

Andressa Camargo Valse

**VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES
PIRROLIZIDÍNICOS EM AMOSTRAS DE PLANTAS *Senecio
brasiliensis*, PÓLEN E MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos. Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Carolina de Oliveira Costa

Florianópolis, SC

Setembro, 2017.

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

Valese, Andressa Camargo
VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM
AMOSTRAS DE PLANTAS *Senecio brasiliensis*, PÓLEN E
MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS /
Andressa Camargo Valese ; orientadora, Ana
Carolina de Oliveira Costa, 2017.
192 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Alcalóides
pirrolizidínicos. 3. LC-ESI-MS/MS. 4. Mel. 5.
Senecio brasiliensis. I. Oliveira Costa, Ana
Carolina de . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

**VALIDAÇÃO INTRALABORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM
AMOSTRAS DE PLANTAS *Senecio brasiliensis*, PÓLEN E MEL
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Por

Andressa Camargo Valese

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “**Doutorado** em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 22 de setembro de 2017



Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

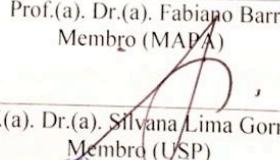
Banca Examinadora:



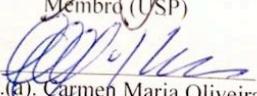
Prof.(a). Dr.(a). Ana Carolina de Oliveira Costa,
Orientador (UFSC)



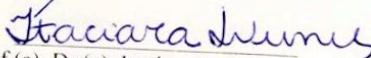
Prof.(a). Dr.(a). Fabiano Barreto,
Membro (MAPA)



Prof.(a). Dr.(a). Silvana Lima Gorniak,
Membro (USP)



Prof.(a). Dr.(a). Carmen Maria Oliveira Müller,
Membro (UFSC)



Prof.(a). Dr.(a). Itaciara Larroza Nunes,
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por ser meu pilar. Pelo amor incondicional, apoio, dedicação e motivação. Por sempre acreditar, dar forças e incentivar. Obrigada mãe, essa conquista é sua.

Ao meu irmão e pai, por todo amor e apoio.

A minha família, pelo amor incondicional.

A minha orientadora Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa, por estes sete anos de aprendizado, amizade, por todos conselhos, amparo, compreensão e confiança.

Ao Dr. Heitor Daguer, por toda generosidade, ensinamentos, oportunidades e principalmente pela amizade.

Ao Dr. Fabiano Barreto, pelos ensinamentos e confiança.

A todos os amigos do SLAV/SC que foram fundamentais para a execução desse trabalho e por proporcionar momentos incríveis. Em especial ao Luciano Molognoni, Leandro Ploêncio e Naielly Coelho.

A todos os amigos do Laboratório de Química de Alimentos, por toda amizade e incentivo. Em especial ao Luciano Gonzaga, por todo ensinamento e amizade.

A minha amiga-irmã Dra. Mônia Stremel Azevedo, por ser essa pessoa incrível. Pela cumplicidade, apoio e amizade nesses sete anos de pós graduação.

Aos meus amigos, que mesmo longe foram fundamentais e são a minha base. Em especial a Jamila, Joana, Maiara, Franciane, Daiane e Melina.

Obrigada!

A todos os apicultores, pelos ensinamentos, generosidade, amizade e interesse em participar desse trabalho. Em especial a Marileia, Jovets e Joel.

À professora Dra. Silvana Górnaiak pela doação dos padrões.

À professora Dra. Carmen Muller pelos ensinamentos em planejamentos fatoriais.

À EPAGRI pelas orientações em especial ao Saulo Poffo.

Ao MAPA pela oportunidade e apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

“A força não provém da capacidade física.

Provém de uma vontade indomável.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

VALESE, ANDRESSA CAMARGO. Validação intralaboratorial de método analítico para determinação de alcaloides pirrolizidínicos em amostras de plantas *Senecio brasiliensis*, pólen e mel utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. 192 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

Mel é um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, e, a diversidade da flora brasileira, associada à grande extensão territorial e a diversidade climática, possibilita ao país um grande potencial apícola, com colheitas durante todo o ano. As plantas mais procuradas pelos apicultores de Santa Catarina para a produção de mel são as de vegetação de matas nativas e do gênero *Senecio*, que é constituído por mais de 3000 espécies de ampla distribuição mundial e destas, sabe-se que cerca de 30 espécies são comprovadamente tóxicas devido à presença de alcaloides pirrolizidínicos, que são conhecidos por causarem intoxicações em animais herbívoros levando a perdas consideráveis na pecuária, sendo também constatada ocorrência de intoxicações em seres humanos causadas pelo consumo direto ou indireto de produtos de origem animal contaminados por estas espécies. Neste trabalho foi desenvolvido um método rápido para análise simultânea de monocrotalina, intermidina, licopsamina, retrorsina, retrorsina-N-óxido, senecionina, senecionina-N-óxido e equimidina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. O capítulo 2 se refere à validação intralaboratorial utilizando o protocolo de validação da 2002/CE/657 e manual da garantia da qualidade analítica do MAPA com um preparo de amostra simplificado aplicado em amostras comerciais de diferentes regiões do Brasil. Os parâmetros de desempenho analíticos de acordo com o protocolo adotados foram adequados para uso, em termos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, CC α , CC β , estabilidade e robustez. O método proposto possui preparo de amostra simples, rápido e eficiente e a aplicabilidade do método foi verificada em 92 amostras comerciais, mostrando bom desempenho analítico que o torna adequado para aplicação em laboratórios de alimentos para a análise de rotina. Das

