78	----	O	0,68	----	O	

Legenda: \* - Tipos polínicos de plantas nectaríferas; # - Tipos polínicos de plantas poliníferas; D - pólen dominante (> 45% do total de grãos de pólen contados); A - pólen acessório (15 - 45% do total de grãos de pólen contados); I - pólen importante (3 - 15% do total de grãos de pólen contados); O - pólen isolado ocasional (< 3% do total de grãos de pólen contados); “-” refere-se a não encontrado; “----” apenas para tipos polínicos de plantas não nectaríferas.

Fonte: Próprio autor (2022).

As amostras de méis provenientes de São Joaquim apresentaram 23 tipos polínicos (13 famílias), sendo destes, 17 relacionados a plantas nectaríferas, e um tipo não identificado (Tabela 4.4). Assim como as amostras de Caçador, os demais tipos polínicos foram relacionados a plantas que não produzem néctar, mas produzem muito pólen, ou ainda aquelas que dispersam seus grãos de pólen pelo vento (tipos polínicos de plantas anemófilas) e que ingressaram no mel como “contaminação” pelos estoques de pólen dos favos das colmeias ou trazidos pelas correntes de ar. As três amostras foram classificadas como monoflorais de *Mimosa scabrella* (Fabaceae), com contribuições que variaram entre 61,38 e 91,44% de pólen desta espécie. É importante destacar que *Raphanus sativus* (Brassicaceae) apresentou significativa contribuição (17,22%) na amostra da primeira coleta, enquanto para o mel da terceira coleta, *Baccharis* sp. (Asteraceae) se destacou com 14,81% de contribuição de pólen. Das 13 famílias encontradas, Asteraceae (*Baccharis* sp., *Hypochaeris* sp., *Senecio brasiliensis* e *Vernonia* sp.) e Fabaceae (*Mimosa scabrella*, *Trifolium pratense* e *Vicia* sp.) estiveram presentes em pelo menos uma das coletas.

**Tabela 4.4** - Caracterização polínica dos méis provenientes de São Joaquim, Estado de Santa Catarina.

Continuação

Tipos polínicos	São Joaquim – coleta 1			São Joaquim– coleta 2			São Joaquim – coleta 3		
	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen
<b>Apiaceae</b> *	0,88	1,11	O	-	-	-	0,46	0,53	O
<b>Asteraceae</b>									
<i>Baccharis</i> sp. *	1,32	1,67	O	0,85	0,86	O	12,84	14,81	I
<i>Hypochaeris</i> sp. *	0,88	1,11	O	0,17	0,17	O	1,83	2,12	O
<i>Senecio brasiliensis</i> *	-	-	-	0,34	0,34	O	0,46	0,53	O
<i>Vernonia</i> sp.*	3,52	4,44	I	2,71	2,74	O	2,29	2,65	O
<b>Brassicaceae</b>									
<i>Raphanus sativus</i> *	13,66	17,22	A	0,17	0,17	O	-	-	-
<b>Fabaceae</b>									
<i>Mimosa scabrella</i> *	51,98	65,56	D	90,51	91,44	D	53,21	61,38	D
<i>Trifolium pratense</i> *	-	-	-	-	-	-	0,46	0,53	O
<i>Vicia</i> sp.*	-	-	-	-	-	-	0,46	0,53	O
<b>Myrtaceae</b>									
<i>Eucalyptus</i> sp.*	0,88	1,11	O	-	-	-	-	-	-
<i>Feijoa sellowiana</i> #	14,54	----		-	-	-	11,47	----	I
<i>Myrcia</i> sp. #	-	-	-	0,17	----	O	-	-	-
<b>Oleaceae</b>									
<i>Ligustrum</i> sp.*	-	-	-	-	-	-	2,75	3,17	I
<b>Poaceae</b> #	4,41	----	I	-	-	-	-	-	-
<b>Polygonaceae</b>									
<i>Rumex</i> sp. #	0,88	----	O	0,68	----	O	0,92	----	

Legenda: \* - Tipos polínicos de plantas nectaríferas; # - Tipos polínicos de plantas políneas; D - pólen dominante (> 45% do total de grãos de pólen contados); A - pólen acessório (15 - 45% do total de grãos de pólen contados); I - pólen importante (3 - 15% do total de grãos de pólen contados); O - pólen isolado ocasional (< 3% do total de grãos de pólen contados); “ - “ refere-se a não encontrado; “ ---- “ apenas para tipos polínicos de plantas não nectaríferas.

Fonte: Próprio autor (2022).

**Tabela 4.4-** Caracterização polínica dos méis provenientes de São Joaquim, Estado de Santa Catarina.

Conclusão.

Tipos polínicos	São Joaquim – coleta 1			São Joaquim– coleta 2			São Joaquim – coleta 3		
	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen	Soma Total (%)	Soma Nectarífera (%)	Classificação tipo de pólen
<b>Rosaceae</b>									
<i>Cotoneaster</i> sp.*	-	-	-	-	-	-	4,13	4,76	
<i>Malus</i> sp.*	6,17	7,78	I	2,88	2,91		1,83	2,12	O
<b>Sapindaceae</b>									
<i>Allophylus</i> sp.*	-	-	-	0,17	0,17		1,83	2,12	O
<i>Cupania</i> sp.*	-	-	-	-	-	-	0,46	0,53	O
<i>Matayba</i> sp.*	-	-	-	-	-	-	1,83	2,12	O
<b>Solanaceae</b>									
<i>Solanum</i> sp. #	-	-	-	-	-	-	0,92	----	O
<b>Verbenaceae</b>									
<i>Verbena</i> sp.*	-	-	-	1,02	1,03		1,83	2,12	O
<b>Winteraceae</b>									
<i>Drimys</i> sp.#	-	-	-	0,17	----		-	-	-
Não identificado3#	0,44	----	O	-	-	-	-	-	-

Legenda: \* - Tipos polínicos de plantas nectaríferas; # - Tipos polínicos de plantas poliníferas; D - pólen dominante (> 45% do total de grãos de pólen contados); A - pólen acessório (15 - 45% do total de grãos de pólen contados); I - pólen importante (3 - 15% do total de grãos de pólen contados); O - pólen isolado ocasional (< 3% do total de grãos de pólen contados); “ - “ refere-se a não encontrado; “ ---- “ apenas para tipos polínicos de plantas não nectaríferas.

Fonte: Próprio autor (2022).

Os méis de Caçador e São Joaquim apresentaram Asteraceae e Fabaceae como famílias predominantes e com algumas espécies em comum, entre elas, *Baccharis* sp., e *Hypochoeris* sp. (ambas Asteraceae), além de *Mimosa scabrella*, *Trifolium pratense* e *Vicia* sp. (todas Fabaceae). No estudo de Valse et al. (2022) os méis ( $n=7$ ) catarinenses (Bocaina do Sul, São Joaquim e Urupema) apresentaram 29 tipos polínicos, sendo que as contribuições de pólen mais significativas foram de *Baccharis* sp. (até 40,4 %) e *Mimosa scabrella* (até 85,9%). Azevedo et al. (2016) ao analisarem os perfis proteômicos, em conjunto com a melissopalínologia, de cinco amostras de mel floral de bracinga (*Mimosa scabrella*) coletadas de abril a junho de 2014 em Urupema, confirmaram que três foram monoflorais de bracinga, enquanto duas foram heteroflorais apresentando alta frequência desse tipo polínico em conjunto com *Baccharis*. Outros grãos de pólen de Asteraceae que ocorreram em menor frequência nas amostras foram *Chaptalia*, *Elephantopus* e *Vernonia*, e dentre as Fabaceae, o de *Inga* (AZEVEDO 2016). Em amostras de méis ( $n=16$ ) do Estado de São Paulo foram identificadas 29 famílias (42 gêneros) sendo que Fabaceae e Asteraceae também apresentaram maior riqueza de tipos polínicos, com 9 (*Acaria* sp., *Anadenanthera* sp., *Caesalpinia* sp., *Copaifera* sp., *Cassia* sp., *Mimosa* sp., *Mimosa pudica/scabrella*, *Mimosa caesalpiniaefoli* e *Stylosanthes* sp.) e 5 (*Ambrosia* sp., *Baccharis* sp., *Bidens* sp., *Elephantopus* sp. e *Eupatorium* sp.) respectivamente (SANTOS, 2016). BARTH (2004), em seu levantamento sobre os trabalhos publicados em melissopalínologia no Brasil, indicou que desde o primeiro publicado em 1961 até 2004, poucos foram aqueles que trataram de méis da região sul. Com base nesses trabalhos a autora descreveu que os tipos polínicos de Asteraceae, em especial os de *Senecio brasiliensis* (nome popular: maria-mole), e os de Fabaceae, principalmente *Mimosa scabrella*, foram importantes nos méis do Sul do país. Até 2004 somente o trabalho de CAMPOS (1999) havia sido publicado para amostras de melato de Santa Catarina.

Recentemente um estudo realizou um levantamento de publicações (2005 - 2017) sobre o uso da melissopalínologia para caracterizar produtos da abelha no Brasil e reportou que as regiões centro-oeste (44,4%) e sudeste (36,8%) lideraram no emprego deste tipo de análise, enquanto a região Sul empregou em apenas 4,5% dos trabalhos publicados e, dentre esses, a maioria foi do Paraná (DE SOUZA; DE ABREU; DE NOVAIS, 2019). Apesar do levantamento ter sido realizado até o ano de 2017, esses dados indicam uma escassez de informações sobre a origem botânica dos produtos, especialmente daqueles provenientes da região Sul do Brasil.

Ainda, as famílias de plantas mais frequentes, com base no número de tipos de pólen ( $> 15$ ) (DE SOUZA; DE ABREU; DE NOVAIS, 2019) foram Asteraceae e Fabaceae, as principais famílias também detectadas nos méis deste trabalho. Em méis, pólen de *Eucalyptus* (Myrtaceae) foram encontrados em altas porcentagens indicando o reflexo do avanço dessa monocultura em diversos estados do Brasil (DE SOUZA; DE ABREU; DE NOVAIS, 2019). Neste estudo também foi encontrado pólen de *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) em todos os méis de Caçador, com contribuição máxima de 17,54% do total de pólen, e também na amostra de mel da primeira coleta de São Joaquim ( $< 1,2\%$  do total de pólen).

#### 4.3.3 Alcaloides pirrolizidínicos em Asteraceae e Fabaceae

Inflorescências com potencial apícola pertencentes às famílias Asteraceae e Fabaceae, previamente coletadas próximas das colmeias (Caçador,  $n=15$ ; São Joaquim,  $n=15$ ) foram avaliadas em relação a oito AP (Tabela 4.5). Licopsamina+intermedina e monocrotalina não foram detectadas, enquanto a retrorsina N-óxido foi detectada apenas nas amostras de *Senecio brasiliensis* e na amostra de *Bidens* sp. A equimidina também foi encontrada apenas na amostra de *Bidens* sp., proveniente da primeira coleta em Caçador com concentração de  $17,8 \pm 0,2$  mg  $\text{kg}^{-1}$ . Senecionina N-óxido foi encontrada em todas as amostras geralmente com concentrações superiores ( $> 0,8$  mg  $\text{kg}^{-1}$ ) à sua base livre ( $< 0,3$  mg  $\text{kg}^{-1}$ ). Por outro lado, senecionina, senecionina N-óxido, além da retrorsina N-óxido foram os AP detectados em pelo menos uma das amostras avaliadas.

A *S. brasiliensis* (Asteraceae) é uma das principais plantas que representam um alerta frente aos AP na região Sul do Brasil devido aos relatos de casos de intoxicação em animais (equinos, bovinos) (CORRÊA et al., 2008; LEITE DAU et al., 2019; PANZIERA et al., 2017) e mais recentemente em humanos (BARCELOS et al., 2021) após sua ingestão. Mesmo sendo amplamente reportada como causadora de intoxicações, poucos são os estudos que avaliaram os AP nesta planta (KREBS; CARL; HABERMEHL, 1996; TRIGO et al., 2003; VALESE et al., 2021) e que reportaram uma consequência negativa quando presente em regiões próximas de colmeias (VALESE et al., 2021). Neste estudo foram encontrados senecionina e seu N-óxido, além de retrorsina N-óxido em todas as amostras de *S. brasiliensis*. De fato, entre as amostras deste estudo, todas as *S. brasiliensis* apresentaram maiores teores de AP, especialmente senecionina N-óxido ( $< 2589,22 \pm 134,19$  mg  $\text{kg}^{-1}$ ) e retrorsina N-óxido ( $<$

1956,84 ± 257,02 mg kg<sup>-1</sup>) (Tabela 4.5). Os AP do tipo senecionina costumam ser detectados em plantas do gênero *Senecio* (BRUGNEROTTO et al., 2021a), e os dados deste estudo corroboram com os achados por Trigo et al. (2003) onde as abundâncias relativas desse tipo de AP foram encontrados em *S. brasiliensis* dos estados do Rio Grande do Sul (Osório e Guaíba) e São Paulo (Rodovia 270, Km 27). Flores desta espécie, provenientes do Estado de Santa Catarina (Bocaina do Sul, São Joaquim e Urupema), também foram avaliadas por Valesse et al. (2021) e os mesmos AP foram detectados, porém os teores de senecionina N-óxido (3,99 x 10<sup>4</sup> a 9,22 x 10<sup>4</sup> mg kg<sup>-1</sup>) e retrorsina N-óxido (2,45 x 10<sup>4</sup> a 4,74 x 10<sup>4</sup> mg kg<sup>-1</sup>) foram superiores comparados as concentrações encontradas para *S. brasiliensis* neste estudo.

Além de *S. brasiliensis*, outras cinco diferentes espécies de Asteraceae (n=13) foram avaliadas neste estudo, sendo *Baccharis* sp., *Baccharis semiserrata* e *Bidens* sp, provenientes de Caçador, e *Baccharis uncinella*, *Leucanthemum vulgare* e *Hypochaeris* sp., provenientes de São Joaquim (Tabela 4.5). Com exceção de *Leucanthemum vulgare* (exótica) e *Hypochaeris* sp. (espécie não determinada/identificada), todas são espécies nativas da região (BRUGNEROTTO et al., 2021b), porém até o momento não foram encontrados estudos que haviam investigado AP nestas plantas. Para todas as espécies de *Baccharis* (n=6) e independente da região geográfica, apenas senecionina N-óxido foi detectada, em concentrações inferiores a 3,5 mg kg<sup>-1</sup>. Por outro lado, apesar de *Bidens* sp. (n=1) estar presente em apenas uma das coletas (Caçador), quatro dos oito AP investigados foram detectados, sendo equimidina (17,78 ± 0,24 mg kg<sup>-1</sup>) em maior concentração. *Leucanthemum vulgare* (n=2) foi coletada durante o primeiro e segundo ciclo de coletas em São Joaquim e *Hypochaeris* sp. (n=1) coletada apenas no terceiro ciclo de coletas, também na mesma região. Senecionina N-óxido foi um dos AP comum entre as espécies, geralmente em maior concentração na *Leucanthemum vulgare* (< 4,67 ± 0,36 mg kg<sup>-1</sup>).

Espécies de *Trifolium repens*, *Vicia* sp., e *Ingá* sp. provenientes de Caçador e *Trifolium repens* e *Trifolium pratense* provenientes de São Joaquim, todas Fabaceae (n=14), também foram analisadas neste estudo. A espécie de *Ingá* sp. é considerada nativa da região, *Vicia* sp. não foi possível de ser identificada se nativa ou exótica, enquanto as espécies de *Trifolium* são consideradas exóticas, ou seja, que são provenientes de fora de sua área de distribuição natural (BRUGNEROTTO et al., 2021b). Com exceção de *Ingá* sp. (primeira coleta de Caçador), para todas as demais espécies a soma dos AP não ultrapassou 4,5 mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5** – Alcaloides pirrolizidínicos (AP, mg kg<sup>-1</sup>)\* encontrados em espécies de Asteraceae e Fabaceae coletadas no Estado de Santa Catarina.  
Continuação

CAÇADOR								
Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3		
Asteraceae	AP	Soma	Asteraceae	AP	Soma	Asteraceae	AP	Soma
<i>Senecio brasiliensis</i>	Senecionina (273,13 ± 4,95) e seu N-O e (1674,43 ± 89,47) retrorsina N-O (1956,84 ± 257,02)	1967,13	<i>Senecio brasiliensis</i>	Senecionina (119,17 ± 3,67) e seu N-O (839,50 ± 28,82) e retrorsina N-O (1279,13 ± 60,87)	971,46	-	-	-
<i>Baccharis</i> sp.	Senecionina N-O (1,02 ± 0,11)	1,02	<i>Baccharis</i> sp.	Senecionina N-O (3,01 ± 0,06)	3,37	-	-	-
<i>Baccharis semiserrata</i>	Senecionina N-O (0,54 ± 0,10)	0,54	<i>Baccharis semiserrata</i>	Senecionina N-O (0,43 ± 0,01)	0,43	-	-	-
<i>Bidens</i> sp.	Senecionina (0,30 ± 0,03) e seu N-O (1,33 ± 0,56), retrorsina N-O (3,86 ± 0,15 e equimidina (17,78 ± 0,24)	23,27	-	-	-	-	-	-
Fabaceae	AP	Soma	Fabaceae	AP	Soma	Fabaceae	AP	Soma
<i>Trifolium repens</i>	Senecionina N-O (0,79 ± 0,06)	0,79	<i>Trifolium repens</i>	Senecionina N-O	< LOQ	<i>Trifolium repens</i>	Senecionina N-O	<LOQ
<i>Vicia</i> sp.	Senecionina N-O (2,20 ± 0,08)	2,20	<i>Vicia</i> sp.	Senecionina N-O	< LOQ	<i>Vicia</i> sp.	Senecionina N-O (0,44 ± 0,08)	0,44
<i>Inga</i> sp.	Senecionina (0,40 ± 0,01) e seu N-O (6,16 ± 0,10) e retrorsina N-O (4,88 ± 0,76)	11,44	-	-	-	<i>Inga</i> sp.	Senecionina N-O	<LOQ
SÃO JOAQUIM								
Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3		
Asteraceae	AP	Soma	Asteraceae	AP	Soma	Asteraceae	AP	Soma
<i>Leucanthemum vulgare</i>	Senecionina (1,46 ± 0,06) e seu N-O (4,67 ± 0,36)	6,14	<i>Leucanthemum vulgare</i>	Senecionina (0,35 ± 0,03) e seu N-O (0,87 ± 0,10)	1,22	<i>Hypochaeris</i> sp.	Senecionina N-O (0,35 ± 0,01)	0,35
<i>Senecio brasiliensis</i>	Senecionina (130,74 ± 11,64) e seu N-O (2589,22 ± 134,19), retrorsina N-O (699,29 ± 22,93)	2596,35	<i>Senecio brasiliensis</i>	Senecionina (236,12 ± 10,09) e seu N-O (1697,71 ± 136,21), retrorsina N-O (1466,98 ± 69,84)	1712,61	<i>Vernonia</i> sp.	Senecionina N-óxido (1,25 ± 0,10)	1,25

\*Resultados expressos em matéria seca.

Fonte: Próprio autor (2022).

**Tabela 4.5** – Alcaloides pirrolizidínicos (AP, mg kg<sup>-1</sup>)\* encontrados em espécies de Asteraceae e Fabaceae coletadas no Estado de Santa Catarina. Conclusão.