amostras analisadas 99,1% foram detectados alcalóides pirrolizidínicos. No capítulo 3, um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken foi utilizado a fim de viabilizar um preparo de amostra ótimo e o método validado foi aplicado nas amostras de mel, pólen e plantas do gênero *Senecio brasiliensis* e de acordo com os resultados encontrados, foi evidenciado que as maiores concentrações encontradas no mel foram também encontradas nas amostras de pólen e planta da mesma região. Todas as amostras de mel analisadas estão acima dos valores recomendados de ingestão diária, assim como as amostras de pólen que chegam até 4000 vezes acima do valor recomendado.

Palavras-chave: Alcaloides pirrolizidínicos. LC-ESI-MS/MS. Mel. *Senecio brasiliensis*. Pólen

ABSTRACT

The diversity of Brazilian flora, associated to the great territorial extension and climatic diversity, allows the country a great apicultural potential, yielding harvests throughout the year. The plants most sought after by beekeepers in Santa Catarina for the production of honey are those of native vegetation and the genus *Senecio*, which is made up of more than 3000 species of worldwide distribution. About 30 *Senecio* species are proven to be toxic due to the presence of pyrrolizidine alkaloids, which are known to cause intoxication in herbivorous animals leading to considerable losses in livestock, and occurrence of intoxication in humans caused by the direct or indirect consumption of animal products contaminated by these compounds. In this work, a rapid method was developed for the simultaneous analysis of monocrotaline, intermidine, lyopsamine, retrorsin, retrorsin-N-oxide, senecionine, senecionine-N-oxide, and equimidine, using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Chapter 2 refers to the in-house validation using the protocols of Commission Decision 657/2002/CE and the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) quality assurance manual. A simplified sample preparation was applied to commercial samples from different regions of Brazil. The analytical performance parameters were suitable for use in terms of selectivity, linearity, precision, accuracy, $CC\alpha$, $CC\beta$, stability, and robustness. This simple, fast, and efficient sample preparation method was checked in 92 commercial samples, showing good analytical performance. It is suitable for routine analysis in food laboratories. Pyrrolizidine alkaloids were detected in 99.1% of the analyzed samples. In Chapter 3, a Box-Behnken-type factorial design was used in order to make an optimal sample preparation feasible and the validated method was applied to the samples of honey, pollen and plants of the genus *Senecio brasiliensis*. According to the results found, it has been evidenced that the highest concentrations found in honey were also found in pollen and plant samples from the same region. All analyzed honey samples were above the recommended values of daily intake, as well as pollen samples that surpassed in 4000 times the recommended value.

Keywords: pyrrolizidine alkaloids. LC-ESI-MS/MS. Honey. *Senecio brasiliensis*. Pollen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1. A. Pólen. B. Abelhas transportando o pólen.....	33
Figura 1. 2. Distribuição de <i>Senecio brasiliensis</i> no Brasil.	37
Figura 1. 3. Planta de <i>Senecio brasiliensis</i>	38
Figura 1. 4. Estrutura básica de um PA na sua forma de base livre e de N-óxido.	40
Figura 1. 5. A. Principais tipos de estruturas de PAs das plantas. B. Tipos de PAs e N-óxidos da planta Senecio.	41
Figura 1. 6. Características estruturais essenciais para a toxicidade dos alcaloides pirrolizidínicos: 1) anel 3-pirrolina; 2) grupamentos hidroxilas ligados ao anel pirrolina; 3) grupamentos esterificados; e 4) cadeia ramificada no resíduo ácido.	42
Figura 1. 7. Rota metabólica responsável pela toxicidade dos PAs.....	43
Figura 2. 1. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da monocrotalina em ESI positivo.....	95
Figura 2. 2. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da intermidina em ESI positivo.	95
Figura 2. 3. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da licopsamina em ESI positivo.	96
Figura 2. 4. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da retrorsina em ESI positivo.	96
Figura 2. 5. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da retrorsina-N-óxido em ESI positivo.....	97