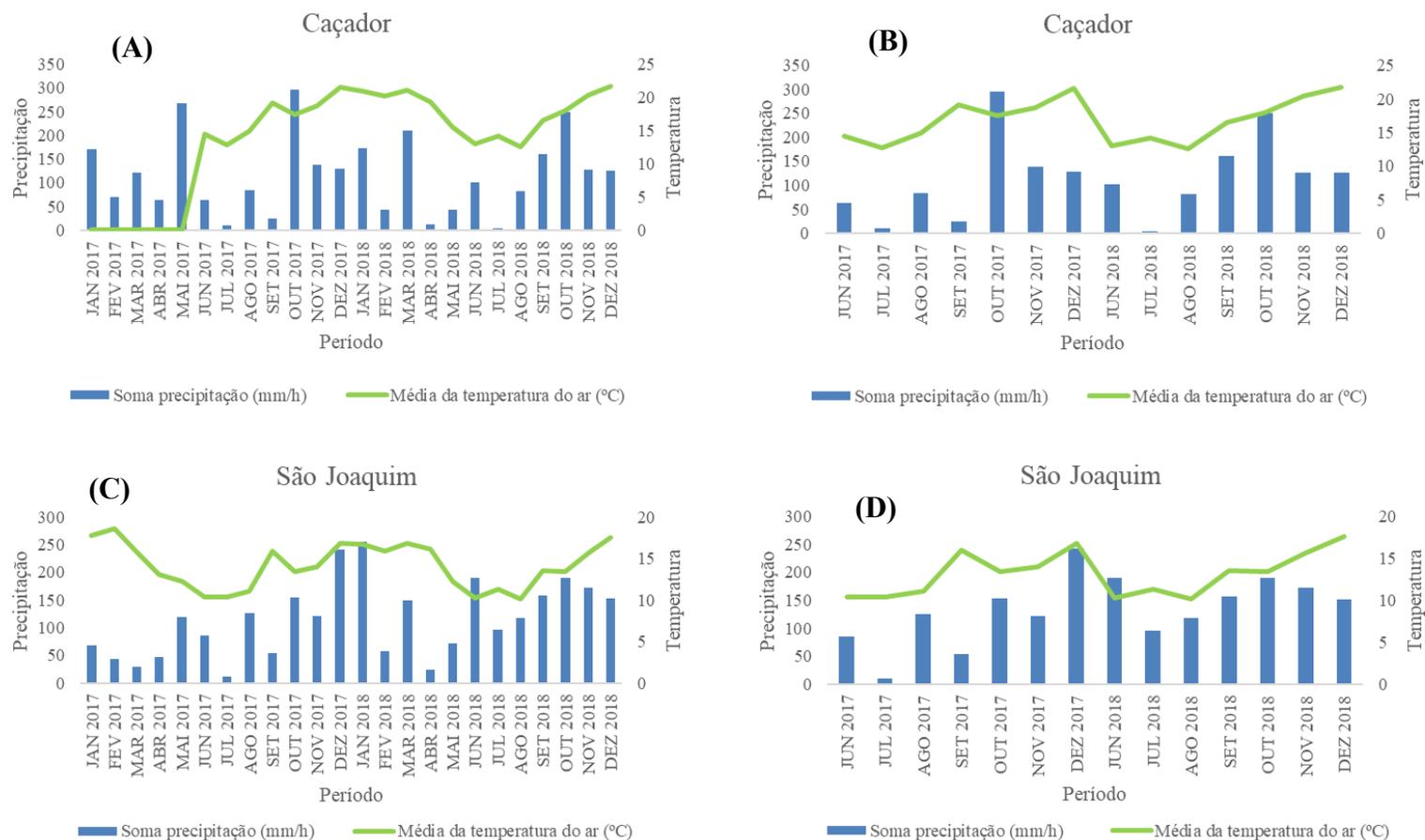
SÃO JOAQUIM								
Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3		
Asteraceae	AP	Soma	Asteraceae	AP	Soma	Asteraceae	AP	Soma
<i>Baccharis uncinella</i>	Senecionina N-O (2,16 ± 0,19)	2,16	<i>Baccharis uncinella</i>	Senecionina N-O (1,67 ± 0,18)	1,67	-	-	-
-	-	-	<i>Baccharis</i> sp.	< LOQ	< LOQ	-	-	-
Fabaceae	AP	Soma	Fabaceae	AP	Soma	Fabaceae	AP	Soma
<i>Trifolium pratense</i>	Senecionina N-O (3,37 ± 0,07)	3,37	<i>Trifolium pratense</i>	Senecionina N-O (2,11 ± 0,08)	2,11	<i>Trifolium pratense</i>	Senecionina N-O (0,33 ± 0,02)	0,33
<i>Trifolium repens</i>	Senecionina N-O (0,62 ± 0,01)	0,62	<i>Trifolium repens</i>	Senecionina N-O (2,49 ± 0,16)	2,49	<i>Trifolium repens</i>	Senecionina (0,35 ± 0,02) e seu N-O (4,04 ± 0,16)	4,39

\*Resultados expressos em matéria seca.

Fonte: Próprio autor (2022).

Neste estudo, amostras de *S. brasiliensis* provenientes de São Joaquim apresentaram teores mais elevados de retrorsina N-óxido comparadas com as de Caçador, além de ser observado que as plantas de *S. brasiliensis* provenientes da região serrana apresentaram um perfil de teores mais elevados de AP comparado às *S. brasiliensis* do Alto Vale do Rio do Peixe (Caçador). Múltiplos fatores podem estar envolvidos nestes resultados, incluindo a idade e parte amostral da planta (folha, inflorescência, cauda), presença de estressores (insetos e/ou animais) e até mesmo à influência de fatores ambientais (clima e precipitação) que interferem no metabolismo secundário da planta (SKONECZNY et al., 2019; TAMAKHINA et al., 2020). A partir dos parâmetros ambientais obtidos em estações meteorológicas do Ciram/Epagri, próximas da área de estudo de Caçador (26°49'04.080" S e -50°59'34.080" W) e São Joaquim (28°16'31.080" S e -49°56'03.120" W) observamos dois cenários (Figura 4.1). No primeiro deles, para Caçador, entre os meses de janeiro e dezembro de 2017 e 2018 (Figura 4A), a precipitação apresentou variabilidade (10,2 a 249,4 mm; soma mensal), porém com meses geralmente mais secos durante o ano de 2018. A temperatura ambiente média variou de 15 a 20 °C, sendo que para os primeiros meses (janeiro a maio) de 2017 não foram registrados dados na estação de Caçador. No segundo cenário, para São Joaquim (Figura 4C) também foi observada uma variabilidade na precipitação (10,8 a 255,2 mm; soma mensal) porém com meses mais chuvosos durante 2018 e com temperatura ambiente média geralmente inferior a 16 °C. A condição ambiental é um dos fatores que influenciam no sincronismo e na intensidade de floração (MENG et al., 2022) e que também podem interferir sobre o metabolismo secundário, produzindo mais ou menos compostos químicos (AKHKUBEKOVA; TAMAKHINA, 2021). É importante considerar que este estudo demonstra um caráter exploratório devido ao número limitado de amostras, ausência de informações sobre idade das plantas e por não existirem informações relacionadas ao monitoramento/coleta de anos anteriores. No entanto, os resultados preliminares sugerem que invernos (junho-setembro) mais chuvosos e mais frios, como na região de São Joaquim (Figura 4D), podem potencializar a produção de concentrações mais elevadas de AP nas inflorescências de *S. brasiliensis*. O inverno é a estação que antecede a primavera e conseqüentemente o período de floração da maioria das flores no Brasil, especialmente *S. brasiliensis* (setembro a novembro).

**Figura 4.1** - Precipitação e temperatura ambiente registrados pela Epagri/Ciram entre os meses de janeiro e dezembro de 2017 e 2018 nas cidades de Caçador e São Joaquim, Estado de Santa Catarina.



Legenda: (A) Precipitação e temperatura ambiente para Caçador de janeiro a dezembro de 2017 e 2018 (A) e junho a dezembro de 2017 e 2018 (B); Precipitação e temperatura ambiente para São Joaquim de janeiro a dezembro de 2017 e 2018 (C) e junho a dezembro de 2017 e 2018 (D)

Fonte: Banco de dados da Epagri/Ciram.

Em geral, todas as plantas das famílias Asteraceae e Fabaceae apresentaram distintos teores de AP, os quais podem ser transferidos para os méis ou outros produtos apícolas. *Senecio brasiliensis* foi a principal espécie que contribuiu para as maiores concentrações de AP, representando em torno de 400x maior que as concentrações de AP para as demais espécies avaliadas. Além disso, com exceção de *Senecio brasiliensis*, geralmente as concentrações de AP individuais eram similares entre as mesmas espécies coletadas no primeiro, segundo ou terceiro ciclo de coletas.

#### **4.3.4 Melissopalínologia e alcaloides pirrolizidínicos em méis e plantas das famílias Asteraceae e Fabaceae**

Com a finalidade de verificar a influência das floradas nos teores de AP nos méis, algumas informações foram agrupadas e apresentadas na Tabela 4.6. De maneira geral, nos méis foram detectados mais AP que nas plantas, ademais, na maioria das vezes os mesmos tipos de AP detectados nas plantas também foram detectados nos méis, em suas formas de base livre e/ou N-óxido.

Espécies do gênero *Senecio* geralmente produzem AP do tipo senecionina (jacobina, retrorsina, senecionina, senecifilina, senkirina, e seus N-óxidos) (BRUGNEROTTO et al., 2021a). Neste estudo, a *S. brasiliensis* apresentou níveis elevados de senecionina e seu N-óxido e retrorsina N-óxido e, devido a isso, pode ser considerada uma das espécies que mais contribuiu para os elevados teores de AP nos méis, mesmo com baixa contribuição de pólen (<1%) nos méis de SJN e SJD ou ausência de detecção de pólen desta espécie nos demais méis (SJO, CAO, CAN e CAD). No entanto, a detecção de pólen de outras espécies de Asteraceae e Fabaceae nos méis, bem como, a comprovação de presença de AP nas inflorescências destas famílias próximas das colmeias, também contribuem para a soma dos AP em todos os méis de Caçador e São Joaquim. Méis da região serrana do Estado de Santa Catarina (Bocaina do Sul, São Joaquim e Urupema) também apresentaram perfil similar ao deste estudo em relação as baixas contribuições de pólen de espécies de Asteraceae e Fabaceae nos méis mas com elevados teores de AP nos méis (VALESE et al., 2021).

A *Mimosa scabrella* (bracatinga) possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os estados da região Sul do Brasil (DUTRA et al., 2012). Esta espécie é especialmente reconhecida por fornecer sua seiva (janeiro a junho) a insetos sugadores de plantas, os quais liberam exsudatos açucarados que as abelhas recolhem para produção

do mel de melato de bracinga (BRUGNEROTTO et al., 2019b). Esse fenômeno e produto único, ocorre principalmente no Estado de Santa Catarina devido a densidade populacional de bracingas e sua infestação pelos pulgões. Por outro lado, em períodos de floração, geralmente entre junho e setembro, a depender das condições ambientais, a bracinga também fornece néctar e pólen às abelhas para a produção de méis florais (VALESE et al., 2021). Neste estudo, a melissopalinologia identificou presença considerável de pólen de *Mimosa scabrella* nas três amostras de méis florais de São Joaquim, coletadas respectivamente em outubro, novembro e dezembro. Esta planta, com presença de flores, foi identificada na área de estudo (São Joaquim), porém não foi coletada, principalmente por apresentar alturas entre 4 m e 18 m, o que limitou o acesso à sua coleta. Não foi comum identificar a bracinga com flores e tampouco se esperava obter méis uniflorais desta planta, uma vez que, no Estado de Santa Catarina a bracinga normalmente floresce entre junho e setembro (BACKES; NARDINO, 2003). No entanto, alterações ambientais podem agir sob os aspectos fisiológicos da planta, alterando seu ciclo natural de florescimento, bem como, sob o polinizador fazendo com que o mesmo selecione os recursos alimentares mais próximos de suas colmeias. Na região de São Joaquim, em junho de 2018, a qual seria a época normal de início de floração das bracingas, o nível de precipitação foi 122,3% maior que o mesmo período de 2017. Esse fato possivelmente retardou o surgimento dos botões e das flores de bracinga e, devido a isso, esta espécie foi identificada com flores no local de estudo entre os meses de outubro e dezembro de 2018. Em Caçador, não foi constatada a presença de bracinga na área de estudo e tampouco foi coletada, apesar do pólen desta espécie ter sido detectado em percentual menor que nos méis coletados em São Joaquim. No entanto, sabemos que a distância que as abelhas podem percorrer pela busca de alimentos é muito variada (BRUGNEROTTO et al., 2021b) e influenciada por diversos fatores, entre os quais, a necessidade nutricional da própria colmeia ou pela atratividade das flores (cor e aroma, por exemplo)

Neste estudo foi observado que entre os períodos de coleta (~20 dias) das amostras (méis e plantas) ocorreu o surgimento de novas espécies ou ausência daquelas existentes (Tabela 4.6). Esse comportamento pode ser compreensível por características próprias de cada espécie ou, novamente, pela influência de condições ambientais que também atuam sob o seu desenvolvimento e épocas de floração. Adicionalmente, a necessidade nutricional da colmeia também faz com que as abelhas busquem fontes

alternativas e mais distantes que aquelas normalmente percorridas, e que não fazem parte da área de estudo.

Neste estudo também foi possível verificar que as preferências das abelhas nem sempre foram semelhantes às aquelas observadas pelo homem, tratando-se das plantas Asteraceae e Fabaceae coletadas e dos grãos de polen destas famílias identificadas nos méis, mesmo em um pequeno intervalo de tempo (~20 dias). Esses resultados são importantes para indicar que a melissopalínologia, mesmo sendo uma análise indireta e que pode conter limitações, ainda pode ser uma aliada importante na elucidação da origem botânica do mel evitando um tipo de fraude pela rotulagem errônea deste produto.

Os AP licopsamina+intermedina foram detectados em todos os méis de São Joaquim e em dois méis de Caçador, porém não foram identificados nas plantas. Os alcaloides do tipo licopsamina (equimidina, indicina, intermedina, licopsamina e seus N-óxidos) (EFSA, 2011) são frequentemente reportados como sendo típicos de Asteraceae e alguns gêneros de Boraginaceae e Apocinaceae (FRÖLICH; OBER; HARTMANN, 2007; WEBER et al., 1999). Sendo assim, pode ser considerado comum a presença destes tipos de AP nos méis deste estudo, uma vez que foram identificados pólenes de gêneros de Asteraceae nos méis, ou também pela possível presença de pólenes de outras famílias não identificadas na melissopalínologia, como a Boraginaceae. Além disso, a presença deste tipo de AP no mel está relacionada à forma em que este analito está presente na matriz (base livre) e pela disponibilidade destes padrões analíticos no método empregado. Por outro lado, a sua ausência nas plantas pode estar diretamente relacionada com a sua forma predominante (N-óxido) e, por uma ausência deste padrão analítico e consequente indisponibilidade no método empregado, não foi possível de ser identificado nas inflorescências. A oxidação do nitrogênio na base necina é uma reação catalisada por via enzimática, enquanto a redução de AP N-óxido ocorre espontaneamente na presença de agentes redutores químicos ou biológicos (EFSA, 2011). Muitas plantas passam por mudanças bioquímicas em resposta ao ataque de estressores, fazendo com que estas respondam de forma rápida e consequentemente estimulando a produção de enzimas. Portanto, provavelmente em casos que foram detectados senecionina e seu N-óxido nas plantas, essa conversão possivelmente ocorreu na matriz de forma espontânea pela ação de enzimas, que também facilitam e aceleram reações entre substâncias químicas presentes na matriz.

**Tabela 4.6** – Informações de melissopalínologia, alcalóides pirrolizidínicos em méis e plantas das famílias Asteraceae e Fabaceae.

Amostras	Soma APs ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	% do total de grãos de pólen de Asteraceae e Fabaceae identificadas no mel	AP detectados no mel (% da soma de APs)	Asteraceae e Fabaceae analisadas	AP detectados nas plantas
CAO	1517,9 $\pm$ 292,4	<u>Asteraceae</u> : <i>Baccharis</i> sp. (5,79%) <u>Fabaceae</u> : <i>Acacia</i> sp. (1,65%), <i>Galactia</i> sp. (10,74%), <i>Mimosa scabrella</i> (0,83%) e <i>Trifolium repens</i> (46,28%)	Licopsamina+intermedina (20,2%), monocrotalina (2,2%), senecionina (10,3%), retrorsina (53,1%) e retrorsina N-óxido (14,0%)	<i>Senecio brasiliensis</i> , <i>Baccharis</i> sp., <i>Baccharis semiserrata</i> , <i>Bidens</i> sp., <i>Trifolium repens</i> , <i>Vicia</i> sp. e <i>Inga</i> sp.	Senecionina Senecionina N-óxido Retrorsina N-óxido Equimidina
CAN	3376,3 $\pm$ 912,8	<u>Asteraceae</u> : <i>Baccharis</i> sp. (0,88%) <u>Fabaceae</u> : <i>Galactia</i> sp. (13,16%) e <i>Vicia</i> sp. (5,26%)	Senecionina (15,5%), senecionina N-óxido (1,4%), retrorsina (63,9%) e retrorsina N-óxido (19,2%)	<i>Senecio brasiliensis</i> , <i>Baccharis</i> sp., <i>Baccharis semiserrata</i> , <i>Trifolium Repens</i> e <i>Vicia</i> sp.	Senecionina Senecionina N-óxido Retrorsina N-óxido
CAD	2473,0 $\pm$ 617,9	<u>Asteraceae</u> : <i>Baccharis</i> sp. (31,17%) e <i>Hypochaeris</i> sp. (2,60%) <u>Fabaceae</u> : <i>Galactia</i> sp. (12,99%)	Licopsamina+intermedina (0,6%), monocrotalina (2,0%), senecionina (65,8%), senecionina N-óxido (7,3%), retrorsina (19,4%) e retrorsina N-óxido (4,9%)	<i>Trifolium repens</i> , <i>Vicia</i> sp. e <i>Inga</i> sp.	Senecionina N-óxido
SJO	1442,3 $\pm$ 319,5	<u>Asteraceae</u> : <i>Baccharis</i> sp. (1,67%), <i>Hypochaeris</i> sp. (1,11%) e <i>Vernonia</i> sp. (4,44%); <u>Fabaceae</u> : <i>Mimosa scabrella</i> (65,56%)	Licopsamina+intermedina (38,6%), monocrotalina (1,4%), senecionina (50,7%), senecionina N-óxido (7,0%), e retrorsina N-óxido (2,2%)	<i>Leucanthemum vulgare</i> , <i>Senecio brasiliensis</i> , <i>Baccharis uncinella</i> , <i>Trifolium pratense</i> e <i>Trifolium repens</i>	Senecionina Senecionina N-óxido Retrorsina N-óxido
SJN	2641,6 $\pm$ 615,2	<u>Asteraceae</u> : <i>Baccharis</i> sp. (0,86%), <i>Hypochaeris</i> sp. (0,17%), <i>Senecio brasiliensis</i> (0,34%) e <i>Vernonia</i> sp. (2,74%); <u>Fabaceae</u> : <i>Mimosa scabrella</i> (91,44%)	Licopsamina+intermedina (2,4%), monocrotalina (5,1%), senecionina (62,0%), senecionina N-óxido (3,1%), retrorsina (21,3%) e retrorsina N-óxido (6,0%)	<i>Leucanthemum vulgare</i> , <i>Senecio brasiliensis</i> , <i>Baccharis uncinella</i> , <i>Trifolium pratense</i> e <i>Trifolium repens</i>	Senecionina Senecionina N-óxido Retrorsina N-óxido
SJD	31578,1 $\pm$ 9153,8	<u>Asteraceae</u> : <i>Baccharis</i> sp. (14,81%), <i>Hypochaeris</i> sp. (2,12%), <i>Senecio brasiliensis</i> (0,53%) e <i>Vernonia</i> sp. (2,65%); <u>Fabaceae</u> : <i>Mimosa scabrella</i> (61,38%), <i>Trifolium pratense</i> (0,53%) e <i>Vicia</i> sp. (0,53%)	Licopsamina+intermedina (0,1%), monocrotalina (0,1%), senecionina (72,6%), senecionina N-óxido (1,5%), retrorsina (24,3%) e retrorsina N-óxido (1,4%)	<i>Hypochaeris</i> sp., <i>Vernonia</i> sp., <i>Trifolium pratense</i> e <i>Trifolium repens</i>	Senecionina Senecionina N-óxido

Legenda: CA – Caçador; SJ - São Joaquim; As letras O, N e D correspondem aos meses de coleta que foram outubro, novembro e dezembro.

Fonte: Próprio autor (2022).

Assim como ocorreu para licopsamina+intermedina, a monocrotalina também foi detectada em algumas amostras, porém este AP não foi identificado nas plantas avaliadas. Os AP do tipo monocrotalina (fulvina, monocrotalina, retusamina e trichodesmina) (EFSA, 2011), especialmente a monocrotalina é frequentemente reportada como majoritária em plantas (sementes e folhas) do gênero *Crotalaria* (Fabaceae) (RECH et al., 2022; SCUPINARI et al., 2020). No entanto, Zhou et al. (2010) reportaram a presença deste composto em partes inteiras de Asteraceae (*Parasenecio otopteryx*, *Parasenecio ambiguus*, *Parasenecio phyllolepis*, *Senecio nemorensis* e *Senecio scandens*) de diferentes locais da China com concentrações que variaram entre 0,004 e 0,072 mg kg<sup>-1</sup>. Assim como a licopsamina+intermedina, a monocrotalina também foi determinada em todas as amostras de méis de São Joaquim e em duas amostras de méis de Caçador, com contribuição entre 0,1 e 5,1% da soma de AP nas amostras, entretanto não foi identificada nas plantas. Sendo assim, a presença desta substância nos méis avaliados pode ser proveniente de algum gênero de Asteraceae possivelmente próxima das colmeias monitoradas. Além disso, assim como foi reportado para licopsamina, a ausência (<LOD) de monocrotalina N-óxido nas plantas pode estar relacionada à indisponibilidade deste analito no método.

Neste estudo não foi possível identificar com clareza um perfil entre os resultados de melissopalínoliga e os AP determinados nos méis e nas plantas (Asteraceae e Fabaceae). No entanto, para todas as Asteraceae e Fabaceae pelo menos um dos oito AP avaliados foram detectados (Tabela 4.5), especialmente as formas N-óxido de senecionina e retrorsina, evidenciando que as espécies destas famílias influenciaram nos teores de AP nos méis. A amostra de mel com maior soma de AP (SJD) foi a que também apresentou maior número de espécies detectadas no mel, incluindo *Trifolium pratense* (0,53%), *S. brasiliensis* (0,53%), *Baccharis* sp. (14,81%), entre outras. Espécies dos gêneros *Baccharis* e *Trifolium*, mesmo sendo amostras coletadas e também com pólenes detectados nos méis parecem não contribuir consideravelmente na influência de AP nos méis, principalmente quando comparadas à *S. brasiliensis*. A presença de algumas espécies de *Galactia* (*Galactia aschersoniana* e *Galactia stenophylla*) são consideradas raras na região Sul do Brasil (CEOLIN; MIOTTO, 2009), não sendo portanto identificadas e tampouco coletadas nas regiões deste estudo. No entanto, *Galactia* sp. (Fabaceae), foi identificada em todos os méis de Caçador com contribuições de

pólen entre 10,74 e 12,99% e, portanto, pode ser considerada uma potencial matriz de contribuição com elevados teores de AP nos méis.

#### 4.5 Conclusões

Neste estudo méis florais de colmeias monitoradas no Estado de Santa Catarina foram avaliados em relação a oito AP, sendo senecionina, retrorsina e seus N-óxidos, os principais responsáveis pelas maiores somas de AP, especialmente daqueles provenientes de Caçador e São Joaquim. Estes méis também apresentaram presença de pólen de diversas espécies plantas, porém com predominância daquelas pertencentes às famílias Asteraceae (*Baccharis* sp., *Hypochaeris* sp., *Senecio brasiliensis*, entre outras) e Fabaceae (*Acacia* sp., *Galactia* sp., *Mimosa scabrella*, *Trifolium repens*, entre outras). A análise de AP nas plantas pertencentes a essas famílias demonstrou que todas apresentaram pelo menos um dos oito AP investigados, principalmente senecionina e seu N-óxido, além de retrorsina N-óxido. Portanto, apesar de existirem diversos fatores que influenciam na produção de diferentes AP e na variabilidade de suas concentrações nas plantas, foi possível sugerir que todas as plantas das famílias Asteraceae e Fabaceae analisadas contribuíram para a presença dos AP nos méis, uma vez que em todas as amostras avaliadas foi detectada a presença de AP. Além disso, muitas das amostras de plantas coletadas também foram identificadas no mel por meio da melissopalinologia. É importante destacar que alguns gêneros de Asteraceae e Fabaceae foram avaliados pela primeira vez em relação aos AP.

## Capítulo V

### 5 DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella*) POR LC-ESI-MS/MS

#### Resumo

A *Mimosa scabrella* pertence a família Fabaceae, encontrada em matas de araucária na região Sul do Brasil e da qual se obtém o mel de melato. Esta família é conhecida na literatura por geralmente produzir substâncias químicas com potencial efeito prejudicial a saúde humana, como os alcaloides pirrolizidínicos (AP). Frente ao exposto, este estudo investigou oito AP por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em 42 amostras de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella*) (MMB) provenientes majoritariamente do Estado de Santa Catarina, Brasil. Monocrotalina, equimidina e retrorsina não foram detectados nas amostras. Por outro lado, intermedina+licopsamina e senecionina foram os AP determinados em todos os MMB e contribuíram majoritariamente para a soma dos AP ( $5,6 \pm 0,9$  a  $2409,8 \pm 175,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Mesmo não sendo possível identificar um perfil na soma dos AP entre as três safras de méis bianuais (2016, 208 e 2020), apenas 21,4% das amostras apresentaram soma superior a  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A ingestão diária calculada também ficou abaixo ( $< 0,008 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia) da recomendação de ingestão diária de AP em alimentos ( $< 0,0237 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia). Com base nos resultados deste estudo também foi observado que geralmente o consumo do MMB sem potencial risco agudo de intoxicação pode variar entre de 1,5 a 24,6 g de mel/dia. Apenas o consumo dos MMB avaliados, mesmo com concentrações relativamente altas de AP, apresenta baixo risco ou não se caracteriza preocupante a exposição humana uma vez que valores de margem de exposição foram  $\geq 10.000$ . Portanto, foi observado que provavelmente esta planta pode ser responsável pelos níveis de AP nos méis, uma vez que, este tipo de mel é proveniente majoritariamente de uma única fonte botânica (melato/exsudato).

**Palavras-chave:** Mel de melato; Avaliação da margem de exposição; cromatografia líquida; Segurança alimentar.

## 5.1 Introdução

Os alcaloides pirrolizidínicos (AP) são amplamente estudados em diversos tipos de produtos (chás, especiarias, leites e derivados, produtos da colmeia, cereais, carnes, entre outros) (CHMIT; WAHRIG; BEUERLE, 2019; CHUNG; LAM, 2017; MULDER et al., 2016; VALESE et al., 2021), gerando um crescente número de publicações científicas, alertas, recomendações de ingestão diária e regulamentação por diversos pesquisadores e órgãos governamentais em todo o mundo (AECOSAN, 2020; BFR, 2011, 2013, 2018; CHUNG; LAM, 2017; EFSA, 2007, 2011; EFSA et al., 2017; EUROPEAN COMMISSION, 2020).

A presença de AP em alimentos é indesejável devido à sua potencialidade tóxica para animais e seres humanos (EFSA, 2011; KAKAR et al., 2010). Os humanos são frequentemente expostos aos AP por meio da ingestão de todos os tipos de produtos que os contém. De acordo com He et al. (2021) aproximadamente 17 mil casos de intoxicação e lesões hepáticas em humanos que ingeriram principalmente ervas, chás e grãos contendo AP foram registrados em diversos países. No entanto, os AP precisam de ativação metabólica (enzimas hepáticas) para formar compostos reativos, ou seja, adutos de pirrol com proteína e/ou DNA que podem levar a citotoxicidade e genotoxicidade se as taxas de conjugação com a glutathione (mecanismo de eliminação) no organismo humano também forem baixas. Essas conjugações, bem como as taxas de degradação de AP também são dependentes das estruturas monoésteres, diésteres cíclicos ou acíclicos (GEBUREK et al., 2020).

A presença de AP em produtos apícolas, especialmente em méis (independente da origem botânica), foi reportada em diversos países, e com concentrações variadas (BRUGNEROTTO et al., 2021a). Essa característica é compreensível uma vez que os AP são compostos secundários produzidos por muitos gêneros de plantas, especialmente pelas famílias Asteraceae, Fabaceae e Boraginaceae (KOPP; ABDEL-TAWAB; MIZAIKOFF, 2020). Os méis florais tem sido o foco de estudos na investigação de AP, uma vez que o pólen e/ou néctar são considerados os principais veículos destas substâncias. Portanto, os méis provenientes de exsudatos de insetos sugadores de plantas e/ou de secreções de partes vivas de plantas são raramente investigados em termos de presença de AP (KAST et al., 2014; KOWALCZYK; KWIATEK, 2018) pressupondo sua ausência, ou concentrações desprezíveis. Essa é uma conduta preocupante, uma vez que o produto pode ser proveniente de espécies vegetais que produzem tais compostos, os quais estão presentes em diferentes partes das plantas (FRÖLICH;

HARTMANN; OBER, 2006; LEEPER; VEDERAS, 2007), ou pela presença de reduzidas quantidades de pólen neste tipo de mel que, indesejavelmente pode ser coletado pelas abelhas durante o forrageamento.

A planta *Mimosa scabrella* Bentham (Fabaceae), popularmente conhecida como bracatinga, possui ocorrência natural na região do Sul do Brasil com considerável importância econômica (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Além da bracatinga ser utilizada para lenha e carvão de excelente qualidade, também é uma importante espécie apícola para produção de mel de melato (BRUGNEROTTO et al., 2019b). A produção desse mel geralmente ocorre em regiões com altitudes acima de 700 metros, na carência de néctar (janeiro-junho) de outras espécies, em ciclos bianuais e na presença de insetos (*Tachardiella* sp. ou *Stigmatococcus paranaensis* Foldi) sugadores da seiva desta árvore. A excreção (exsudato/melato) açucarada de insetos sugadores é coletada pelas abelhas (*Apis mellifera*) e transportadas até a colmeia, onde ocorre a maturação desse produto, chamado de mel de melato de bracatinga (BRUGNEROTTO et al., 2019b). Apesar desse mel já ter sido avaliado com relação às características físico-químicas, incluindo minerais, açúcares, compostos fenólicos, aminoácidos; além da bioatividade, por meio da atividade anti-inflamatória e antioxidante (AZEVEDO et al., 2021; BERGAMO et al., 2018b, 2019; BRUGNEROTTO et al., 2019a; SERAGLIO et al., 2016; SILVA et al., 2020), dados sobre AP nesta matriz são inexistentes até o presente momento. Adicionalmente a sua investigação, avaliar o potencial risco que os AP representam a saúde de consumidores também vem sendo recomendando pelo EFSA, uma vez que, os AP são considerados substâncias químicas carcinogênicas genotóxicas (HARDY et al., 2017). Dentre as metodologias disponíveis para caracterizar o risco da exposição a substâncias carcinogênicas e genotóxicas (JARDIM; CALDAS, 2009), a margem de exposição (MOE) é uma abordagem usada por avaliadores de risco para considerar possíveis preocupações de segurança decorrentes da presença de substâncias potencialmente tóxicas em alimentos (EFSA et al., 2017; HARDY et al., 2017). Essa abordagem representa uma razão de dois fatores que avaliam para uma determinada população a dose na qual um efeito adverso pequeno, mas mensurável, é observado primeiro e o nível de exposição à substância considerada (EFSA, 2017).

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi empregar a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinar oito AP (licopsamina, intermedina,

monocrotalina, echimidina, senecionina, senecionina N-óxido, retrorsina e retrorsina N-óxido) em méis de melato de bracinga produzidos no Estado de Santa Catarina e Paraná, Brasil, bem como avaliar potencial risco de exposição aos AP possivelmente presentes nos méis usando a abordagem margem de exposição (MOE).

## 5.2 Materiais e métodos

### 5.2.1 Reagentes e padrões analíticos

Os reagentes e padrões analíticos utilizados neste estudo estão descritos na seção 4.2.1 do Capítulo 4.

### 5.2.2 Preparo das soluções

O preparo das soluções utilizadas neste estudo está descrito na seção 4.2.2 do Capítulo 4.

### 5.2.3 Instrumentação e condições cromatográficas

A instrumentação e condições cromatográficas para análise dos AP neste estudo foram os mesmos apresentados na seção 4.2.3 do Capítulo 4.

### 5.2.4 Coleta das amostras

As amostras de mel de melato de bracinga das safras de 2016, 2018 e 2020 foram coletadas em diferentes cidades do Estado de Santa Catarina ( $n = 38$ ) e Paraná ( $n = 4$ ) conforme apresentado na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** - Informações sobre as amostras de mel de melato de bracatinga.

<b>Origem geográfica</b>	<b>Ano produção</b>	<b>ID</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Ano produção</b>	<b>ID</b>
Urupema	2016	1	Bocaina do Sul	2018	22
Urupema	2016	2	General Carneiro <sup>a</sup>	2018	23
Urupema	2016	3	General Carneiro <sup>a</sup>	2018	24
Bocaina do Sul	2016	4	Imbituba	2018	25
Bocaina do Sul	2016	5	Lages	2018	26
Bocaina do Sul	2016	6	Monte Castelo	2018	27
Urubici	2016	7	Otacílio Costa	2018	28
Urubici	2016	8	Santa Terezinha	2018	29
São Joaquim	2016	9	São Bonifácio	2018	30
São Joaquim	2016	10	Urupema	2018	31
São Joaquim	2016	11	Bocaina do Sul	2020	32
Lages	2016	12	Bocaina do Sul	2020	33
Lages	2016	13	Bela Vista do Toldo	2020	34
Lages	2016	14	Caçador	2020	35
Urubici	2016	15	Caçador	2020	36
Água Doce	2018	16	Caçador	2020	37
Araranguá	2018	17	São Joaquim	2020	38
Bom Retiro	2018	18	Videira	2020	39
Bom Retiro	2018	19	Comercial	2020	40
Bom Retiro	2018	20	União da Vitória <sup>a</sup>	2020	41
Bocaina do Sul	2018	21	União da Vitória <sup>a</sup>	2020	42

ID – número de identificação da amostra; <sup>a</sup> – amostras provenientes do Estado de Paraná.

Fonte: Próprio autor (2022).

Todas as amostras foram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas (25 °C) e armazenadas (-18 °C) ao abrigo da luz até o momento das análises.

### 5.2.5 Preparo das amostras

O preparo de amostras deste estudo está descrito na seção 4.2.4.1 do Capítulo 4.

### 5.2.6 Ingestão diária estimada e margem de exposição

A avaliação de risco foi calculada a partir da ingestão diária estimada (IDE), conforme apresentada na Equação 5.1

$$IDE = \frac{C \times M}{PC \times 1000} \quad \text{Equação 5.1}$$

Fonte: Wang et al. (2021).

Onde:  $C$  é o conteúdo total de AP detectados nas amostras ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e  $M$  o consumo máximo ou recomendado da amostra (g). O fator 1000 é usado para converter  $M$  de g em kg. O  $PC$  é o peso corpóreo de 60 kg. A IDE foi expressa em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia.

A EFSA propôs o uso da abordagem margem de exposição (MOE,  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia) para avaliação de risco de substâncias que possuem propriedades genotóxicas e carcinogênicas (EFSA et al., 2017). A MOE pode ser calculada a partir da Equação 5.2, sendo a BMDL (do inglês, *benchmark dose level*), preferencialmente a  $BMDL_{10}$ , identificada como ponto de referência toxicológico mais adequado para a estimativa.

$$MOE = \frac{BMDL_{10}}{IDE} \quad \text{Equação 5.2}$$

Fonte: Wang et al. (2021).

O  $BMDL_{10}$  de  $237 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia foi selecionado como dose de referência de avaliação de risco crônico a partir de um estudo de incidência de hemangiossarcoma hepático em ratos expostos a riddelliina (EFSA et al., 2017). Portanto, este valor de  $BMDL_{10}$  foi adotado como o ponto de partida para a caracterização de riscos de exposições aos AP potencialmente presentes nas amostras de melato de bracinga avaliadas. Valores de  $MOE \geq 10.000$  são considerados de baixa preocupação para saúde pública (EFSA et al., 2017).

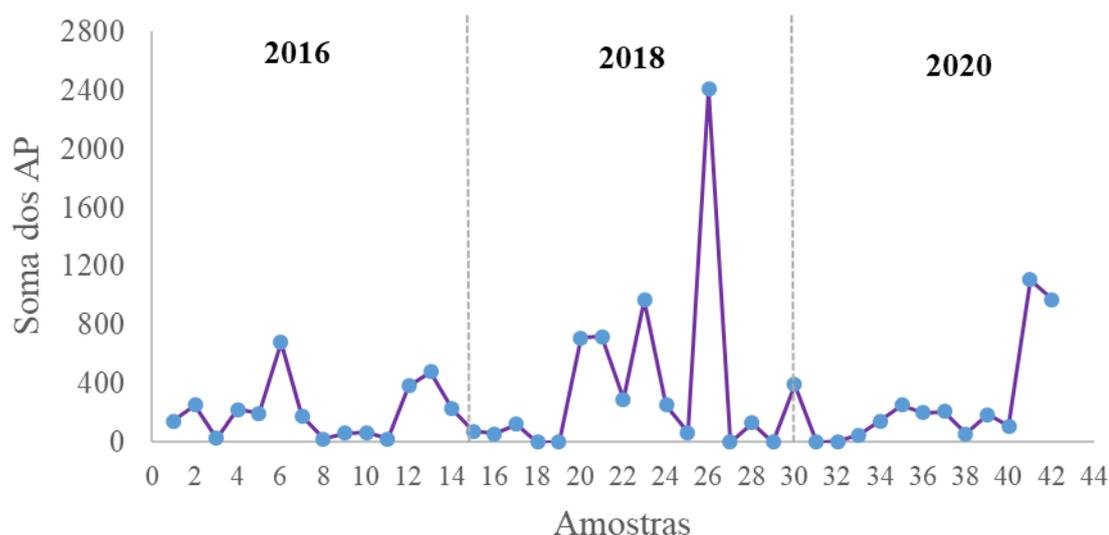
### 5.2.7 Análise dos dados

Os softwares Excel e ORIGIN<sup>®</sup> Pro 8 foram empregados para realizar o tratamento dos dados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) a partir da obtenção de análises de três réplicas independentes.