Figura 2. 6. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da senecionina em ESI positivo.....	97
Figura 2. 7. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da senecionina-N-óxido em ESI positivo.	98
Figura 2. 8. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da equimidina em ESI positivo.....	98
Figura 2. 9. Cromatograma dos oito alcalóides pirrolizidínicos.....	101
Figura 2. 10. Cromatograma de íons selecionados dos oito alcaloides pirrolizidínicos. A. Monocrotalina. B. Licopsamina+ Intermidina. C. Retrorsina. D. Retrorsina-N-óxido. E. Senecionina. F. Senecionina-N-óxido. G. Equimidina.....	102
Figura 2. 11. Cromatograma de íons selecionados dos alcalóides pirrolizidínicos. A. Monocrotalina. B. Licopsamina + Intermidina. C. Retrorsina. D. Retrorsina-N-óxido. E. Senecionina. F. Senecionina-N-óxido. G. Equimidina.....	107
Figura 2. 12. Gráficos dos resíduos da regressão das curvas de APs em solvente. A. Equimidina. B. Licopsamina + Intermedina. C. Retrorsina. D. Retrorsina-N-óxido. E. Senecionina. F. Senecinina-N-óxido. G. Monocrotalina.....	109
Figura 2. 13. Estudo de estabilidade em extrato de matriz branca fortificada no MRPL. A. Temperatura ambiente. B. Temperatura de 4°C. C. Temperatura de -20°C.	118
Figura 2. 14. Cromatograma de monitoramento de múltiplas reações dos oito alcaloides pirrolizidínicos de quatro amostras de méis comerciais diferentes. A. 1. MCT. 2. LYC+INT. 3. SEN. 4. SEN-N. B. 1. MCT. 2. LYC+INT. 3. RET. 4. RET-N. 5. SEN. 6. SEN-N. C. 1. LYC+INT. .	121
Figura 3. 1. Diagrama de Pareto para a concentração dos PAs em planta.	156

Figura 3. 2. Diagrama de Pareto para a concentração dos PAs em pólen.	156
Figura 3. 3. Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em planta.....	161
Figura 3. 4. Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em pólen.....	163
Figura 3. 5. Colmeia localizada na região de Urupema.	173

LISTA DE TABELA

Tabela 1. 1. Requisitos de qualidade físico-química para os méis de abelhas <i>Apis mellifera</i>	27
Tabela 1. 2. Requisitos de qualidade físico-química para os pólen.....	34
Tabela 1. 3. Métodos para determinação de PAs em mel e pólen.	47
Tabela 1. 4. Quantidade de PAs e seus N-óxidos sugeridas em diversos países.	52
Tabela 2. 1. Energias otimizadas e os fragmentos majoritários para análise dos alcalóides pirrolizidínicos (PAs) em mel.	80
Tabela 2. 2. Condições de FIA para os alcaloides pirrolizidínicos.	81
Tabela 2. 3. Composição do gradiente utilizado para a separação cromatográfica de alcaloides pirrolizidínicos (PAs).	83
Tabela 2. 4. Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez pelo teste de Younden para o método proposto.	89
Tabela 2. 5. Matriz de combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.	90
Tabela 2. 6. Precisão das razões dos íons de quantificação e confirmação dos alcaloides pirrolizidínicos (PAs).	108
Tabela 2. 7. Valores da soma dos erros relativos (%RE) para cada fator de ponderação (w_i) obtidos no ensaio de homocedasticidade ($n=30$)..	111
Tabela 2. 8. Parâmetros da curva de calibração e efeito de matriz.	112
Tabela 2. 9. Parâmetros de validação do método otimizado para os oito PAs por LC- MS/MS.	114

Tabela 2. 10. Limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção $CC\beta$ para os alcaloides pirrolizidínicos	116
Tabela 2. 11. Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação do método para os alcaloides pirrolizidínicos.....	117
Tabela 2. 12. Concentrações máximas, mínima, média, mediana e número de amostras de mel positivas para alcaloides pirrolizidínicos.	122
Tabela 3. 1. Composição do gradiente de eluição utilizado para a separação cromatográfica de alcalóides pirrolizidínicos (PAs).....	142
Tabela 3. 2. Localização geográfica dos municípios de origem das amostras.	143
Tabela 3. 3. Planejamento fatorial Box-Behnken do preparo das amostras de plantas e pólen para análise de alcaloides pirrolizidínicos por LC-MS/MS.	145
Tabela 3. 4. Fatores, níveis experimentais e respostas estabelecidas para o planejamento Box-Behnken.....	151
Tabela 3. 5. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2^3) da matriz <i>Senecio Brasiliensis</i>	152
Tabela 3. 6. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2^3) da matriz pólen.....	153
Tabela 3. 7. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2^3) da matriz <i>Senecio Brasiliensis</i>	154
Tabela 3. 8. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2^3) da matriz pólen.....	155
Tabela 3. 9. Análise de variância – Planejamento Box-Behnken 2^3 para matriz de planta.....	159

Tabela 3. 10. Análise de variância – Planejamento Box-Behnken 2 ³ para matriz de pólen.....	159
Tabela 3. 11. Frequências totais, incluindo tipos poliníferos, nectaríferos e anemófilos (origem fitogeográfica das amostras) das amostras de méis de Santa Catarina, Brasil.....	165
Tabela 3. 12. Concentrações de senecionina, senecionina-N-óxido, retrorsina-N-óxido em amostras de mel, pólen e	169
Tabela 3. 13. Concentração total de alcaloides pirrolizidínicos em amostras de mel, pólen e plantas e análise palinológica.	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HMF - 5-hidroximetilfurfural

ACN - acetonitrila

ANOVA - análise de variância

CAD - gás de colisão (CAD, do inglês *Collision gas*)

CE - energia de colisão (CE, do inglês *Collision Energy*)

CONTAM - Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM, do inglês *Contaminants in the Food Chain*)

CUR - gás de interface (CUR, do inglês *curtain gas*)