### 5.3 Resultados e discussão

Dos oito AP investigados, monocrotalina, equimidina e retrorsina não foram detectados nas amostras avaliadas. Informações detalhadas sobre os AP encontrados e suas respectivas concentrações estão apresentadas no Apêndice G. Intermedina+licopsamina foram detectados em todas as amostras e apresentaram concentrações entre  $<LOQ$  e  $1038,2 \pm 64,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ , enquanto a senecionina variou de  $<LOQ$  a  $2357,7 \pm 172,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Por outro lado, senecionina N-óxido foi encontrada em duas amostras com concentrações que variaram de  $29,2 \pm 4,8$  a  $58,8 \pm 4,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , enquanto retrorsina N-óxido foi determinada em três amostras com teores entre  $13,5 \pm 2,1$  e  $39,9 \pm 1,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Mesmo as somas de AP sendo variadas (Figura 5.1), para 78,6% das amostras esses valores foram inferiores a  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ , atual limite permitido pela Comissão Europeia para AP em pólen (EUROPEAN COMMISSION, 2020).

**Figura 5.1** - Perfil da soma dos alcaloides pirrolizidínicos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para os méis de melato de bracatinga provenientes de três produções bianuais.



Fonte: Próprio autor (2022).

A *Mimosa scabrella* é uma espécie pertencente à família Fabaceae, uma das três principais famílias produtoras de AP. No entanto, até o presente momento, não existem relatos de determinação da AP em *Mimosa scabrella*, incluindo pólen, exsudato (melato) ou partes da planta (caule, folhas). A maioria dos estudos de investigação de AP em Fabaceae são em espécies de *Crotalaria*, que reportam a monocrotalina como AP característico e majoritário desta espécie (PRADA; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2020; SUN et al., 2013). Senecionina, intermedina e licopsamina são AP frequentemente encontrados em espécies de Asteraceae e Boraginaceae (AVULA et al., 2015). Os AP do tipo senecionina (senecionina, retrorsina, senecifilina, jacobina, senkirkina e seus n-óxidos) são tipicamente encontrados em Asteraceae, especialmente na *Senecio* sp. (AVULA et al., 2015; BANDINI; SIANI; SPISSO, 2020; VALESE et al., 2021), enquanto os do tipo licopsamina (indicina, intermedina, equimidina, licopsamina e seus n-óxidos) geralmente ocorrem em Boraginaceae (*Anchusa*, *Borago*, *Symphytum* e *Heliotropium*) e Asteraceae (*Eupatorium* e *Senecio*) (EFSA, 2007, 2011), mas também foram relatadas em Fabaceae (sementes de *Crotalaria juncea*) (AVULA et al., 2015).

De acordo com o estudo realizado por Bandini, Siani e Spisso (2020), as Asteraceae, Boraginaceae e Fabaceae são famílias com grande ocorrência nos três estados da região Sul do Brasil. Nesse sentido, mesmo considerando a cuidadosa alocação de colmeias nas plantações de bracinga e a escassez de floração durante o período de produção do mel de melato desta espécie, as abelhas podem forragear outras espécies em longas distâncias (BRUGNEROTTO et al., 2021b), carregando AP típicos de diferentes famílias botânicas para este mel e/ou aumentando a concentração de AP já presentes neste mel proveniente do exsudato da bracinga (Fabaceae).

O conhecimento sobre AP em méis de melato ainda é escasso, provavelmente devido às suas origens serem de espécies (*Abies alba*, *Quercus robur*, *Quercus pyrenaica*, *Ilex* sp., *Pinus* sp., *Hevea brasiliensis*, *Laeis oleífera*, *Salix* sp.) que não produzem esses compostos, presumindo concentrações desprezíveis ou ausência nos méis de melato. Outro motivo para esta hipótese está baseado no fato de que o pólen, considerado o principal veículo de AP para o mel, está ausente ou em quantidades muito baixas em méis de melato. No entanto, a presença de pólen e, eventualmente de AP pode ocorrer naturalmente nesse tipo de mel, uma vez que as abelhas coletam pólen de espécies produtoras de AP durante a busca pelo exsudato. Até o momento, apenas dois estudos investigaram AP em méis de melato, mas com carência de

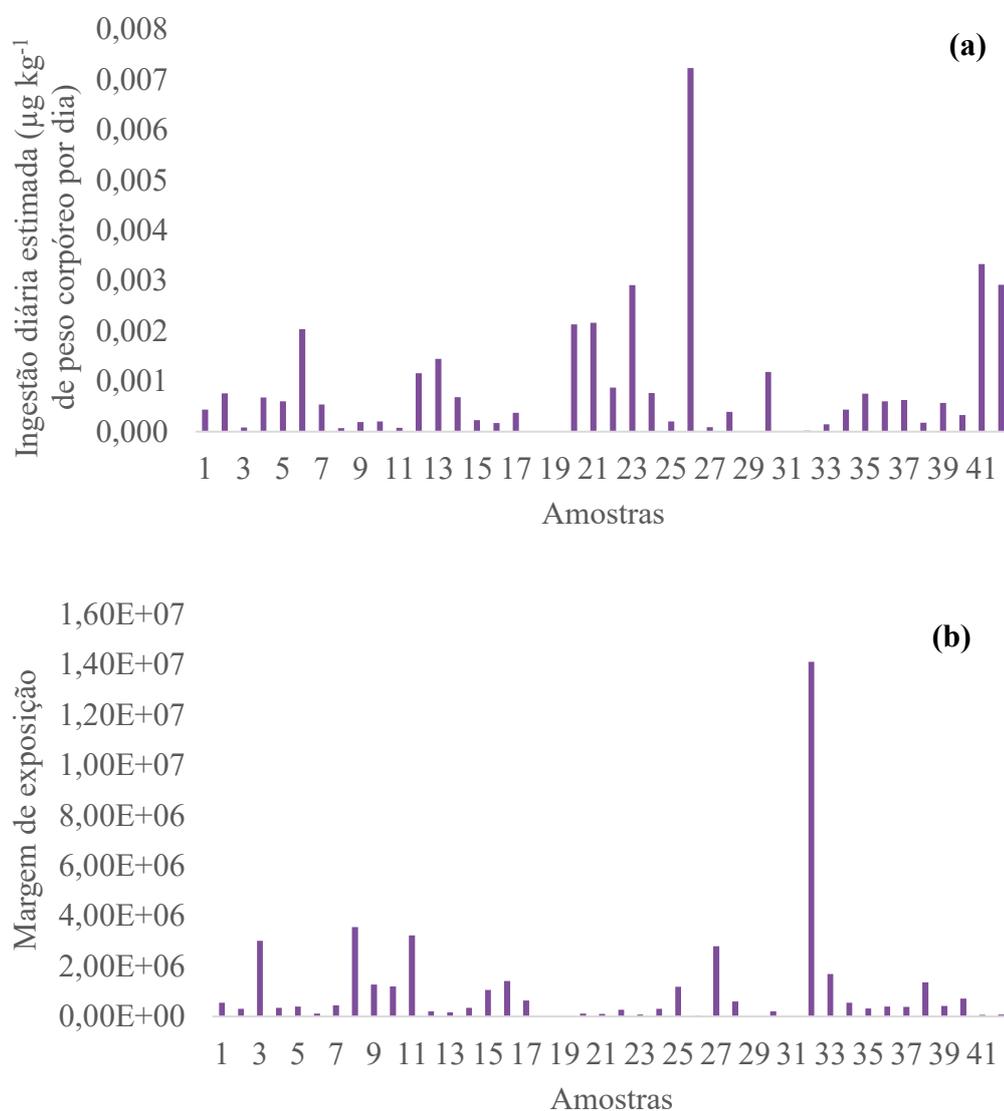
informações quanto a origem o exsudato. Das dez amostras de mel de melato ( $n = 3$  abeto - nome popular -,  $n = 3$  Latifoliae e  $n = 4$  méis de melato de origem mista - não identificados -) avaliados por Kast et al. (2014), cinco foram positivas para a presença de AP ( $> \text{LOQ}$ ), porém apenas a concentração média foi relatada ( $5,4 \mu\text{g de kg}^{-1}$ ). No mesmo estudo, foi descrito que, para o mel de melato de abeto (Pinaceae) da Cordilheira do Jura e dos Alpes Centrais, os AP encontrados podem ser provenientes de *Echium* sp. (Boraginaceae) e *Senecio* sp. (Asteraceae), respectivamente, uma vez que essas espécies foram detectadas na análise melissopalínológica. Nas amostras de mel polifloral misturadas com melato (Planalto suíço) e floral da Montanha alpina misturadas com melato (Alpes centrais) também foram encontrados AP (soma  $< 18 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) que pareciam ser próprios de pólen de *Echium* sp. e *Senecio* sp. (KAST et al., 2014). Méis de melato (origem desconhecida do exsudato) também foram avaliados quanto à presença de AP por Kowalczyk e Kwiatek (2018), no entanto, nenhuma informação específica para estas amostras foi relatada. As concentrações de AP relatadas por Kast et al. (2014) em méis de melato são menores quando comparadas às encontradas nas amostras deste estudo. Assim, esse fato parece indicar que existem fatores associados ao mel de melato de bracatinga, produzido no Sul do Brasil, que precisam ser profundamente investigados, tais como a produção de AP pela árvore bracatinga, com conseqüente transferência para a melato coletado pelas abelhas e, portanto, para o produto final; e/ou a coleta de néctar e/ou pólen de plantas produtoras de AP, inserindo esses compostos no mel de melato de bracatinga. Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa com méis florais brasileiros (VALESE et al., 2016) avaliou os mesmos AP estudados no presente trabalho e encontrou valores mais baixos para senecionina ( $< 248 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), intermedina+lycopsamina ( $< 21,8 \mu\text{g de kg}^{-1}$ ) e retrorsina N-óxido ( $< 55,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) em comparação com a maioria das amostras analisadas neste estudo. Essa diferença entre o mel de melato de bracatinga e mel floral podem estar relacionada aos fatores mencionados anteriormente, especialmente porque o mel de melato de bracatinga provém majoritariamente de uma única espécie e que esta tem probabilidade de conter AP, visto os resultados apresentados neste estudo.

A exposição de seres humanos ao consumo diário de alimentos à base de plantas ou seus subprodutos contendo AP é geralmente maior que os produtos da colmeia (BRUGNEROTTO et al., 2021a; CHUNG; LAM, 2017). No entanto, os produtos da colmeia, tal como o mel, não podem ser negligenciados porque seu consumo pode contribuir para a

ingestão diária de APs. Para os méis, ainda não há legislação para a ingestão diária máxima de APs. No entanto, existe uma recomendação de ingestão diária da soma de AP (1,42  $\mu\text{g}$  de APs/dia para uma pessoa com peso de 60 kg) para alimentos (EFSA et al., 2017). Considerando esta recomendação e a soma dos AP neste estudo (Apêndice G), a ingestão diária de mel de melato de bracinga pode variar geralmente entre de 1,5 a 24,6 g de mel/dia. Em alguns casos, o consumo pode ser inferior a 0,5 g de mel/dia ou superior a 50,0 g de mel/dia. De acordo com a FAO/WHO (FAO/WHO, 2019) a ingestão diária estimada de mel no Brasil (grupo 5, G05) é de 0,18 g, portanto, os resultados deste estudo indicam que todas as amostras, mesmo com elevadas concentrações de AP ainda poderiam ser consumidas diariamente sem potencial risco agudo de intoxicação por AP. Além disso, se considerar o consumo de 2,22 g de mel por alemães (G08) e de 1,33 g por estadunidenses (G10), principais consumidores deste mel, 73,8 % das amostras poderiam ser consumidas por ambos os países.

Os resultados dos AP em mel de melato de bracinga também foram utilizados para avaliar um cenário de exposição aguda e crônica (Figura 5.2a). A ingestão diária estimada de AP para alimentos pela EFSA (EFSA et al., 2017), a qual é  $0,0237 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia, se aproxima de um cenário de exposição aguda a estes compostos. Neste estudo, todas as amostras apresentaram valores inferiores ao recomendando pela EFSA, portanto, indicando que o consumo destes méis representaria baixo risco ou ausência de efeitos agudos por AP após a ingestão.

**Figura 5.2** – Ingestão diária estimada (a) e margem de exposição (b) obtidas para as amostras de mel de melato de bracatinga.



Fonte: Próprio autor (2022).

Neste estudo também foi avaliada uma exposição ao longo da vida, ou seja, o potencial efeito carcinogênico crônico dos AP nos seres humanos pelo consumo deste mel. Para isso, foi aplicado a abordagem da margem de exposição (MOE), usando o ponto de referência crônico de  $237 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia (EFSA et al., 2017). Valores de MOE abaixo de 10.000 indicam que pode haver uma preocupação potencial para a saúde humana (EFSA et al., 2017), no entanto, com base nos resultados (Figura 5.2b), todos os méis de melato de bracatinga não

representam risco carcinogênico na dieta ( $MOE \geq 10.000$ ). É importante destacar que esses resultados estão baseados apenas no consumo de mel de melato de bracatinga e, portanto, a ingestão simultânea de outros produtos com elevados teores de AP (WANG et al., 2021), pode potencializar os riscos à saúde do consumidor.

A comissão europeia recomenda aplicação de boas práticas agrícolas para minimizar a presença de AP nos alimentos, de acordo com limites estabelecidos na legislação quando aplicáveis e, conseqüentemente, a ingestão desses compostos por seres humanos e animais (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Em casos que o produto seja proveniente majoritariamente de uma única fonte botânica e esta tenha potencial de produzir AP, como mel de melato de bracatinga, é importante buscar estratégias de manejo das colmeias, realizar o monitoramento dos compostos nas matrizes, bem como, buscar realizar análises complementares (melissopalínologia) para eliminar a hipótese de uma possível contaminação indesejada. Outro aspecto também estaria relacionado a possível transferência dos AP de cera de abelhas branca ou pré-beneficiada<sup>11</sup> em colmeias. Diversos estudos já investigaram a transferência de AP para produtos finais. Entre os estudos, estão os de alimentação de vacas leiteiras com 200 g/dia de material vegetal seco (mistura de *Jacobaea vulgaris* e *Senecio inaequidens*, *Senecio vulgaris* ou *Echium vulgare*) por um período de 4 dias e transferência destes compostos para leites (MULDER et al., 2020). Galinhas que durante 14 dias receberam uma dieta com 0,5% de plantas (*Jacobaea vulgaris*, *Senecio vulgaris*, *Senecio inaequiden* ou *Echium vulgare*) ou 0,1% de *Heliotropium europaeum* foram utilizadas para verificar se os AP poderiam ser transferidos para os ovos gerados (MULDER et al., 2016). Em ambos os casos foi constatado que os AP foram transferidos para o produto final. A transferência desta classe de alcaloides entre plantas (*Senecio jacobaea* para *Petroselinum crispum*) cultivadas em um mesmo recipiente por um período de 10 semanas também já foi reportado (SELMAR et al., 2019). Nesse sentido, é essencial considerar possíveis transferências dos AP de cera de abelhas, especialmente aquelas utilizadas para produção de mel floral e que posterior processo de tratamento são reinceridas em colmeias para produção de mel de melato.

---

<sup>11</sup> Cera de abelhas branca ou pré-beneficiada quando tiver sido descolorida pela ação da luz, do ar ou por processos químicos, isenta de restos de mel, apresentando-se de cor branca ou creme, frágil, pouco untuosa e de odor acentuado (Instrução Normativa N 03, de 19 de janeiro de 2001).

#### 5.4 Conclusões

Este estudo trouxe dados importantes sobre AP em mel de melato de bracatinga e confirmou a hipótese de que esta matriz contém tais compostos, com somas variadas entre  $5,6 \pm 0,9$  e  $2409,8 \pm 175,6 \mu\text{g de kg}^{-1}$ . Apesar de serem resultados em sua maioria impactantes, os dados demonstraram baixo potencial a preocupação com a saúde pública. Por outro lado, mesmo em situações de exposição reduzida, devido às propriedades genotóxicas e carcinogênicas dos AP, sua presença neste tipo de mel requer atenção. Adicionalmente, esses são dados iniciais que precisam ser cuidadosamente e profundamente investigados para evitar conclusões apressadas e distorcidas sobre um mel com uma rica composição bioativa e excelente potencial biológico. Nesse sentido, é essencial que estudos futuros sejam conduzidos para avaliar a presença de AP em partes da planta e no exsudato da bracatinga, além de realizar análise melissopalínológica e estudos de toxicidade. Além disso, é importante considerar futuras análises de AP em um número maior de amostras e daquelas provenientes de regiões que abrangem a indicação geográfica. Essas investigações e o monitoramento constante destes e outros AP nos méis de melato de bracatinga são essenciais para que ações futuras possam ser rastreadas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho investigou a influência das floradas na presença e concentração dos AP em méis florais a partir de análises destas substâncias nos méis e em plantas com potencial apícola, ambos provenientes de um sistema de monitoramento digital de colmeias no Estado de Santa Catarina. Além disso, também apresentou dados inéditos sobre AP em méis de melato de bracatinga de três diferentes safras.

O adequado manejo e satisfatória condição higiênico-sanitária e foram comprovadas para a maioria dos méis florais avaliados e, mesmo com algumas variabilidades, alguns minerais (K, Ca, Mg e Na) indicaram potencial contribuição para a discriminação dos méis.

A possibilidade de exploração da atividade apícola, especialmente para produção de méis de diferentes origens botânicas no Estado de Santa Catarina, é reflexo da diferença climática e de relevos no estado, que acarreta em uma ampla diversidade e disponibilidade de espécies com potencial apícola, a qual foi observada neste trabalho pela identificação de 33 famílias (81 espécies), principalmente Asteraceae e Fabaceae, em seis regiões catarinenses. Adicionalmente, a distância percorrida pelas abelhas, mesmo estimada teoricamente neste estudo, demonstrou que a busca por alimentos pode variar de metros a quilômetros e que suas preferências geralmente são muito variadas, uma vez que, a melissopalínologia – nos méis florais de Caçador e São Joaquim – identificou a presença de diversas espécies, mas com maior número para aquelas das famílias Asteraceae e Fabaceae. Existe uma grande distribuição destas duas famílias de plantas no Estado de Santa Catarina, o que provavelmente resultou nos seus reconhecimentos em maior número, tanto na identificação das plantas coletadas nas áreas de estudo, bem como na análise de pólen no mel. Sendo assim, para se obter um adequado calendário de floração, é recomendando que o levantamento e monitoramento das pastagens apícolas sejam regionais, justamente por conta das variabilidades climáticas e de relevo de cada região.

A relação entre os resultados de melissopalínologia e alcaloides pirrolizidínicos em méis e plantas Asteraceae e Fabaceae das regiões de Caçador e São Joaquim não apresentou um alinhamento que pudesse trazer resultados conclusivos. No entanto, foi possível evidenciar que todas as espécies analisadas para AP – muitas delas estudadas pela primeira vez – podem contribuir para os teores de AP detectados nos méis de suas regiões correspondentes. Entre as espécies que devem ser evitadas próximas dos apiários, a *Senecio brasiliensis* pareceu ser a

mais preocupante. Mesmo com baixas contribuições de pólen em alguns méis, esta planta geralmente apresenta soma de AP – especialmente senecionina, senecionina N-óxido e retrorsina N-óxido – aproximadamente 600 vezes superior as espécies de *Trofilium*, por exemplo. Espécies dos gêneros *Baccharis* e *Trifolium*, parecem não contribuir consideravelmente na influência de AP nos méis, principalmente quando comparadas à *S. brasiliensis*. Este estudo avançou no conhecimento sobre os AP, não somente em méis, mas em relação a diversos gêneros de Asteraceae e Fabaceae com potencial apícola no Estado de Santa Catarina. No entanto, outros estudos são indispensáveis a fim de dar continuidade no monitoramento dessa classe de compostos pela inclusão de outros AP no método cromatográfico e pelo aumento do raio de alcance das coletas. Entre os principais parâmetros estão: incluir outros AP no método, especialmente os N-óxidos quando analisar plantas visto que este quimiotipo geralmente está mais abundante nos vegetais; considerar um maior número de amostras de plantas da mesma espécie e de diferentes regiões a fim de verificar potencial influência geográfica com base nos teores de AP e condições ambientais (solo e clima) das espécies.

Os AP, principalmente intermedina+licopsamina e senecionina, foram quantificados em todos os méis de melato de bracinga (MMB) deste trabalho. Independente do ano de produção e da origem geográfica dos MMB, as concentrações de AP foram variadas, mas com somas inferiores a  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  em 78,6 % das amostras. Com base nesses resultados, na avaliação de risco (margem de exposição) e no consumo diário de mel no Brasil, essas amostras não representariam um risco agudo de intoxicação quando consumidas. No entanto, considerando o consumo concomitante com outros alimentos que podem conter elevados níveis de AP, o risco poderia ser aumentado. Por se tratarem de dados inéditos e ainda com recursos científicos limitados para justificativas conclusivas dos achados, futuras investigações são indispensáveis.

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitam fornecer suporte técnico ao setor apícola e entidades de controle e fiscalização, permitindo uma elaboração e estruturação de possíveis estratégias na apicultura a fim de evitar que os produtos apícolas, incluindo os méis, contenham elevados níveis de AP.

Continuar avançando no conhecimento científico sobre a temática é uma oportunidade imprescindível. Dessa forma, é importante que estudos futuros considerem incluir outros AP

no método analítico, não somente com o objetivo de quantificá-los, mas para buscar identificar uma relação entre o AP e as potências-famílias que o produzem, bem como, investigar os potenciais efeitos tóxicos a partir de estudos *in vitro* e/ou *in vivo* com as amostras de méis que apresentarem concentrações elevadas de AP. Para méis florais, ainda é interessante aplicar a análise melissopalínológica juntamente com o calendário apícola como forma de identificar corretamente nos rótulos as espécies que contribuíram para a produção do mel e para buscar uma alocação estratégica de colmeias, afastadas especialmente da *Senecio brasiliensis*. No caso de méis de melato de bracatinga, a melissopalínologia ainda pode trazer informações importantes a respeito da “pureza” da amostra, mas o exsudato (melato) e partes da planta *Mimosa scabrella* ainda precisam ser avaliadas em relação aos AP para auxiliar na compreensão da origem dos AP e suas concentrações.

## Referências

ABEMEL. **Dados Estatísticos do Mercado de Mel 2016 a 2021.**

AECOSAN, A. E. DE S. A. Y N. Alcaloides de pirrolizidina. **Ministerio de Consumo**, p. 1–5, 2020.

AHMAD, L. et al. Survey of pyrrolizidine alkaloids in the tribe Lithospermeae (Boraginaceae) from Pan-Himalaya and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 81, p. 49–57, dez. 2018.

AKHKUBEKOVA, A. A.; TAMAKHINA, A. Y. Accumulation of alkaloids in plants of the family Boraginaceae depending on environmental conditions places of growth. **E3S Web of Conferences**, v. 254, p. 1–8, 5 maio 2021.

AL-WAILI, N. et al. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. Table 1, p. 1–9, 2012.

ALLEMANG, A. et al. Relative potency of fifteen pyrrolizidine alkaloids to induce DNA damage as measured by micronucleus induction in HepaRG human liver cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, n. May, p. 72–81, 2018.

ALMEIDA, D. DE et al. **Plantas visitadas por abelhas e polinização.** Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação, 2003.

ALMEIDA, M. O. et al. Optimization of Method for Pesticide Detection in Honey by Using Liquid and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometric Detection. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1368, 26 set. 2020.

ANASTÁCIO, M. D. et al. Nivel de infestação de Varroa destructor em Apis mellifera africanizadas nas diferentes estações do ano. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 2, n. 2, p. 61–68, 2013.

ANVISA. **Agrotóxicos em Alimentos**, 2020. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/duvidas-sobre-agrotoxicos-em-alimentos>>

ANVISA. **Monografias Autorizadas**, 2022. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>

AOAC. Official method of Analysis of AOAC internacional. **Association og Official Analytical Chemists Internacional.**, 2005.

AVULA, B. et al. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 178, p. 136–148, 2015.

AZEVEDO, M. S. et al. Physicochemical properties and biological activities of bracinga honeydew honey from different geographical locations. **Journal of Food Science and Technology**, 6 jan. 2021.

- BACKES, A.; NARDINO, M. **Árvores, arbustos e algumas lianas nativas no RS**. [s.l.: s.n.].
- BAJUK, B. P. et al. Coumaphos residues in honey, bee brood, and beeswax after Varroa treatment. **Apidologie**, v. 48, n. 5, p. 588–598, 22 set. 2017.
- BANDEIRA, M. DA S. F.; DE NOVAIS, J. S. Melissopalynological characterization of honeys from the Discovery Coast, Brazil. **Palynology**, v. 44, n. 3, p. 539–550, 2 jul. 2020.
- BANDINI, T. B.; SIANI, A. C.; SPISSO, B. F. A botanical census on pyrrolizidine alkaloid-producing species in Brazilian herbaria: data set for a potential health risk indication. **Rodriguésia**, v. 71, p. 1–19, 2020.
- BANDINI, T. B.; SPISSO, B. F. Risco sanitário do mel no Brasil em relação a novas ameaças: resíduos e contaminantes químicos emergentes. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 1, p. 116–126, 2017.
- BANDINI, T. B.; SPISSO, B. F. Development and validation of an LC-HRMS method for the determination of pyrrolizidine alkaloids and quinolones in honey employing a simple alkaline sample dilution. **Journal of Food Measurement and Characterization**, p. 1–13, 8 jul. 2021.
- BANDINI, T. B.; SPISSO, B. F. Detection, dietary exposure assessment and risk evaluation of quinolones and pyrrolizidine alkaloids in commercial honey from Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2022.
- BARCELOS, S. T. A. et al. Sinusoidal obstruction syndrome secondary the intake of *Senecio brasiliensis*: A case report. **Annals of Hepatology**, v. 20, p. 100138, 2021.
- BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 4. Espectro polínico de algumas amostras de mel do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 30, p. 575–582, 1970.
- BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989.
- BARTH, O. M.; MELHEM, T. S. **Glossário Ilustrado de Palinologia**. Campinas: [s.n.].
- BERGAMO, G. et al. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. **Food Research International**, p. #pagerange#, 2018a.
- BERGAMO, G. et al. Mineral profile as a potential parameter for verifying the authenticity of bracatinga honeydew honeys. **LWT**, v. 97, p. 390–395, nov. 2018b.
- BERGAMO, G. **Marcadores de autenticidade para diferenciação entre méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) e florais produzidos no estado de Santa Catarina**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
- BERGAMO, G. et al. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. **Food Research International**, v. 116, p. 745–754, fev. 2019.
- BFR. Chemical analysis and toxicity of pyrrolizidine alkaloids and assessment of the health

risks posed by their occurrence in honey. n. 038, p. 1, 2011.

BFR. Pyrrolizidine alkaloids in herbal teas and teas. n. 018, p. 1–29, 2013.

BFR. **Updated risk evaluation of levels of 1, 2-unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PA) in foods. BfR Opinion No 020/2018 of 14 June 2018.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://www.bfr.bund.de/en/a-z\\_index/pyrrolizidine\\_alkaloids-192891.html](https://www.bfr.bund.de/en/a-z_index/pyrrolizidine_alkaloids-192891.html)>.

BILLER, A. et al. Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemical and chemoeological aspects. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 615–619, 1994.

BODI, D. et al. Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 11, p. 1886–1895, 2 nov. 2014.

BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v. 37, n. 1, p. 1–18, 13 jan. 2006.

BOPPRÉ, M. et al. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5662–5672, 2008.

BOPPRÉ, M.; COLEGATE, S. M.; EDGAR, J. A. Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 594–600, 2005.

BOSI, C. F. et al. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *ageratum conyzoides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 425–432, 2013.

BRASIL. **lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**, 1989.

BRASIL. **Instrução Normativa SDA n42, de 20 de dezembro de 1999**MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1999.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Aprova Regulamento técnico de Identidade e Qualidade do Mel**, 2000. (Nota técnica).

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**, 2002.

BRASIL. **Instrução Normativa SDA n13, de 15 de julho de 2015**MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015.

BRASIL. **Resolução n2.080, de 31 de julho de 2019**, 2019a.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abrastecimento. Instrução Normativa nº 5, de 23 de abril de 2019.** [s.l: s.n.].

BRASIL, M. DA A. P. E A. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo V - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pólen apícola**, 2001a.

BRASIL, M. DA A. P. E A. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo III - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de geleia real**, 2001b.

BRASIL, M. DA A. P. E A. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis**, 2001c.

BRUGNEROTTO, P. et al. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 82, p. 1–8, 2019a.

BRUGNEROTTO, P. et al. Características físico-químicas e composição química de mel de melato de bracatinga: Uma revisão. In: **A Arte de criar Abelhas**. [s.l.] Atena Editora, 2019b. p. 25–35.

BRUGNEROTTO, P. et al. Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128384, abr. 2021a.

BRUGNEROTTO, P. et al. Identificação de plantas com potencial apícola provenientes de sistemas de monitoramento de colmeias no estado de Santa Catarina, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e2710716254, 23 jun. 2021b.

BRUGNEROTTO, P. et al. Physicochemical characterization of honeys from Brazilian monitored beehives. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 11, p. 2709–2719, 31 jul. 2021c.

CAMARGO, R. C. R. DE. **Sistemas de Produção - Produção de mel**. Teresina, Piauí: [s.n.].

CARPINELLI DE JESUS, M. et al. Pyrrolizidine Alkaloids of Blue Heliotrope ( *Heliotropium amplexicaule* ) and Their Presence in Australian Honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 28, p. 7995–8006, 17 jul. 2019.

CARVALHO, C. A. L. DE; MARCHINI, L. C. Plantas visitadas por *Apis mellifera* L. no vale do rio Paraguaçu, Município de Castro Alves, Bahia. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 333–338, 1999.

CASADO, N.; MORANTE-ZARCERO, S.; SIERRA, I. The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, p. 123–139, fev. 2022.

CELANO, R. et al. Determination of Selected Pyrrolizidine Alkaloids in Honey by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 31, p. 8689–8699, 2019.

CEOLIN, G. B.; MIOTTO, S. T. S. The genus *Collaea* DC. (Leguminosae, Papilionoideae) in South Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 991–998, 2009.

CHEN, L. et al. Prediction of in vivo genotoxicity of lasiocarpine and riddelliine in rat liver using a combined in vitro-physiologically based kinetic modelling-facilitated reverse dosimetry approach. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 8, p. 2385–2395, 2019.

CHEN, Z.; HUO, J. R. Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 6, p. 252–260,

2010.

CHMIT, M. S.; WAHRIG, B.; BEUERLE, T. Quantitative and qualitative analysis of pyrrolizidine alkaloids in liqueurs, elixirs and herbal juices. **Fitoterapia**, v. 136, n. May, p. 104172, 2019.

CHUNG, S. W. C.; LAM, A. C. H. Investigation of pyrrolizidine alkaloids including their respective N-oxides in selected food products available in Hong Kong by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 34, n. 7, p. 1184–1192, 2017.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Maximum Residue Limits for Pesticides**, 2020.

CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS. Discussion paper on management practices to reduce exposure of food-producing animals (livestock and bees) to pyrrolizidine alkaloids; and to reduce presence of pyrrolizidine alkaloids in commodities (raw and processed). **Codex Alimentarius Comission**, 2013.

CODLING, G. et al. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey , pollen and honey bees ( *Apis mellifera* L . ) in central. **Chemosphere**, v. 144, p. 2321–2328, 2016.

COLEGATE, S. M. et al. Solid-phase extraction and HPLC-MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides: A case study of *Echium plantagineum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 2, p. 108–119, 2005.

COLEGATE, S. M. et al. Potentially toxic pyrrolizidine alkaloids in *Eupatorium perfoliatum* and three related species. Implications for herbal use as boneset. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 613–626, 2018.

COMMITTEE ON TOXICITY. **Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment. COT Statement on Pyrrolizidine Alkaloids in Food**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <cot.food.gov.uk/pdfs/cotstatementpa200806.pdf>.

COOK, S. M. et al. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? **Ecological Entomology**, v. 28, n. 5, p. 622–627, 2003.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial plantas para o futuro - Região Sul**. [s.l: s.n.].

CORRÊA, A. M. R. et al. *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) poisoning in Murrah buffaloes in Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 187–189, 2008.

DA LUZ, C. F. P.; BARTH, O. M. Pollen analysis of honey and beebread derived from Brazilian mangroves. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, n. 1, p. 79–85, 2012.

DA SILVA, I. P. et al. Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. **Apidologie**, v. 46, n. 6, p. 703–715, 2015.

DA SILVA, P. M. **Caracterização e estabilidade de compostos químicos em méis de abelhas**

**Apis mellifera L. produzidos no estado de Santa Catarina.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

DA SILVA, P. M. et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, n. April, p. 309–323, abr. 2016.

DA SILVA, P. M. et al. Stability of volatile compounds of honey during prolonged storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 3, p. 1167–1182, 12 mar. 2020.

DE-MELO, A. A. M. et al. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 1, p. 5–37, 2017.

DE PINHO, G. P. et al. **Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography** Food Control, 2010.

DE SOUZA, A. P. F. et al. Occurrence of pesticide residues in Brazilian *Apis mellifera* beeswax by gas chromatography-tandem mass spectrometry and pesticide hazard evaluation. **Journal of Apicultural Research**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2022.

DE SOUZA, A. P. F. DE et al. Analysis of insecticide residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS optimized by the Plackett Burman design. **CYTA - Journal of Food**, v. 19, n. 1, p. 326–332, 2021.

DE SOUZA, R. R.; DE ABREU, V. H. R.; DE NOVAIS, J. S. Melissopalynology in Brazil: a map of pollen types and published productions between 2005 and 2017. **Palynology**, v. 43, n. 4, p. 690–700, 2019.

DEWICK, P. M. Alkaloids - Chapter 6. In: **Medicinal Natural Products**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. p. 291–403.

DHAWAN, A. S.; PAWAR, K. W.; LOKHANDE, A. A. Analysis of pollen grains in different honey samples from the region of Newasa tehsil in Maharashtra. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 3438–3442, 2018.

DOS SANTOS, R. et al. **Biodiversidade em Santa Catarina: Parque estadual da Serra Furada**. Criciúma: Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC, 2016. v. 3

DRAIAIA, R. et al. Pyrrolizidine Alkaloids in Some Algerian's Honeys Radia. **World Journal of Environmental Biosciences**, v. 8, n. 2, p. 29–40, 2019.

DÜBECKE, A.; BECKH, G.; LÜLLMANN, C. Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 3, p. 348–358, 2011.

DUSEMUND, B. et al. Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 63–72, 2018.

EBMEYER, J. et al. Pyrrolizidine alkaloid-induced alterations of prostanoid synthesis in human endothelial cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 298, n. November 2018, p. 104–111, 2019a.

EBMEYER, J. et al. Human CYP3A4-mediated toxification of the pyrrolizidine alkaloid lasiocarpine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 130, n. January, p. 79–88, 2019b.

EDGAR, J. A. et al. Pyrrolizidine alkaloids in food: A spectrum of potential health consequences. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 28, n. 3, p. 308–324, 2011.

EDGAR, J. A.; ROEDER, E.; MOLYNEUX, R. J. Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: A potential threat to health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2719–2730, 2002.

EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed. **The EFSA Journal**, v. 447, p. 1–51, 2007.

EFSA. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. **EFSA Journal** 2011, v. 9, n. 11, p. 2406; 1–134, 2011.

EFSA. Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. **EFSA Journal**, v. 14, n. 8, ago. 2016.

EFSA et al. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, 2017.

EFSA. Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. **European Food Safety Authority**, v. 17, n. 3, p. 1–74, 2019.

EL-SHAZLY, A.; WINK, M. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the Boraginaceae structures, distribution, and biological properties. **Diversity**, v. 6, n. 2, p. 188–282, 2014.

EPAGRI. **Tecnologia para o desenvolvimento da Apicultura Catarinense**. Disponível em: <[https://ciram.epagri.sc.gov.br/ciram\\_arquivos/apicultura/acervo/folder\\_apis\\_on\\_line.pdf](https://ciram.epagri.sc.gov.br/ciram_arquivos/apicultura/acervo/folder_apis_on_line.pdf)>.

EUROPEAN COMMISSION. **European Commission Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey**, 2002. (Nota técnica).

EUROPEAN COMMISSION. **https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\_residue\_levels\_en**, 2019.

EUROPEAN COMMISSION. **COMMISSION REGULATION (EU) 2020/2040 of 11 December 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of pyrrolizidine alkaloids in certain foodstuffs** European Commission, 2020. Disponível em: <[https://members.wto.org/cnattachments/2020/SPS/EEC/20\\_4706\\_01\\_e.pdf](https://members.wto.org/cnattachments/2020/SPS/EEC/20_4706_01_e.pdf)>

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides Database**. Disponível em: <[https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en)>.

EUROPEAN COMMISSION. European Commission. Council Directive 2001/110/EC. Relating to honey. **Journal of European Communities**, 47–52. **Official Journal of European**

**Communities**, 2002.

FANG, C.; FERNIE, A. R.; LUO, J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 83–98, jan. 2019.

FAO/WHO. **International Estimated Daily Intake (IEDI). 17 cluster diet, version 04, 21 March 2019**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/nutrition-and-food-safety/databases/global-environment-monitoring-system-food-contamination>>.

FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Summary report of the eightieth meeting of JECFA**, 2015.

FECHNER, D. C. et al. Multivariate classification of honeys from Corrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties. **Food Bioscience**, v. 15, p. 49–54, set. 2016.

FLADE, J. et al. Occurrence of nine pyrrolizidine alkaloids in *senecio vulgaris* L. Depending on developmental stage and season. **Plants**, v. 8, n. 3, p. 1–13, 2019.

FLORES, A. S.; TOZZI, A. M. G. DE A.; TRIGO, J. R. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 459–469, 2009a.

FLORES, A. S.; TOZZI, A. M. G. DE A.; TRIGO, J. R. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 459–469, out. 2009b.

FORCONE, A. Pollen analysis of honey from Chubut (Argentinean Patagonia). **Grana**, v. 47, n. 2, p. 147–158, 2008.

FRÖLICH, C.; HARTMANN, T.; OBER, D. Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 14, p. 1493–1502, 2006.

FRÖLICH, C.; OBER, D.; HARTMANN, T. Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 1026–1037, abr. 2007.

FULTON, C. A. et al. An Examination of Exposure Routes of Fluralinate to Larval and Adult Honey Bees (*Apis mellifera*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 1356–1363, 2019.

GASPER, A. L. DE et al. Inventário florístico florestal de Santa Catarina : espécies da Floresta Ombrófila Mista. **Rodriguésia**, v. 64, n. 2, p. 201–210, 2013.

GEBUREK, I. et al. In vitro metabolism of pyrrolizidine alkaloids – Metabolic degradation and GSH conjugate formation of different structure types. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, n. September 2019, p. 110868, 2020.

GÓMEZ, I. B. et al. Ion chromatography coupled to Q-Orbitrap for the analysis of formic and

oxalic acid in beehive matrices: a field study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 7, p. 2419–2430, 2022.

GOTTSCHALK, C. et al. Uncertainties in the determination of pyrrolizidine alkaloid levels in naturally contaminated honeys and comparison of results obtained by different analytical approaches. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 35, n. 7, p. 1366–1383, 2018.