CXP - potencial de saída da cela de colisão (CXP, do inglês *Collision Cell Exit Potential*)

DOV - doença veno-oclusiva hepática (DOV, do inglês *veno-occlusive disease*)

DP - potencial de desagregação (DP, do inglês *Declustering Potential*)

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*)

EP - potencial de entrada na cela de colisão (EP, do inglês *Entrance Potential*)

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FIA – análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*)

GC-MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *gas chromatography- mass spectrometry*)

GS1 - gás nebulizante

GS2 - gás secante

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

IS - voltagem aplicada ao capilar (IS, do inglês *Ion Spray voltage*)

LANAGRO-RS - Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul

LC-ESI-MS/MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada espectrometria de massas em tandem com fonte de ionização por electrospray (do inglês, *liquid chromatography – electrospray with mass spectrometry in tandem*)

LMR - limite máximo de resíduo (LMR, do inglês *maximum residue limits*)

m/z – relação massa/carga

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MCA - aquisição de espectros (MCA, do inglês *Multiple Channel Acquisition*)

ME - efeito de matriz (do inglês *matrix effect*)

MeOH - metanol

MRM - monitoramento de reações múltiplas (do inglês, *multiple reaction monitoring*)

MS/MS - espectrometria de massa em tandem (do inglês, *tandem mass spectrometry*)

PAs- alcalóides pirrolizidínicos (PAs, do inglês *pyrrolizidine alkaloid*),

PCA – análise de componentes principais (do inglês, *principal analysis componente*)

PE - eficiência de extração (PE, do inglês *process efficiency*)

RE - recuperação (RE, do inglês *recovery*)

SLAV-SC - Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina

SPE - extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*)

TEM - temperatura da fonte (TEM, do inglês *temperature*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	21
1.1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1.2.1.....	MEL 24
1.2.2. PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO MEL	27
1.2.2.1. Umidade.....	28
1.2.2.2. Minerais	28
1.2.2.3. 5-hidroxi metilfurfural	29
1.2.2.4. Acidez livre.....	29
1.2.2.5. Sólidos insolúveis	29
1.2.2.6. Carboidratos.....	30
1.2.2.7. Índice de diastase	30
1.2.2.8. Condutividade elétrica	31
1.2.3. PÓLEN.....	31
1.2.4. PLANTAS APÍCOLAS	34
1.2.4.1. Planta gênero Senecio	36
1.2.5. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS	39
1.2.5.1. Toxicidade em seres humanos	44

1.2.5.2. Alcaloides pirrolizidínicos em mel e pólen	45
1.2.5.3. Regulamentação e avaliação de riscos.....	51
1.3. OBJETIVO GERAL.....	53
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM MEL.....	71
2.1 INTRODUÇÃO	71
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	77
2.2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	77
2.2.2 SOLUÇÕES.....	77
2.2.3 INSTRUMENTAÇÃO	78
2.2.3.1 Otimização do sistema de detecção de massas.....	79
2.2.3.2 Otimização dos parâmetros da fonte de ionização	81
2.2.3.3 Otimização das condições cromatográficas.....	82
2.2.3.3.1 <i>Seleção da coluna cromatográfica</i>	82
2.2.4 Amostras e preparo de amostras	83
2.2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	84
2.2.5.1. Seletividade/ especificidade	85
2.2.5.2. Linearidade e efeito de matriz	85
2.2.5.3. Exatidão e precisão	87

2.2.5.4. Limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β).....	87
2.2.5.5. Robustez	88
4.2.5.6. Teste de estabilidade.....	90
4.2.5.7. Incerteza de medição (MU)	91
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
2.3.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE MASSAS	93
2.3.2 OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	100
2.3.3. PREPARO DA AMOSTRA	103
2.3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	105
2.3.4.1. Seletividade/especificidade.....	105
2.3.4.2. Linearidade e efeito de matriz	108
2.3.4.3. Precisão e exatidão	113
2.3.4.4. Limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β).....	115
2.3.4.5. Robustez	116
2.3.4.6. Estabilidade.....	117
2.3.4.7. Incerteza de medição	119
2.3.4.8. Aplicabilidade do método.....	119
2.4. CONCLUSÃO	123
2.5. REFERÊNCIAS.....	125

CAPITULO 3: DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM PÓLEN, PLANTAS <i>SENECIO BRASILIENSIS</i> E MEL POR LC-MS/MS	135
3.1 INTRODUÇÃO	135
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	139
3.2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	139
3.2.2 SOLUÇÕES.....	139
3.2.3 INSTRUMENTAÇÃO	140
3.2.4. SEPARAÇÃO POR LC-MS/MS.....	141
3.2.5. AMOSTRAS.....	142
3.2.5.1. Amostras de plantas.....	142
3.2.5.1.1. <i>Identificação das plantas</i>	143
3.2.5.2. Amostras de mel	144
3.2.5.3 Amostras de pólen	144
3.2.6 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	144
3.2.6.1 Preparo das amostras de plantas e pólen	144
3.2.6.2 Preparo de amostras de mel.....	146
3.2.7 ANÁLISE PALINOLÓGICA	146
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	149
3.3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL	149
3.3.2 Análise das amostras.....	163
3.4 CONCLUSÃO	175

3.5 REFERÊNCIAS	177
CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
APÊNDICE A	185

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Segundo a legislação brasileira, mel é um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores que ficam sobre as plantas, em que as abelhas recolhem, processam com suas enzimas digestivas, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

O conhecimento da flora apícola de uma região é importante por identificar espécies vegetais que contribuem na formação do mel produzido em um determinado local, como também é necessário na preservação e multiplicação destas plantas de potencial melífero auxiliando estabelecer uma apicultura sustentável (MORETI et al., 1998; SANTOS, KILL e ARAÚJO, 2006; MENDONÇA et al., 2008).