GOTTSCHALK, C. et al. Spread of *Jacobaea vulgaris* and occurrence of pyrrolizidine alkaloids in regionally produced honeys from northern Germany: Inter- And intra-site variations and risk assessment for special consumer groups. **Toxins**, v. 12, n. 7, p. 1–19, 2020.

GRACIA, M. J. et al. Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–14, 2017.

GRIFFIN, C. T. et al. Investigation of targeted pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese medicines and selected herbal teas sourced in Ireland using LC-ESI-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 31, n. 5, p. 940–961, 2014.

GRIFFIN, C. T. et al. Development of a fast isocratic LC-MS/MS method for the high-throughput analysis of pyrrolizidine alkaloids in Australian honey. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 32, n. 2, p. 214–228, 2015a.

GRIFFIN, C. T. et al. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Detection of Targeted Pyrrolizidine Alkaloids in Honeys Purchased within Ireland. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 18–31, 2015b.

H Aidamus, S. L. et al. Floral Diversity in Different Types of Honey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. 1–12, 2019.

HARDY, A. et al. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. **EFSA Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–41, 2017.

HARTMANN, T. et al. Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L. **Planta**, v. 177, n. 1, p. 98–107, 1989.

HARTMANN, T. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. **Planta**, v. 207, n. 4, p. 483–495, 1999.

HARTMANN, T.; OBER, D. Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores. **Topics in Current Chemistry**, v. 209, p. 208–239, 2000.

HE, X. et al. Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts are common toxicological biomarkers of pyrrolizidine alkaloid N-oxides. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 4, p. 984–991, 2017.

HE, Y. et al. Comprehensive investigation and risk study on pyrrolizidine alkaloid contamination in Chinese retail honey. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115542, 2020.

- HE, Y. et al. Metabolism-mediated cytotoxicity and genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 6, p. 1917–1942, 2021.
- HOOGENBOOM, L. A. P. et al. Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 3, p. 359–372, mar. 2011.
- HOOVER, S. E.; OVINGE, L. P. Pollen collection, honey production, and pollination services: Managing honey bees in an agricultural setting. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 4, p. 1509–1516, 2018.
- HUNGERFORD, N. L. et al. Analysis of pyrrolizidine alkaloids in Queensland honey: Using low temperature chromatography to resolve stereoisomers and identify botanical sources by uhplc-ms/ms. **Toxins**, v. 11, n. 12, 2019.
- IARC. **Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, France: [s.n.]. v. 82
- IBGE. **Tabela 74 - Produção de origem animal por tipo de produto - Ano 2018**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/74#resultado>>.
- INACIO, L. D. J. et al. Pyrrolizidine alkaloids in bee pollen identified by LC-MS/MS analysis and colour parameters using multivariate class modeling. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03593, 2020.
- JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898–1909, 2009.
- KAKAR, F. et al. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Toxicology**, v. 2010, n. February 2008, p. 1–7, 2010.
- KALTNER, F. et al. Influence of Storage on the Stability of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Peppermint Tea, Hay, and Honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 5221–5228, 2018.
- KASPRZAK-DROZD, K. et al. Beneficial effects of phenolic compounds on gut microbiota and metabolic syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, 2021.
- KAST, C. et al. Analysis of Swiss honeys for pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 1, p. 75–83, 2 jan. 2014.
- KAST, C. et al. Chemical fingerprinting identifies *Echium vulgare*, *Eupatorium cannabinum* and *Senecio* spp. as plant species mainly responsible for pyrrolizidine alkaloids in bee-collected pollen. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 2, p. 316–327, 1 fev. 2018.
- KAST, C. et al. Pyrrolizidine alkaloids: The Botanical Origin of Pollen Collected during the Flowering Period of *Echium vulgare* and the Stability of Pyrrolizidine Alkaloids in Bee Bread. **Molecules**, v. 24, n. 12, 2019.
- KEMPF, M. et al. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 10, p. 1193–1200, 2008.

KEMPF, M. et al. Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. **Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, v. 28, n. 3, p. 332–347, 2011.

KEMPF, M.; REINHARD, A.; BEUERLE, T. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of pa levels in food and animal feed required. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 1, p. 158–168, 2010.

KHAN, K. A. et al. Honey bee (*Apis mellifera*) preference towards micronutrients and their impact on bee colonies. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 6, p. 3362–3366, 2021.

KLOSOWSKI, A. L. M.; KUASOSKI, M.; BONETTI, M. B. P. Apicultura brasileira Inovação e propriedade. **Revista de Política Agrícola**, p. 41–58, 2020.

KOPP, T.; ABDEL-TAWAB, M.; MIZAIKOFF, B. Extracting and analyzing pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants: A review. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 7–10, 2020.

KOWALCZYK, E.; KWIATEK, K. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Determination with liquid chromatography-mass spectrometry method. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 173–181, 2018.

KOWALCZYK, E.; SIERADZKI, Z.; KWIATEK, K. Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey with Sensitive Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1345–1355, 2018.

KREBS, H. C.; CARL, T.; HABERMEHL, G. G. Pyrrolizidine alkaloid composition in six Brazilian *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1227–1229, 1996.

LAU, P.; BRYANT, V.; RANGEL, J. Determining the minimum number of pollen grains needed for accurate honey bee (*Apis mellifera*) colony pollen pellet analysis. **Palynology**, v. 42, n. 1, p. 36–42, 2018.

LEEPER, F. J.; VEDERAS, J. C. **Biosynthesis Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids**. [s.l: s.n.]. v. 38

LEITE DAU, S. et al. **Poisoning by *Senecio brasiliensis* in Horses in Northern Rio Grande do Sul** *Acta Scientiae Veterinariae*, 4 maio 2019. Disponível em: <<https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/91989>>

LETSYO, E. et al. Pyrrolizidine alkaloids in floral honeys of tropical Ghana: a health risk assessment. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 10, n. 4, p. 300–310, 2017.

LIN, G.; CUI, Y. Y.; HAWES, E. M. Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of clivorine: Firm evidence for the formation of a pyrrolic metabolite of an otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 26, n. 2, p. 181–184, 1998.

LOUISSE, J. et al. Determination of genotoxic potencies of pyrrolizidine alkaloids in HepaRG cells using the  $\gamma$ H2AX assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, n. May, p. 110532, 2019.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v. 59, n. 4, p. 139–157, jan. 1978.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; WORWOHL, G. Methods of melissopalynology. **Bee World**, v. 51, n. 3, p. 125–138, 1970.

LUCATELLO, L. et al. Evaluation of Some Pyrrolizidine Alkaloids in Honey Samples from the Veneto Region (Italy) by LC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1825–1836, 20 jun. 2016.

LUCATELLO, L. et al. Pyrrolizidine alkaloid concentrations in local Italian and retail honeys of different origin: a scenario of human exposure. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 104182, set. 2021.

LUCCHETTI, M. A. et al. Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium vulgare* in Honey Originate Primarily from Floral Nectar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 25, p. 5267–5273, 29 jun. 2016.

LUCKERT, C. et al. Disturbance of gene expression in primary human hepatocytes by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids: A whole genome transcriptome analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1669–1682, 2015.

MA, C. et al. Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: A critical review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, n. May, p. 50–60, 2018.

MAKHLOUFI, C. et al. Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods. **Apidologie**, v. 41, n. 5, p. 509–521, 12 set. 2010.

MANZANARES, A. B. et al. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 664–672, maio 2011.

MARTINELLO, M. et al. Easy and rapid method for the quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry: An evaluation in commercial honey. **Food Control**, v. 37, p. 146–152, 2014.

MARTINELLO, M. et al. Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey. **Food Chemistry**, v. 234, p. 295–302, 2017.

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D.; TORESAN, L. **Bracatinga, <em>Mimosa scrabella</em> Bentham: cultivo, manejo e usos da espécie**. Florianópolis, Santa Catarina: Epagri, 2014.

MEDICINES AGENCY, E. Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs). **European Medicines Agency**, v. 44, n. November, p. 1–24, 2014.

MENG, F. et al. Agricultural and Forest Meteorology Long-term flowering intensity of

European tree species under the influence of climatic and resource dynamic variables. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 323, n. January, p. 109074, 2022.

MERCOSUL. Regulamento Técnico Mercosul “Identidade e Qualidade do Mel”. 1999.

MERZ, K. H.; SCHRENK, D. Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines. **Toxicology Letters**, v. 263, p. 44–57, 2016.

MICHEL, R.; RAEZKE, K.-P. Pyrrolizidine Alkaloids in Honey. **Intertek Food Service Gmbh**, p. 15–20, 2009.

MOAR, N. T. Pollen analysis of New Zealand honey. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 28, n. 1, p. 39–70, 1985.

MORALES, M. M. et al. Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. **Science of the Total Environment**, v. 710, p. 136288, 2020.

MOREIRA, R. et al. Pyrrolizidine alkaloids: Chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 14–22, 2018.

MOREIRA, R. et al. Echium plantagineum L. honey: Search of pyrrolizidine alkaloids and polyphenols, anti-inflammatory potential and cytotoxicity. **Food Chemistry**, v. 328, n. May, p. 127169, 2020.

MOREIRA, S. B. L. C. et al. Varroa destructor mite infestation in colonies of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) in the potiguar Semi-arid region, Northeastern Brazil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 1, p. 143, 2017.

MULDER, P. P. J. et al. Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. **EFSA Supporting Publications**, v. 12, n. 8, 2015.

MULDER, P. P. J. et al. Transfer of pyrrolizidine alkaloids from various herbs to eggs and meat in laying hens. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 33, n. 12, p. 1826–1839, 2016.

MULDER, P. P. J. et al. Transfer of pyrrolizidine alkaloids from ragwort, common groundsel and viper’s bugloss to milk from dairy cows. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 11, p. 1906–1921, 1 nov. 2020.

MURCIA-MORALES, M. et al. Presence and distribution of pesticides in apicultural products: A critical appraisal. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 146, p. 116506, jan. 2022.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Toxicology and carcinogenesis studies of riddelliine (CAS No. 23246-96-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **National Toxicology Program**, 2003.

NEDELICHEVA, A.; KOSTOVA, N.; SIDJIMOV, A. Pyrrolizidine alkaloids in *Tussilago farfara* from Bulgaria. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 1, p. 1–7,

2015a.

NEDELICHEVA, A.; KOSTOVA, N.; SIDJIMOV, A. Pyrrolizidine alkaloids in *Tussilago farfara* from Bulgaria. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 1, p. 1–7, 2015b.

NISHIDA, S. M.; NAIDE, S. S.; PAGNIN, D. **Plantas que atraem aves e outros bichos**. [s.l.] Editora UNESP, 2014.

NOZAL, M. J. et al. An optimized extraction procedure for determining acaricide residues in foundation sheets of beeswax by using gas chromatography-mass spectrometry. **Agronomy**, v. 11, n. 4, 2021.

OBER, D.; HARTMANN, T. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. **PNAS**, v. 96, n. 26, 1999.

OLIVEIRA, J. N. B. **Anatomia das plantas superiores**. [s.l.: s.n.].

ORSO, D. et al. Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, p. 1638–1653, 2016.

PANZIERA, W. et al. Intoxicação natural por *Senecio brasiliensis* em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 313–318, 2017.

PAREDES, R.; BRYANT, V. M. Pollen analysis of honey samples from the Peruvian Amazon. **Palynology**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2019.

PEARSON, A. J. et al. Characterization and lifetime dietary risk assessment of eighteen pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides in New Zealand honey. **Toxins**, v. 13, n. 12, 2021.

PICRON, J.-F. et al. Monitoring of pyrrolizidine alkaloids in beehive products and derivatives on the Belgian market. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 5693–5708, 18 fev. 2019.

PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: USP & FAPESP., 1993.

PITA-CALVO, C.; VÁZQUEZ, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 79–87, jan. 2017.

POSWAL, F. S. et al. Herbal Teas and their Health Benefits : A Scoping Review. p. 266–276, 2019.

PRADA, F.; STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. LC/MS study of the diversity and distribution of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species growing in Colombia. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 23, p. 4322–4337, 9 dez. 2020.

PUUSEPP, L.; KOFF, T. Pollen analysis of honey from the Baltic region, Estonia. **Grana**, v.

53, n. 1, p. 54–61, 2014.

RAMALHO, M. et al. Characterization of some southern Brazilian honey and bee plants through pollen analysis. **Journal of Apicultural Research**, v. 30, n. 2, p. 81–86, 1991.

RECH, C. et al. Monocrotaline presence in the *Crotalaria* (Fabaceae) plant genus and its influence on arthropods in agroecosystems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–14, 2022.

REIS, A. **Flora Ilustrada Catarinense. 1996-2013**, [s.d.].

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 1965- 1989**, [s.d.].

RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples (a). **Talanta**, v. 93, p. 62–66, 2012a.

RIZELIO, V. M. et al. Fast determination of cations in honey by capillary electrophoresis: A possible method for geographic origin discrimination. **Talanta**, v. 99, p. 450–456, set. 2012b.

RIZZO, S. et al. Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction for the rapid and simple simultaneous analysis of pyrrolizidine alkaloids and related N-oxides in honey and pollen. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 108, n. October 2021, p. 104457, 2022.

ROBERTS, M. F.; WINK, M. **Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications**. Boston, MA: Springer US, 1998.

ROBINS, D. J.; SWEENEY, J. R. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Derivation of retronecine from l-arginine and l-ornithine. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 457–459, jan. 1983.

ROEDER, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 50, n. 10, p. 83–98, 1995.

RUAN, J. et al. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: Insights into the structural and enzymatic basis. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 1030–1039, 2014.

SÁ, R. O. DE. **Variabilidade genética entre progênes de meios irmãos de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus*) cultivar Cati Al 1000**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2005.

SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 10, p. 899–904, 2013.

SALOMÉ, J. A. **Levantamento e fenologia de plantas apícolas do estado de Santa Catarina**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

SALOMÉ, J. A.; ORTH, A. I. **Diversidade da flora apícola de Santa Catarina**. 2 Ed. ed. [s.l.] Agropecuária Catarinense, 2004.

SANTOS, E. F. DOS. **Origem botânica e análises físico-químicas em amostras de mel comerciais do estado de São Paulo, Brasil**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista Júlio de

Mesquita Filho - Câmpus de Rio Claro, 2016.

SANTOS, R. F. et al. Levantamento Da Flora Melífera De Interesse Apícola No Município De Petrolina-Pe. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 3, p. 221–227, 2006.

SCHAFASCHEK, T. P. et al. Desenvolvimento de colônias de *Apis mellifera* formadas com rainhas selecionadas para diferentes características. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 91–100, 2016.

SCHRAMM, S.; KÖHLER, N.; ROZHON, W. Pyrrolizidine alkaloids: Biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants. **Molecules**, v. 2, n. Figure 1, p. 1–44, 2019.

SCUPINARI, T. et al. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 6, p. 747–755, 2020.

SELMAR, D. et al. Transfer of pyrrolizidine alkaloids between living plants: A disregarded source of contaminations. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 456–461, 2019.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v. 87, p. 60–67, 2016.

SERAGLIO, S. K. T. et al. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. **Food Research International**, v. 119, n. January, p. 44–66, 2019a.

SERAGLIO, S. K. T. et al. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. **Food Research International**, v. 119, p. 44–66, 2019b.

SILVA, B. et al. Effect of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honey on inflammatory mediators. **Journal of Functional Foods**, v. 72, n. June, 2020.

SILVA, M. **Abelhas e plantas melíferas da zona rural dos municípios de Cocal do Sul, Criciúma e Nova Veneza, situados na região carbonífera no sul do estado de Santa Catarina**. [s.l.] Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2005.

SILVA, P. M. et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2016.

SIXTO, A.; NIELL, S.; HEINZEN, H. Straightforward Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey through Simplified Methanol Extraction (QuPPE) and LC-MS/MS Modes. **ACS Omega**, v. 4, n. 27, p. 22632–22637, 2019.

SKONECZNY, D. et al. Metabolic profiling of pyrrolizidine alkaloids in foliage of two echium spp. Invaders in Australia— A case of novel weapons? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26721–26737, 2015.

SKONECZNY, D. et al. Production of pyrrolizidine alkaloids and shikonins in *Echium*

plantagineum L. in response to various plant stressors. **Pest Management Science**, v. 75, n. 9, p. 2530–2541, 29 set. 2019.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II**. [s.l: s.n.].

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG IV**. 4ed. Insti ed. [s.l: s.n.].

STEGELMEIER, B.; COLEGATE, S.; BROWN, A. Dehydropyrrolizidine Alkaloid Toxicity, Cytotoxicity, and Carcinogenicity. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 356, 29 nov. 2016.

STUESSY, T. F. **Plant taxonomy. The systematic evaluation of comparative data**. [s.l: s.n.].

SUN, Q.-H. et al. Two new pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria albida*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 449–452, ago. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAMAKHINA, A. Y. et al. Influence of ecological factors on pyrrolizidine alkaloids accumulation. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 579, n. 1, p. 012050, 2020.

TAMARIZ, J. et al. Chapter One - Pyrrolizidine Alkaloids. In: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 80p. 1–314.

TETTE, P. A. S. et al. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC – MS / MS. **Food Chemistry**, v. 211, p. 130–139, 2016.

THOMÉ, V. M. R. et al. **Zoneamento Agroecológico e Socioeconômico de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1999.

TRIGO, J. R. et al. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil Senecio (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1011–1022, set. 2003.

VALESE, A. C. et al. A fast and simple LC-ESI-MS/MS method for detecting pyrrolizidine alkaloids in honey with full validation and measurement uncertainty. **Food Control**, v. 67, p. 183–191, set. 2016.

VALESE, A. C. et al. Quantification of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio brasiliensis*, beehive pollen, and honey by LC-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 7, p. 685–694, 3 jul. 2021.

VAN DAM, N. M. et al. Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 287–292, 1995.

VAN WYK, B. E.; STANDER, M. A.; LONG, H. S. *Senecio angustifolius* as the major source of pyrrolizidine alkaloid contamination of rooibos tea (*Aspalathus linearis*). **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 124–131, 2017.

VIBRANS, A. C. et al. Floresta Ombrófila Mista. Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina - Volume III. In: **Editora da FURB**. [s.l.] Universidade Regional de Blumenau, 2013. p. 440.

VON DER OHE, W. et al. Harmonized methods of melissopalynology. **Apidologie**, v. 35, p. 18–25, 2004.

WANG, J. et al. Determination of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional chinese herbal medicines by uplc-ms/ms and accompanying risk assessment for human health. **Molecules**, v. 26, n. 6, 2021.

WANG, J.; LI, Q. X. **Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 62

WANG, T. et al. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Quantification with and without standards. **Food Control**, v. 98, p. 227–237, abr. 2019a.

WANG, T. et al. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Quantification with and without standards. **Food Control**, v. 98, p. 227–237, abr. 2019b.

WANG, Y. P. et al. Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 3, p. 411–420, 2005.

WEBER, S. et al. Pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type: biosynthesis of trachelanthic acid. **Phytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 1005–1014, mar. 1999.

WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: Toxicity and problems. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 28, n. 3, p. 282–292, 2011.

WINK, M. Alkaloids: Properties and Determination. In: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 97–105.

YANG, M. et al. First evidence of pyrrolizidine alkaloid N-oxide-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in humans. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 12, p. 3913–3925, 2017.

ZHANG, W. et al. Ultra-Performance Liquid Chromatography Hyphenated with Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Necine-Core-Structure Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria sessiliflora* L. without all Corresponding Standards. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 365–373, 2017.

ZHOU, Y. et al. A new approach for simultaneous screening and quantification of toxic pyrrolizidine alkaloids in some potential pyrrolizidine alkaloid-containing plants by using ultra performance liquid chromatography – tandem quadrupole mass spect. **Analytica Chimica Acta**, v. 681, p. 33–40, 2010.

ZHU, L. et al. The long persistence of pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts in vivo: kinetic study following single and multiple exposures in male ICR mice. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 949–965, 2017.

ZHU, L. et al. Contamination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in retail honey in China. **Food Control**, v. 85, p. 484–494, 2018.

**Apêndice A – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Araranguá, Estado de Santa Catarina.**

Continuação.

**ARP1**



**ARP2**



**ARP3**



**ARP4**



**ARP5**



**ARP6**



**ARP7**



**ARP8**



**ARP9**



**ARP10**



**ARP11**



**ARP12**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice A – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Araranguá, Estado de Santa Catarina.**

Continuação.

**ARP13**



**ARP14**



**ARP15**



**ARP16**



**ARP17**



**ARP18**



**ARP19**



**ARP20**



**ARS1**



**ARS2**



**ARS3**



**ARS4**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice A – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Araranguá, Estado de Santa Catarina.**

Continuação.

**ARS5**



**ARS6**



**ARS7**



**ARS8**



**ARS9**



**ARS10**



**ARS11**



**ARS12**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice A – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Araranguá, Estado de Santa Catarina.**

Continuação.

**ARS13**



**ARS14**



**ARS15**



**ARS16**



**ARS17**



**ARS18**



**ARS19**



**ARS20**



**ARTP1**



**ARTP2**



**ARTP3**



**ARS21**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice A – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Araranguá, Estado de Santa Catarina.**

Conclusão.

**ARTP4**



**ARTP5**



**ARTP6**



**ARTP7**



**ARTP8**



**ARTP9**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice B – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Miguel do Oeste, Estado de Santa Catarina.**

Continuação.

**SMP1**



**SMS1**



**SMS2**



**SMS3**



**SMS4**



**SMT1**



**SMT2**



**SMT3**



**SMT4**



**SMT5**



**SMT6**



**SMT7**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice B – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Miguel do Oeste, Estado de Santa Catarina.**

Conclusão.

SMT8



SMT9



SMT10



SMT11



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice C – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Caçador, Estado de Santa Catarina.**

Continuação

CAP1



CAP2



CAP3



CAP4



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice C – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Caçador, Estado de Santa Catarina.**

Continuação

**CAP5**



**CAP6**



**CAP7**



**CAP8**



**CAP9**



**CAS1**



**CAS2**



**CAS3**



**CAS4**



**CAS5**



**CAS6**



**CAS7**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice C – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Caçador, Estado de Santa Catarina.**

Conclusão.

**CAT1**



**CAT2**



**CAT3**



**CAT4**



**CAT5**



**CAT6**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice D – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Mafra, Estado de Santa Catarina.**

**MFP1**



**MFP2**



**MFS1**



**MFS2**



**MFS3**



**MFS4**



**MFT1**



**MFT2**



**MFT3**



**MFT5**



**MFT4**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice E – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Joinville, Estado de Santa Catarina.**

Continuação

**JVP1**



**JVP2**



**JVP3**



**JVP4**



**JVP5**



**JVP6**



**JVS1**



**JVS2**



**JVS3**



**JVS4**



**JVS5**



**JVS6**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice E – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Joinville, Estado de Santa Catarina.**

Continuação

**JVS7**



**JVS8**



**JVT1**



**JVT2**



**JVT3**



**JVT4**



**JVT5**



**JVT6**



**JVT7**



**JVT8**



**JVT9**



**JVT10**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice E – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em Joinville, Estado de Santa Catarina.**

Conclusão.

**JVT11**



**JVT12**



**JVT13**



**JVT14**



**JVT15**



**JVT16**



**JVT17**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice F – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Joaquim, Estado de Santa Catarina.**

Continuação



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice F – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Joaquim, Estado de Santa Catarina.**

Continuação

**SJP9**



**SJP10**



**SJP11**



**SJP12**



**SJP13**



**SJP14**



**SJP15**



**SJP16**



**SJP17**



**SJS1**



**SJS2**



**SJS3**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice F – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Joaquim, Estado de Santa Catarina.**

Continuação

**SJS4**



**SJS5**



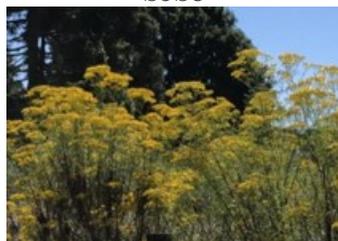
**SJS6**



**SJS7**



**SJS8**



**SJS9**



**SJT1**



**SJT2**



**SJT3**



**SJT4**



**SJT5**



**SJT6**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**Apêndice F – Imagens das plantas coletadas em três diferentes períodos do ano de 2018 e próximas da colmeia localizada em São Joaquim (SJ), Estado de Santa Catarina.**

Conclusão.

**SJT7**



**SJT8**



**SJT9**



**SJT10**



**SJT11**



Fonte: Acervo pessoal de Denilson Dortzbach e Patricia Brugnerotto.

**APÊNDICE G - Alcaloides pirrolizidínicos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) encontrados em méis de melato de bracatinga.**

Ano	ID	Intermedina+ licopsamina	Senecionina	Senecionina N-óxido	Retrorsina N-óxido	Soma	Ingestão diária máxima de mel (g) que não excede a IDR de AP em alimentos
2016	1	112,4 ± 0,6	32,2 ± 20,1	<LOD	<LOD	144,6 ± 19,5	9,8
	2	254,2 ± 0,5	< LOQ	<LOD	<LOD	254,2 ± 0,5	5,6
	3	26,2 ± 0,7	< LOQ	<LOD	<LOD	26,2 ± 0,7	54,2
	4	225,4 ± 4,3	< LOQ	<LOD	<LOD	225,4 ± 4,3	6,3
	5	161,5 ± 9,5	38,0 ± 1,8	<LOD	<LOD	199,5 ± 7,8	7,1
	6	655,4 ± 35,3	25,0 ± 3,1	<LOD	<LOD	679,5 ± 40,5	2,1
	7	179,3 ± 14,9	< LOQ	<LOD	<LOD	179,3 ± 14,9	7,9
	8	22,2 ± 3,4	< LOQ	<LOD	<LOD	22,2 ± 3,4	63,8
	9	61,9 ± 4,8	< LOQ	<LOD	<LOD	61,9 ± 4,8	22,9
	10	66,3 ± 2,2	< LOQ	<LOD	<LOD	66,3 ± 2,2	21,4
	11	24,5 ± 2,0	< LOQ	<LOD	<LOD	24,5 ± 2,0	58,0
	12	294,0 ± 13,0	91,8 ± 1,9	<LOD	<LOD	385,8 ± 11,1	3,7
	13	10,0 ± 0,7	472,2 ± 8,4	<LOD	<LOD	482,3 ± 9,1	3,0
	14	48,1 ± 0,2	180,5 ± 9,8	<LOD	<LOD	228,6 ± 10,0	6,2
	15	75,1 ± 5,3	< LOQ	<LOD	<LOD	75,1 ± 5,3	18,9
2018	16	56,2 ± 0,5	<LOQ	<LOD	<LOD	56,2 ± 0,5	25,3
	17	<LOQ	114,42	<LOD	13,5 ± 2,1	123,4 ± 3,0	11,5
	18	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	-	-
	19	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	-	-
	20	<LOQ	711,2 ± 85,0	<LOD	<LOD	711,2 ± 82,0	2,0
	21	54,2 ± 1,3	667,5 ± 21,9	<LOD	<LOD	721,7 ± 22,8	2,0
	22	291,8 ± 10,2	<LOQ	<LOD	<LOD	291,8 ± 10,2	4,9
	23	130,9 ± 3,3	840,4 ± 111,7	<LOD	<LOD	971,3 ± 114,5	1,5
	24	256,2 ± 6,7	<LOD	<LOD	<LOD	256,2 ± 6,7	5,5
	25	5,9 ± 0,6	20,6 ± 2,1	<LOD	39,9 ± 1,7	66,9 ± 2,0	21,2
	26	52,1 ± 3,4	2357,7 ± 172,3	<LOD	<LOD	2409,8 ± 175,6	0,6
	27	224,4 ± 6,4	<LOD	58,8 ± 4,5	<LOD	28,2 ± 10,9	5,0
	28	130,6 ± 1,6	<LOD	<LOD	<LOD	130,6 ± 1,6	10,9
	29	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	-	-
	30	93,4 ± 2,4	245,9 ± 3,1	29,2 ± 4,8	26,9 ± 2,1	395,4 ± 6,3	3,6
	31	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	-	-
2020	32	5,6 ± 0,9	<LOD	<LOD	<LOD	5,6 ± 0,9	254,7
	33	46,9 ± 4,4	<LOD	<LOD	<LOD	46,9 ± 4,4	30,3
	34	105,3 ± 3,3	151,0 ± 12,2	<LOD	<LOD	144,9 ± 15,4	5,5
	35	251,9 ± 7,4	<LOD	<LOD	<LOD	251,9 ± 7,4	5,6
	36	199,8 ± 3,2	<LOD	<LOD	<LOD	199,8 ± 3,2	7,1
	37	208,3 ± 13,9	<LOD	<LOD	<LOD	208,3 ± 13,9	6,8
	38	57,8 ± 2,3	<LOD	<LOD	<LOD	57,8 ± 2,3	24,6
	39	189,5 ± 7,2	<LOD	<LOD	<LOD	189,5 ± 7,2	7,5
	40	16,3 ± 0,3	93,8 ± 5,4	<LOD	<LOD	110,1 ± 5,1	12,9
	41	1038,2 ± 64,2	72,6 ± 4,3	<LOD	<LOD	1110,8 ± 68,5	1,3
	42	782,4 ± 28,8	188,8 ± 31,4	<LOD	<LOD	973,0 ± 63,5	1,5

ID: Identificação; IDR: Ingestão diária recomendada; LOQ: Limite de quantificação; LOD: Limite de detecção; LOQ de intermedina+licopsamina e senecionina:  $0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Fonte: Próprio autor (2022).

## **APÊNDICE H – Determinação de agrotóxicos em méis florais e de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella*) da região Sul do Brasil por GC-MS: Um estudo de caso**

### **1. Introdução**

Os defensivos agrícolas, nomeados como agrotóxicos na legislação brasileira, compreendem um grupo de substâncias químicas sintéticas utilizadas em diferentes setores ambientais e agrícolas (produção, armazenamento, pastagens, proteção de florestas, ecossistemas) (BRASIL, 1989). No Brasil, os agrotóxicos são avaliados e aprovados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) quanto à eficiência agronômica; pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quanto ao impacto para a saúde humana; e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) quanto aos impactos ao meio ambiente. Todas as questões relacionadas aos agrotóxicos, desde a pesquisa até à fiscalização, são regulamentadas pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (BRASIL, 1989, 2002). Além disso, os agrotóxicos são classificados em seis principais classes que compreendem inseticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, reguladores de crescimento vegetal e outros produtos farmacêuticos (óleos minerais e vegetais, rodenticidas, nematicidas biológicos, entre outros) (EUROPEAN COMMISSION, 2017; FAO, 2019). Mesmo que sejam utilizados para controlar pragas e doenças, bem como elevar a produtividade de culturas, seu uso intensivo e frequente gera impactos negativos sobre o meio ambiente e seres humanos. Os agrotóxicos podem promover intoxicações aguda ou crônica, dependendo da exposição humana (inalação, contato dérmico ou oral) e da classificação toxicológica (classe I extremamente tóxico – classe V produto improvável de causar dano agudo) dos agrotóxicos (BRASIL, 2019a).

O Brasil é o principal consumidor de pesticidas especialmente pela quantidade de agrotóxicos permitidos para uso (ANVISA, 2022). Esse fato representa preocupações sobre o seu destino no ambiente e sobretudo seus resíduos em alimentos, especialmente nos produtos da colmeia. A presença de agrotóxicos em produtos apícolas (MURCIA-MORALES et al., 2022; NOZAL et al., 2021) pode ser ocasionada indiretamente pelas abelhas, que durante o forrageamento tem contato com o ambiente e/ou plantas em presença destes compostos ou, por outro lado, podem ser introduzidos diretamente pelo homem, uma vez que utiliza os agrotóxicos na colmeia para tratamento contra doenças das abelhas (BOGDANOV, 2006). Embora seja

frequente o uso de acariciadas (amitraz,  $\tau$ -fluvalinato, coumafós, cymiazol) para mitigar problemas causados pelo *Varroa destructor*<sup>12</sup> em colmeias na Europa e Estados Unidos (AL-WAILI et al., 2012; BAJUK et al., 2017; FULTON et al., 2019; GRACIA et al., 2017), no Brasil, apesar do *V. destructor* ser relatado em colmeias de diferentes regiões, os níveis de infestação são relativamente baixos a ponto de não representar risco às abelhas e prejudicar as atividades das colônias (ANASTÁCIO et al., 2013; MOREIRA et al., 2017; SCHAFASCHEK et al., 2016). Além disso, vem sendo relatado uma tendência de substituição de acaricidas sintéticos por ácidos orgânicos (fórmico e oxálico) (GÓMEZ et al., 2022) devido à resistência deste ácaro aos acaricidas e pelos seus resíduos com potencial tóxico em ceras (DE SOUZA et al., 2022; NOZAL et al., 2021), pólen (CODLING et al., 2016) e mel (CODLING et al., 2016; DE SOUZA et al., 2021; ORSO et al., 2016). Alguns estudos também reportaram que, mesmo em um ambiente com baixa probabilidade de uso de agrotóxicos, a presença de tais compostos no mel pode se dar devido à reutilização de lâminas de cera contaminadas nas colmeias, favorecendo a transferência dos agrotóxicos ao produto final (NOZAL et al., 2021).

Para controlar o uso de agrotóxicos e proteger os consumidores, autoridades reguladoras como a Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2022) e o *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS, 2020), estabeleceram limites máximos de resíduos (LMR) para alguns agrotóxicos em alimentos, incluindo méis. Além disso, o MAPA, por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) (BRASIL, 2019b) e em conjunto com a ANVISA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, PARA) por meio das monografias de agrotóxicos (ANVISA, 2020), estruturaram um serviço para avaliar e promover a segurança dos alimentos em relação aos resíduos de agrotóxicos. Portanto, considerando os agrotóxicos que são frequentemente detectados em méis, na Tabela 1 foram apresentados os seus LMR estabelecidos em diferentes países.

---

<sup>12</sup> Um ácaro que se aloja no tórax e abdômen de zangões e operárias para se alimentar de hemolinfa e, dependendo da gravidade da infestação, podendo levar ao colapso de colônias de abelhas (MOREIRA et al., 2017).

**Tabela 1.** Limites máximos de resíduos (mg kg<sup>-1</sup>) permitidos para agrotóxicos em méis por diferentes órgãos legisladores no Brasil, Europa e Estados Unidos.

Compostos	LMRs permitidos para mel			Grupo Químico/ Categoria agrônômica
	Brasil (PNCRC) <sup>#</sup>	Comissão Europeia	Estados Unidos	
Atrazina	-	0,05 <sup>a</sup>	-	Triazina/ Herbicida
Clorpirifós	0,05	0,01 <sup>b</sup>	-	Organofosforado/ Inseticida, formicida e acaricida
Clorfenvinfos	0,01	0,01 <sup>c</sup>	-	Organofosforado/ Acaricida e inseticida
α-Endossulfan	0,01	0,01 <sup>d</sup>	-	Organoclorado/ Acaricida e inseticida
Bromopropilato	0,01	0,01 <sup>d</sup>	-	Difenil, bromado/ Acaricida
Coumafós	-	0,10 <sup>e</sup>	0,15 <sup>g</sup>	Inseticida, acaricida
τ-Fluvalinato	-	0,05 <sup>f</sup>	0,02 <sup>g</sup>	Piretróide/ Inseticida, acaricida

Legenda: <sup>#</sup> - PNCRC, Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa nº 5, de 23 de abril de 2019; <sup>a</sup> - Regulamento da Comissão Europeia (2016/440) de 23 de março de 2016; <sup>b</sup> - Regulamento da Comissão Europeia (2020/1085) de 23 de julho de 2020; <sup>c</sup> - Regulamento da Comissão Europeia (1138/2013) de 8 de novembro de 2013; <sup>d</sup> - Regulamento da Comissão Europeia (310/2011) de 28 de março de 2011; <sup>e</sup> Regulamento da Comissão Europeia (2017/623) de 30 de março de 2017; <sup>f</sup> - Regulamento da Comissão Europeia (2022/93) de 20 de janeiro de 2022; <sup>g</sup> - *Environmental Protection Agency* (EPA).

Fonte: Próprio autor (2022).

Conforme apresentado na Tabela 1, além das suas ações contra insetos (inseticidas) e plantas indesejáveis (herbicidas), alguns agrotóxicos também são utilizados para tratamento de ácaros (acaricidas). Portanto, o mel também está sujeito à presença de resíduos de agrotóxicos, provenientes do meio ambiente ou dos que são utilizados na proteção das colmeias (BANDINI; SPISSO, 2017).

Murcia-Morales et al. (2022) reportaram que diferentes agrotóxicos foram investigados em produtos apícolas, com destaque para clorpirifos, clorfenvinfos, coumafós, τ-

fluvalinato, amitraz, atrazina, bromopropilato, entre outros. Entre as matrizes apícolas, os agrotóxicos foram investigados em méis de diferentes origens geográficas (Espanha, Estônia, China, Uruguai, Egito, Bélgica, França), sendo clorpirifos o agrotóxico frequentemente encontrado com concentração inferior a  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  (MURCIA-MORALES et al., 2022). Em méis florais do Brasil (ALMEIDA et al., 2020; DE PINHO et al., 2010; ORSO et al., 2016; SALAMI; QUEIROZ, 2013; TETTE et al., 2016), especialmente dos estados de Santa Catarina e Paraná (região sul) são escassos estudos sobre os agrotóxicos e inexistentes para méis de melato.

Neste contexto, de acordo com a experiência do grupo de pesquisa da Universidade de Valladolid e, com o objetivo de verificar se os méis brasileiros também atendiam às exigências de exportação quanto aos LMR para agrotóxicos, esse estudo investigou a presença de sete agrotóxicos em méis florais de colmeias monitoradas no Estado de Santa Catarina e de méis de melato de bracinga provenientes da região Sul do Brasil por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões de grau analítico (atrazina, clorpirifos,  $\alpha$ -endossulfan,  $\tau$ -fluvalinato, clorfenvinfos clorfenvinfos-D 10, bromopropilato, cumafós), foram adquiridos da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Os solventes de grau cromatográfico acetato de etila e ciclohexano foram adquiridos da VWR Prolabo Chemicals (Fontenay-sous-Bois, França). Água ultrapura foi obtida usando os sistemas Milipore Milli-RO Plus e Milli-Q (Bedford, Massachusetts, Estados Unidos).

### 2.2 Preparo das soluções

As soluções estoque individuais dos pesticidas foram preparadas individualmente ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) em acetato de etila:ciclohexano (50:50, v/v) para posterior diluição e preparação de solução de trabalho ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). O padrão interno (clorfenvinfos-D 10) foi preparado na concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  em acetato de etila:ciclohexano (50:50, v/v). A quantificação foi

realizada a partir da interpolação da curva analítica com cinco níveis de concentração (0,03; 0,10; 0,25, 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>). Todas as soluções foram armazenadas a -18 °C até seu uso.