A diversidade da flora brasileira, associada à grande extensão territorial e à diversidade climática, possibilita ao país um grande potencial apícola, com colheitas durante todo o ano, diferenciando o Brasil de outros países produtores (MENDONÇA et al., 2008).

As plantas mais procuradas pelos apicultores de Santa Catarina para a produção de mel são as de vegetação de matas nativas incluindo as do gênero *Senecio* (tribo *Senecioneae*, *Asteraceae*), que é constituído por mais de 3000 espécies de ampla distribuição no estado de Santa Catarina e destas, sabe-se que cerca de 30 espécies são comprovadamente tóxicas para os animais domésticos e para o homem (STEGELMEIER, 2011; TOKARNIA; DÖBEREINER, 2000).

A espécie mais frequente deste gênero no Brasil é a *Senecio brasiliensis*, conhecido popularmente como “flor das almas”, “berneira”, “tasneirinha” e principalmente “maria-mole” (RIET-CORREA et al., 1993; KARAM, et al., 2002; GRECCO et al., 2010) e apresenta distribuição geográfica principalmente na região Sul, podendo ser observada também em pequenas áreas altas e mais frias da região Sudeste (TOKARNIA, DOBEREINER e PEIXOTO, 2000; PILATI; BARROS, 2007). Estas plantas apresentam toxicidade devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos (PAs, do inglês *pyrrolizidine alkaloid*), que são conhecidos por causarem intoxicações em animais herbívoros levando a perdas consideráveis na pecuária, sendo também constatada ocorrência de intoxicações em seres humanos causadas pelo consumo direto ou indireto de produtos de origem animal contaminados por estas espécies. (TOKARNIA, DOBEREINER e PEIXOTO, 2000; SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006).

Os alcalóides pirrolizidínicos são toxinas naturais amplamente distribuídas na natureza e que afetam os animais e seres humanos por serem teratogênicos, pneumotóxico, hepatotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos. Em um relatório publicado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*) sobre Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM, do inglês *The Panel on Contaminants in the Food Chain*), foi relatado que estas substâncias apresentam um risco potencial em populações onde o consumo de mel é elevado (EFSA, 2011).

A presença de PAs em méis se dá através do néctar, do pólen e, estudos mostram que estes podem ser lixiviados do pólen para o mel (KEMPF et al., 2010). É importante salientar que o consumo de mel não

se restringe apenas ao produto em si, mas pode ser ingerido de várias formas, como em produtos de panificação, como biscoitos, bolos, barras de cereais e suplementos alimentares.

Diante do exposto se torna cada vez mais necessário identificar quais PAs possuem maior relevância (ocorrência e toxicidade) para a saúde, e em que concentrações estão presentes nas matrizes e avaliar a veiculação dos mesmos em méis, e com isso delinear um nível de ação regulatória. A elucidação dessas relações pode ser incluída na apicultura, como medida preventiva para reduzir a contaminação do mel com uma cuidadosa seleção dos locais para o posicionamento das colmeias (GRIFFIN et. al, 2013; CODEX, 2014).

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. MEL

O mel é constituído principalmente por açúcares e água, com o predomínio dos monossacarídeos glicose e frutose, representando em torno de 85 a 95% dos carboidratos (em base seca) presentes no mel. Os demais açúcares são representados pelos dissacarídeos sacarose e maltose, trissacarídeos melezitose e outros oligossacarídeos, incluindo as dextrinas (CODEX STANDARD FOR HONEY, 2001). Além dos carboidratos, o mel é constituído por outras substâncias, como minerais, proteínas, enzimas (invertase, glicose oxidase, catalase, fosfatase), aminoácidos, vitaminas (ácido ascórbico, niacina, piridoxina), ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, flavonoides, compostos voláteis, carotenoides, produtos da reação de Maillard, cera, grãos de pólen e, estudos retratam a presença de alcalóides pirrolizidínicos (WHITE, 1979; GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002; FALLICO et al., 2004; BERETTA et al., 2005; BLASA et al., 2006).

O uso do mel na alimentação humana no Brasil ainda é muito limitado no consumo direto, porem é muito utilizado na indústria alimentícia, como ingrediente em alimentos (biscoitos, bolos, sorvetes), condimentos, temperos para saladas, laticínios (SATO; MIYATA, 2000; HOSNY; EL-GHANI; NADIR, 2009). É um alimento rico em energia e de alta qualidade, sendo utilizado na medicina popular como um eficiente repositores de glicose e por suas propriedades terapêuticas (PEREIRA, et al., 2003; MULLER, et al, 2012). (

A classificação do mel pode ser feita quanto à sua origem em mel floral ou mel de melato. O mel floral é obtido do néctar das flores, e

pode ser classificado em mel unifloral ou monofloral, quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias; ou mel multifloral ou polifloral, obtido a partir de diferentes origens florais. O mel de melato é formado principalmente a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (BRASIL, 2000).

A qualidade e a composição do mel estão relacionadas diretamente com sua origem floral e geográfica, mas também são afetadas pelas condições climáticas, pelo processamento, manipulação, embalagem e estocagem (ANKLAM, 1998; BERETTA et al., 2005; TURHAN et al., 2008). E estas, devem atender aos inúmeros critérios de qualidade e certificações, antes de sua comercialização e exportação (SILVA et al., 2008).

As legislações são elaboradas considerando a necessidade de padronizar o processamento dos produtos, visando assegurar condições para comercialização dos mesmos. A autenticidade do mel é atestada internacionalmente pelo *Codex Alimentarius*, União Européia e, no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa de nº11, de 20 de outubro de 2000 é responsável por fiscalizar e estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que o mel deve apresentar (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001; EUROPEAN COMMUNITIES, 2001).

As análises físico-químicas indicadas pela legislação brasileira para o controle de qualidade do mel puro de *Apis mellifera* são: quanto a maturidade (açúcares redutores, umidade, sacarose aparente), pureza

(sólidos insolúveis em água, minerais e pólen) e deterioração (acidez livre, índice de diastase e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e se diferencia das normas internacionais por apresentar limites mais altos para acidez, 5-HMF e açúcares e não inclui o parâmetro de condutividade elétrica, que está presente na legislação internacional e ausente na legislação brasileira. Além do parâmetro de porcentagem de minerais que a legislação internacional não controla. Os dados estão apresentados na Tabela 1.1 (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001; EUROPEAN COMMUNITIES, 2001).

Tabela 1. 1. Requisitos de qualidade físico-química para os méis de abelhas *Apis mellifera*.

PARÂMETROS	BRASIL	CODEX	UNIÃO EUROPEIA
Umidade (%)	Máximo 20	Máximo 20	Máximo 20
Minerais (%)		-	-
Mel Floral	Máximo 0,6	-	-
Mel de melato	Máximo 1,2	-	-
5-HMF (mg kg ⁻¹)	Máximo 60	Máximo 40	Máximo 40
Acidez livre (mEq kg ⁻¹)	Máximo 40	Máximo 50	Máximo 50
Sólidos insolúveis (%)	Máximo 0,1	Máximo 0,1	Máximo 0,1
Açúcares redutores (%)			
Mel Floral	Mínimo 65	Mínimo 60	Mínimo 60
Mel de melato	Mínimo 60	Mínimo 45	Mínimo 45
Sacarose aparente (%)			
Mel Floral	Máximo 6	Máximo 5	Máximo 5
Mel de melato	Máximo 15	Máximo 15	Máximo 15
Índice de Diastase (%)			
Na escala Gothe	Mínimo 8	Mínimo 8	Mínimo 8
Se o 5-HMF for < 15 mg kg ⁻¹	Mínimo 3	Mínimo 3	Mínimo 3
Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	-	Máximo 0,8	Máximo 0,8

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001; EUROPEAN COMMUNITIES, 2001.

1.2.2. PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO MEL

As análises físico-químicas contribuem para a fiscalização dos méis comercializados, perante aos padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelos órgãos regulamentadores, que tem como objetivo proteger o consumidor e detectar adulterações ou fraudes (MARCHINI, 2000).

1.2.2.1. Umidade

A água constitui o segundo componente majoritário do mel, variando de 15 a 21%, dependendo do clima, origem floral, nível de maturidade e armazenamento (GALLINA; STOCCO; MUTINELLI, 2010). A umidade é um dos parâmetros físico-químicos mais importantes, pois influencia na viscosidade, peso, maturidade, cristalização, cor, sabor e conservação (ESCUREDO et al., 2013). Alguns micro-organismos osmofílicos presentes nas abelhas, néctar e solo ou veiculados durante o manejo, multiplicam-se com o aumento da umidade do mel, favorecendo o processo de fermentação dos açúcares presentes (TORNUK et al., 2013).

1.2.2.2. Minerais

O teor de cinzas avalia a concentração de minerais presentes no mel e é um indicativo da origem geográfica, pois depende, dentre outros fatores, do tipo de solo, clima, origem botânica e da poluição ambiental (KARABAGIAS et al., 2014). O mel contém a maioria dos elementos químicos essenciais para o organismo humano, mesmo em baixas concentrações e os minerais são considerados importantes para a alimentação por se apresentarem na forma livre (GOMES et al., 2010). Os principais minerais encontrados no mel são o potássio, sódio, cálcio, manganês e magnésio (RIZELIO et al., 2012c)

Os minerais influenciam na cor e no sabor do mel, quanto maior for a concentração, mais escuro e mais intenso é o sabor do mesmo (GOMES et al., 2010; ESCUREDO et al., 2013)

1.2.2.3. 5-hidroximetilfurfural

O 5-hidroximetilfurfural é utilizado como indicador de deterioração ou adulteração do mel, e é normalmente formado pela decomposição dos monossacarídeos ou pela reação de Maillard, quando o mel é superaquecido ou armazenado durante muito tempo. O 5-HMF também pode se formar em temperaturas baixas (em condições ácidas) por desidratação de hexoses (GOMES et al., 2010; TORNUK et al., 2013).