### 2.3 Amostras

Para o estudo foram analisadas amostras de mel floral ( $n = 6$ ) do Estado de Santa Catarina e de melato de bracatinga dos estados de Santa Catarina ( $n = 15$ ) e Paraná ( $n = 13$ ), conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Informações sobre as amostras de mel floral e de melato de bracatinga.

<b>Origem geográfica</b>	<b>Ano produção</b>	<b>Código</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Ano produção</b>	<b>Código</b>
Mafra	2018	F1SC	Bom Retiro	2018	M12SC
São Miguel do Oeste	2018	F2SC	Urupema	2018	M13SC
Caçador	2018	F3SC	São Bento do Sul	2018	M14SC
Araranguá	2018	F4SC	Bocaina do Sul	2018	M15SC
São Joaquim	2018	F5SC	União da Vitória	2020	M1PR
Joinville	2018	F6SC	União da Vitória	2020	M2PR
Bocaina do sul	2020	M1SC	União da Vitória	2020	M3PR
Caçador	2020	M2SC	União da Vitória	2020	M4PR
Caçador	2020	M3SC	União da Vitória	2020	M5PR
São Joaquim	2020	M4SC	União da Vitória	2020	M6PR
Canoinhas	2020	M5SC	União da Vitória	2020	M7PR
Canoinhas	2020	M6SC	União da Vitória	2020	M8PR
Canoinhas	2020	M7SC	União da Vitória	2020	M9PR
Canoinhas	2020	M8SC	União da Vitória	2020	M10PR
Bocaina do Sul	2020	M9SC	União da Vitória	2020	M11PR
Urubici	2018	M10SC	União da Vitória	2020	M12PR
Lages	2018	M11SC	União da Vitória	2020	M13PR

M: Mel de melato de bracatinga; F: mel floral; SC: Santa Catarina; PR: Paraná.

Fonte: Próprio autor (2022).

### 2.4 Preparo de amostras

O tratamento das amostras foi com base na metodologia descrita por Ballesteros (2022), a qual foi desenvolvida em colaboração com a autora desta tese durante seu período de doutorado sanduíche na Universidad de Valladolid, Espanha.

O preparo de amostras foi realizado de maneira independente para cada tipo de mel. Para méis florais, uma massa de  $5,0 \pm 0,1$  g de amostra e 10 mL de água ultrapura foram colocadas em tubos de polipropileno (capacidade de 50 mL) e homogeneizadas em vórtex (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha) por 1 min. Em seguida foi adicionado ao tubo 10 mL de acetato de etila:ciclohexano (50:50, v/v) e o material deixado sob agitação em mesa agitadora (J.P. Selecta S.A. Barcelona, Espanha), por 10 min a máxima potência. Posteriormente, o material foi centrifugado (modelo 5810 R, Eppendorf International, Hamburgo, Alemanha) por 10 min a  $5^{\circ}\text{C}$  e 10.000 rpm. Uma alíquota de 5 mL do sobrenadante (fase orgânica) foi levada ao rotavapor (modelo R-3, Buchi, Flawil, Switzerland) para completa evaporação do solvente e posterior reconstituição do extrato seco em 0,5 mL de padrão interno ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ; acetato de etila:ciclohexano, 50:50, v/v). Para méis de melato de bracinga uma massa de  $2,0 \pm 0,1$  de amostra e 10 mL de água ultrapura foram colocadas em tubos de polipropileno (capacidade de 50 mL) e homogeneizadas em vórtex (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha) por 1 min. Posteriormente foi adicionado ao tubo 10 mL de acetato de etila:ciclohexano (50:50, v/v) e o material deixado sob agitação em vibromatic por 10 min a máxima potência. Em seguida, o material foi centrifugado (modelo 5810 R, Eppendorf International, Hamburgo, Alemanha) por 10 min a 10.000 rpm e  $5^{\circ}\text{C}$ , e uma alíquota de 7 mL do sobrenadante transferido a um balão de rotaevaporador. Uma segunda extração foi realizada no mesmo tubo de polipropileno. Para isso, foi adicionado 10 mL de acetato de etila:ciclohexano (50:50, v/v) sob o material resultante da primeira extração, deixado sob agitação em vibromatic (10 min), centrifugado (10 min a  $5^{\circ}\text{C}$  e 10.000 rpm) e uma alíquota de 7 mL do sobrenadante incorporado ao balão de rotaevaporador. O solvente orgânico (14 mL) foi evaporado ( $60^{\circ}\text{C}$ ) usando um rotaevaporador e o extrato seco foi reconstituído em 0,5 ml de padrão interno ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ; acetato de etila:ciclohexano, 50:50, v/v) para injeção no GC - MS.

## 2.5 Condições cromatográficas e do espectrômetro de massas

Um cromatógrafo a gás (modelo 7890-A) acoplado a um detector de espectrometria de massas (modelo 5975C), ambos da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), foram empregados para avaliar sete pesticidas nas amostras de mel. O software *MS ChemStation* versão 01.00.237 (Agilent Technologies) foi utilizado para aquisição dos dados. As condições

cromatográficas empregadas no estudo foram de acordo com metodologia descrita por (NOZAL et al., 2021) com modificações (BALLESTEROS 2022). Para tal, foi utilizado uma coluna DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.2 m), volume de injeção 1 µL (modo *splitless*), temperatura de injeção 310 °C, gás de arraste hélio (1,2 mL min<sup>-1</sup>), energia de ionização de 70 eV e modo de aquisição de sinal SIM (*selected ion monitoring*).

### 3. Resultados e discussão

Em 23% das amostras avaliadas foi detectada a presença de três dos sete acaricidas avaliados, conforme apresentado na Tabela 3. Todas as amostras positivas para os agrotóxicos são provenientes do Estado de Santa Catarina.

**Tabela 3.** Pesticidas detectados (µg kg<sup>-1</sup>) nos méis florais e de melato de bracatinga

Amostras positivas	Atrazina	τ-Fluvalinato	Coumafós
F5SC	<LOQ	n.d	n.d
M4SC	9 ± 1	n.d	<LOQ
M6SC	<LOQ	n.d	n.d
M7SC	<LOQ	n.d	n.d
M8SC	<LOQ	n.d	n.d
M11SC	7 ± 1	n.d	n.d
M12SC	<LOQ	n.d	n.d
M13SC	n.d	<LOQ	<LOQ

Legenda: n.d – não detectado; LOQ – limite de quantificação; LOQ da atrazina 2,1 µg kg<sup>-1</sup>; LOQ do τ-Fluvalinato 3,0 µg kg<sup>-1</sup>; LOQ do coumafós 0,9 µg kg<sup>-1</sup>.

Fonte: Próprio autor (2022).

Para atrazina as concentrações variaram entre < LOQ e 9 ± 1 µg kg<sup>-1</sup>, as quais estão abaixo do LMR (0,05 mg kg<sup>-1</sup>) estabelecido pela União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2019). No Brasil, apesar da atrazina (herbicida) não estar incluído na Instrução Normativa nº 5, de 23 de abril de 2019 (BRASIL, 2019b), o mesmo está permitido para uso em seis culturas agrícolas (abacaxi, cana-de-açúcar, milho, milheto, soja e sorgo) com LMR entre 0,01 – 0,25 mg kg<sup>-1</sup> (ANVISA, 2022). Além disso, de acordo com dados do Infoagro do Estado

de Santa Catarina, entre 2018 e 2020, nas regiões de São Joaquim e Lages principalmente, as culturas com maiores produções (toneladas) foram milho e arroz (INFOAGRO, 2018). Desta forma, pode ser compreensível a presença de atrazina nos méis de melato de bracinga (Tabela 3), quantificados especialmente nas regiões acima citadas. Em méis florais de outros estados do Brasil a atrazina não foi detectada (ALMEIDA et al., 2020; ORSO et al., 2016).

Coumafós e  $\tau$ -fluvalinato são compostos apolares e devido a esta característica possuem maior tendência em persistirem na cera por longos períodos, sendo encontrados com frequência nessa matriz (MORALES et al., 2020), mas também em méis (PREMROV et al., 2017; RUSSO & NERI 2002). Nesse estudo, ambos pesticidas foram detectados em uma e duas amostras, respectivamente, porém com níveis inferiores ao LOQ e conseqüentemente ao LMR. Na Europa, coumafós e  $\tau$ -fluvalinato são amplamente utilizados contra *Varroa* nas colmeias (BAJUK et al., 2017), porém no Brasil não foram encontradas informações sobre seu uso em colmeias e tampouco está na lista de monografias de agrotóxicos (permitido e/ou excluídos) da ANVISA. Às vezes, pode ocorrer o uso ilegal destes agrotóxicos, adquiridos em comércio ilícito, e aplicados na agricultura e/ou nas colmeias devido as suas propriedades (inseticida, acaricida). A exemplo disso, existe a disponibilidade, em comércio eletrônico, de fitas de fluvalinato para uso contra ácaros de colmeias. Nesse sentido, sempre que possível, é importante ter a rastreabilidade da origem do produto e também de análises de agrotóxicos, a fim de assegurar a qualidade e identificar possível uso clandestino de substância proibidas por órgãos governamentais.

De acordo com um trabalho recente, além de coumafós e  $\tau$ -fluvalinato, clorpirifos, foi o agrotóxico mais detectado em produtos da colmeia entre 2011 e 2021 (MURCIA-MORALES et al., 2022). Especialmente entre 2016 e 2019 clorpirifos foi o pesticida detectado com maior frequência em méis ( $< \text{LOQ a } 7,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e pólenes da Polônia, Itália e Espanha, (MURCIA-MORALES et al., 2022). No Brasil, este composto está permitido para uso em 22 culturas agrícolas (ANVISA, 2022) e foi determinado com concentrações entre  $0,4$  e  $20,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  em alguns méis do Estado do Rio Grande do Sul (DA SILVA et al., 2015; ORSO et al., 2016). No entanto, nas amostras deste estudo, clorpirifos não foi detectado.

Neste estudo, clorfenvinfos,  $\alpha$ -endossulfan e bromopropilato também não foram detectados. Apesar dos três compostos terem seus LMRs estabelecidos para méis no Brasil e Europa, clorfenvinfos foi excluído da monografia de autorizados pela ANVISA, (atualizado em

13/11/2020), enquanto  $\alpha$ -endossulfan e bromopropilato foram banidos para uso em culturas agrícolas no Brasil em 2014 (Resolução - n° 2.908, de 5 de agosto de 2014) e 2019 (Resolução - n°1.967, de 18 de julho de 2019), respectivamente.

A vasta quantidade de agrotóxicos permitidos para uso em atividades agrícolas no Brasil também permite que esses compostos se propaguem pelo ambiente e sua presença seja detectada em méis de diferentes regiões. A partir de alguns estudos publicados foi observado a presença de outros agrotóxicos em méis brasileiros. Para 31 das 33 amostras de méis florais (Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e São Paulo) carbendazim e tiabendazol (ambos em 20 amostras), azoxistrobina (15 amostras), clorpirifos e imidacloprido (ambos em 12 amostras) foram frequentemente detectados nos méis, no entanto, todos com concentrações abaixo do LMR (BRASIL, 2019b; EUROPEAN COMMISSION, 2019). Resíduos de clorpirifos ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) acima do LMRs foi detectado em duas das 11 amostras de méis de Minas Gerais avaliadas por De Pinho et al. (2010), enquanto uma das 66 amostras do mesmo Estado avaliadas por Tette et al. (2016) apresentou triclorfon ( $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ ) acima do MRLs estabelecido pela União Europeia ( $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Ainda de acordo com os autores, esse composto é utilizado para controlar uma variedade de pragas e parasitas de animais domésticos, que por uma manipulação não controlada próximo da colmeia pode ter causado a contaminação no mel. Para méis provenientes do Estado do Rio Grande do Sul, mesmo sendo avaliados inúmeros agrotóxicos, entre eles, clorpirifos, as concentrações detectadas sempre foram abaixo do LMR (DE SOUZA et al., 2021; ORSO et al., 2016).

Os reduzidos níveis de pesticidas ou sua ausência em algumas amostras de MMB podem estar relacionadas a diversos fatores. É de conhecimento que a produção de MMB ocorre a partir da interação da cochonilha com a bracatinga e em épocas de escassez de floradas. Adicionalmente, a bracatinga está presente em matas de araucárias, a qual é caracterizada por uma floresta densa e fechada com inúmeras espécies de vegetais. A partir dessas características, pode haver um favorecimento de redução de deslocamento das abelhas para outras regiões já que as colmeias são estrategicamente alocadas próximas aos bracatingais. Devido a isso, a abelha tem menos contato com possíveis ambientes contaminados por pesticidas, além de considerar que o apicultor (re)utilize ceras nas colmeias isentas de tais compostos.

A substituição dos agrotóxicos sintéticos utilizados na apicultura por outros produtos “verdes”, tais como, ácidos oxálico e/ou fórmico, timol, óleos essenciais, é uma tendência

crecente reportada no setor apícola (MURCIA-MORALES et al., 2022). No entanto, incluir os ácidos oxálico e fórmico nos métodos de multiresíduos ainda é um desafio, uma vez que, são moléculas pequenas e polares.

No que diz respeito à distribuição desses agrotóxicos nos produtos da colmeia, o mel geralmente apresenta ausência ou reduzidos níveis desses compostos devido à alta polaridade (polar) de seus principais componentes (água e carboidratos), resultando baixo acúmulo da maioria dos pesticidas (apolares) nesta matriz (MURCIA-MORALES et al., 2022). No entanto, devido à potencialidade tóxica e dos LMR estabelecidos, a investigação e monitoramento dos agrotóxicos no produto apícola mais consumido, não deve ser negligenciada. Além da toxicidade para os consumidores, a contaminação do mel possui igual relevância quando considerado o contexto econômico da exportação, uma vez que o mercado internacional é muito exigente quanto à qualidade dos produtos que importa, principalmente a União Europeia (BARGAŃSKA; ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2016; PORRINI et al., 2003).

#### **4. Conclusões**

Este estudo apresentou dados inéditos sobre a presença de pesticidas em méis de melato de bracatinga e de méis florais de colmeias monitoradas no Estado de Santa Catarina. De acordo com os resultados, todos os méis avaliados demonstraram estar de acordo com os limites máximos de resíduos estabelecidos no Brasil, União Europeia e Estados Unidos, especialmente atrazina que foi detectada com concentrações menores que  $9 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Em decorrência disso, consumidores e importadores dos méis podem consumir um produto seguro ou com baixo risco para saúde, além do produto estar livre de possível barreira técnica de exportação. A localização das colmeias, especialmente para produção de MMB podem ser um fator importante e que contribuiu para os baixos níveis de pesticidas no mel. Algumas sugestões para trabalhos futuros também são destacadas, entre elas, incluir no escopo de análises outros agrotóxicos, tais como, fipronil, amitraz e seus metabólitos, os quais são atualmente permitidos para uso em diferentes culturas no Brasil e também possuem LMR para méis. Realizar análises de agrotóxicos em méis florais do Estado de Santa Catarina, uma vez que são quase inexistentes estudos dessa ordem; avaliar o monitoramento dos agrotóxicos em MMB e também em outras matrizes, especialmente as ceras, uma vez que, se reutilizadas e com presença de agrotóxicos, podem ser carreadoras de uma contaminação indesejada nos méis; divulgar informações obtidas

para promover ações de conscientização do potencial risco da presença de agrotóxicos nos méis, em termos de segurança alimentar e de impacto econômico no setor apícola.

## Referências

AL-WAILI, N. et al. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. Table 1, p. 1–9, 2012.

ALMEIDA, M. O. et al. Optimization of Method for Pesticide Detection in Honey by Using Liquid and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometric Detection. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1368, 26 set. 2020.

ANASTÁCIO, M. D. et al. Nivel de infestação de Varroa destructor em Apis mellifera africanizadas nas diferentes estações do ano. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 2, n. 2, p. 61–68, 2013.

ANVISA. **Agrotóxicos em Alimentos**, 2020. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/duvidas-sobre-agrotoxicos-em-alimentos>>

ANVISA. **Monografias Autorizadas**, 2022. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>

BAJUK, B. P. et al. Coumaphos residues in honey, bee brood, and beeswax after Varroa treatment. **Apidologie**, v. 48, n. 5, p. 588–598, 22 set. 2017.

BALLESTEROS, A. F., Análisis de residuos de plaguicidas en mieles de distinto origen botánico: optimización de la preparación de muestra y validación de un nuevo método por cromatografía de gases-masas. **Dissertação de mestrado**. Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid, 73p, 2022.

BANDINI, T. B.; SPISSO, B. F. Risco sanitário do mel no Brasil em relação a novas ameaças: resíduos e contaminantes químicos emergentes. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 1, p. 116–126, 2017.

BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v. 37, n. 1, p. 1–18, 13 jan. 2006.

BRASIL. **lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**, 1989.

BRASIL. **Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002**, 2002.

BRASIL. **Resolução n2.080, de 31 de julho de 2019**, 2019a.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 5, de 23 de abril de 2019**. [s.l: s.n.].

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Maximum Residue Limits for Pesticides**, 2020.

CODLING, G. et al. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey , pollen and honey bees ( *Apis mellifera* L . ) in central. **Chemosphere**, v. 144, p. 2321–2328, 2016.

DE PINHO, G. P. et al. **Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography** *Food Control*, 2010.

DE SOUZA, A. P. F. et al. Occurrence of pesticide residues in Brazilian *Apis mellifera* beeswax by gas chromatography-tandem mass spectrometry and pesticide hazard evaluation. **Journal of Apicultural Research**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2022.

DE SOUZA, A. P. F. DE et al. Analysis of insecticide residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS optimized by the Plackett Burman design. **CYTA - Journal of Food**, v. 19, n. 1, p. 326–332, 2021.

EUROPEAN COMMISSION. [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels_en), 2019.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides Database**. Disponível em: <[https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en)>.

FULTON, C. A. et al. An Examination of Exposure Routes of Fluvalinate to Larval and Adult Honey Bees (*Apis mellifera*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 1356–1363, 2019.

GÓMEZ, I. B. et al. Ion chromatography coupled to Q-Orbitrap for the analysis of formic and oxalic acid in beehive matrices: a field study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 7, p. 2419–2430, 2022.

GRACIA, M. J. et al. Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–14, 2017.

INFOAGRO Sistema Integrado de Informações Agropecuárias (2018). <<https://www.infoagro.sc.gov.br/index.php/safra/producao-vegetal>> Acesso em 06 de setembro de 2022

MORALES, M. M. et al. Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. **Science of the Total Environment**, v. 710, p. 136288, 2020.

MOREIRA, S. B. L. C. et al. Varroa destructor mite infestation in colonies of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) in the potiguar Semi-arid region, Northeastern Brazil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 1, p. 143, 2017.

MURCIA-MORALES, M. et al. Presence and distribution of pesticides in apicultural products: A critical appraisal. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 146, p. 116506, jan. 2022.

NOZAL, M. J. et al. An optimized extraction procedure for determining acaricide residues in foundation sheets of beeswax by using gas chromatography-mass spectrometry. **Agronomy**, v. 11, n. 4, 2021.

ORSO, D. et al. Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, p. 1638–1653, 2016.

SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 10, p. 899–904, 2013.

SCHAFASCHEK, T. P. et al. Desenvolvimento de colônias de *Apis mellifera* formadas com rainhas selecionadas para diferentes características. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 91–100, 2016.

TETTE, P. A. S. et al. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC – MS / MS. **Food Chemistry**, v. 211, p. 130–139, 2016.

UMSZA-GUEZ, M. A. et al. Herbicide determination in Brazilian propolis using high pressure liquid chromatography. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 31, n. 5, p. 507–517, 2021.