1.2.2.4. Acidez livre

O mel contém ácidos que contribuem para a sua estabilidade, principalmente por inibir o desenvolvimento de micro-organismos. E a origem da acidez, deve-se à variação dos ácidos orgânicos, causada pelas diferentes fontes de néctar, origem geográfica, época de colheita e pela ação da enzima glicose-oxidase sobre a glicose que origina o ácido glucônico, que é majoritário no mel. Valores elevados de acidez podem indicar a formação de ácidos orgânicos a partir da fermentação de açúcares (SILVA et al., 2006; GOMES et al., 2010)

1.2.2.5. Sólidos insolúveis

Os sólidos insolúveis correspondem aos resíduos provenientes da cera, patas e asas das abelhas, além de outros elementos inerentes do mel ou do processamento que sofreu. O método determina o teor de sólidos insolúveis em mel por gravidade e permite detectar as impurezas presentes no mel, sendo uma importante medida de controle de higiene e contaminação do produto (SILVA et al., 2006).

1.2.2.6. Carboidratos

Os açúcares são componentes majoritários do mel, e são responsáveis por conferir doçura, poder higroscópico e conservação do produto, assim como a cor e o sabor do mel. Os açúcares redutores (frutose e glicose) representam de 65 a 80% de sólidos solúveis, e o mel com uma baixa relação de glicose/água ou concentrações elevadas de frutose não cristalizam com facilidade, devido a uma maior solubilidade da frutose com a água. E esta proporção depende diretamente da fonte de néctar em que o mel foi colhido e em geral, a composição de açúcares do mel é afetada pelos tipos de flores, regiões e condições climáticas (ESCUREDO et al., 2014; TORNUK et al., 2013).

Os demais açúcares dos méis são representados pelos dissacarídeos (sacarose e maltose) e trissacarídeos (melezitose). A sacarose pode representar até 3 % dos carboidratos e um valor muito a cima deste, indica um mel não maduro ou adulterado pela adição de xaropes. O teor de sacarose é um parâmetro de maturidade do mel, pois é um açúcar não redutor, passível de hidrólise pela presença de ácidos ou enzimas, que resultam em frutose e glicose e, elevada concentração de sacarose indica muitas vezes a adição indevida de adoçantes comerciais no mel, colheita precoce ou alimentação artificial das abelhas. (ESCUREDO et al., 2013; GOMES et al., 2010; TORNUK et al., 2013).

1.2.2.7. Índice de diastase

A diastase (α - e β - amilases) são enzimas naturalmente presentes no mel e seu conteúdo depende da origem floral e geográfica. Ela tem como função hidrolisar a molécula de amido, resultando em

uma mistura de maltose e maltotriose. São muito sensíveis ao calor, podendo assim indicar uma má conservação do produto ou um superaquecimento. A atividade diastásica pode ser reduzida ao longo do armazenamento ou quando o produto é submetido ao aquecimento acima de 60 °C (WHITE JUNIOR, 1992; GOMES et al., 2010; YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013).

1.2.2.8. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica é um indicador de adulteração de mel podendo ser utilizado para distinguir méis florais de méis de melato (KARABAGIAS et al., 2014). Esse parâmetro está relacionado com o teor mineral e com a acidez, revelando a presença de íons, ácidos orgânicos e proteínas (YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013). Este parâmetro foi recentemente incluído nas normas internacionais do *Codex Alimentarius* substituindo a determinação do teor de cinzas (CODEX STAN 12, 2001).

1.2.3. PÓLEN

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas localizadas nas anteras dos estames das angiospermas e que consistem nas células reprodutivas masculinas das plantas. O pólen é o elemento fecundante das plantas com flores, responsável pela formação de frutos e sementes (SCHIMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996), possuem diâmetro entre 6 e 200 µm, formas e cores diversas, variando entre o branco, amarelo, laranja, vermelho e tons mais escuros, assim como a composição química que também é bastante variada, dependendo da sua

origem botânica, condições climáticas e tipo de solo. O pólen de certas flores pode ser tóxico por conter compostos alcalóides pirrolizidínicos e estes não devem ser ingeridos. (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005; COLEGATE, BOPRE e EDGAR, 2005; COLEGATE et al., 2008;).

O pólen pode ser transportado pelo vento, água, pássaros, morcegos ou por insetos, dentre os quais estão as abelhas, que recolhem e aglutinam os grãos em pequenas bolas, misturando a secreções salivares com uma pequena quantidade de néctar. As abelhas transportam o pólen em uma estrutura presente nas suas patas traseiras, chamada corbícula, que são depositados nos alvéolos das colméias, conforme ilustra a Figura 1.1 (VILLANUEVA et al., 2002).

Figura 1. 1. A. Pólen. B. Abelhas transportando o pólen.



Fonte: acervo pessoal Mariléia Côrrea da Silva.

Para muitos insetos, e especialmente para as abelhas, o pólen é a principal fonte de alimento não líquido, sendo consumido por elas na fase adulta e fornecido às larvas de operárias e zangões em crescimento. Além disso, o pólen contém a maioria dos nutrientes essenciais para a produção da geleia real, que é a secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas durante os primeiros quinze dias das abelhas jovens. Este alimento é empregado pelas abelhas para alimentar suas larvas por aproximadamente três dias e durante toda a vida da rainha. Deste modo, o pólen é essencial para o crescimento normal e o desenvolvimento de todos os indivíduos de uma colônia de abelhas (MORETI et al., 2002; BARRETO et al., 2012).

A Instrução Normativa, número 3 de 19 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define o pólen apícola como sendo o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuado pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia (BRASIL, 2001).

A regulamentação brasileira sobre a qualidade do pólen apícola é controlada pelo MAPA, que preconiza que para o pólen ser comercializado no Brasil, deve atender aos seguintes parâmetros físico-químicos, demonstrados na Tabela 1.2. (BRASIL, 2001).

Tabela 1. 2. Requisitos de qualidade físico-química para os pólenes.

Parâmetros	Limites
Umidade (%)	
pólen fresco	30
pólen seco	4
Cinzas (%)	4
Lipídeos (%)	1,8
Proteínas (%)	8
Açúcares totais (%)	14,5 - 55,0
Fibra bruta (%)	2
pH	4 a 6
Acidez livre (mEqg kg ⁻¹)	300

Fonte: Brasil, 2001.

Como o pólen apresenta em sua composição alto teor de umidade, o que pode provocar uma rápida fermentação e deterioração, o processo de desidratação é fundamental. (BARRETO et al., 2012).

1.2.4. PLANTAS APÍCOLAS

O conhecimento da flora apícola de uma região é importante por identificar espécies vegetais que contribuem na formação do mel produzido em um determinado local, como também é necessário na preservação e multiplicação destas plantas para estabelecer uma apicultura sustentável, quer pela participação direta da abelha por meio

da polinização como ação do homem procurando melhorar as condições apícolas (MORETI et al., 1998; SANTOS, KILL e ARAÚJO, 2006; MENDONÇA et al., 2008).

As abelhas realizam visita às flores para suprirem suas necessidades nutricionais e o pólen e o néctar encontrados, constituem basicamente sua única fonte de alimento. O pólen é fonte concentrada de proteína e o néctar importante fornecedor de energia. A disponibilidade de alimento afeta diretamente o peso das larvas, pupas e adultos recém-emergidos, portanto, é de extrema importância o conhecimento das floradas e épocas de suas ocorrências por parte do apicultor, para aumentar a vida e a produção da colônia (ALMEIDA et al., 2003).

As plantas apícolas podem ser divididas em três grupos: plantas nectaríferas, que fornecem exclusivamente néctar; plantas poliníferas, que fornecem exclusivamente pólen e as plantas nectaríferas-poliníferas, que fornecem tanto néctar quanto pólen as abelhas (ALMEIDA et al., 2003).

A diversidade da flora brasileira, associada à grande extensão territorial e a diversidade climática, possibilita ao país um grande potencial apícola, com colheitas durante todo o ano, diferenciando o Brasil de outros países produtores (MENDONÇA et al., 2008).

As plantas mais procuradas pelos apicultores de Santa Catarina para a produção de mel são as de vegetação de matas nativas, da tribo Asteraceae (*Baccharis*, *Vernonia*, *Senecio brasiliensis*); plantas da família das Mirtaceae (*Myrcia*); plantas da família das Fabaceae (*Mimosa scabrella*, *Crotalia*, *Glycine*, *Phaseolus*), Anacardiaceae (*Schinus*) e Aquifoliaceae (*Ilex*); pomares de frutíferas de clima

temperado da família Rosaceae (*Malus*); plantas da fruticultura tropical (SALOMÉ, 2002).

1.2.4.1. Planta gênero Senecio

O gênero Senecio (tribo Senecioneae, Asteraceae) é constituído por mais de 3000 espécies de ampla distribuição mundial, com exceção do continente Antártico, Ilhas do Pacífico e na região Amazônica, sendo que a maior concentração de espécies está localizada nas regiões montanhosas da América, África e Ásia. Destas, sabe-se que cerca de 30 espécies são comprovadamente tóxicas para os animais domésticos e para o homem (STEGELMEIER, 2011; TOKARNIA; DÖBEREINER, 2000). No Brasil, foram catalogadas cerca de 85 espécies pertencentes ao gênero, dentre as quais 33 são nativas da região sul (SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006).

A espécie mais frequente no Brasil é o *Senecio brasiliensis*, conhecido popularmente como “flor das almas”, “berneira”, “tasneirinha” e principalmente “maria-mole” (RIET-CORREA et al., 1993; KARAM, et al., 2002; GRECCO et al., 2010) e apresenta distribuição geográfica principalmente na região sul, podendo ser observada também em pequenas áreas altas e mais frias da região Sudeste (Figura 1.2) e tem como *habitat* os campos nativos e cultivados (TOKARNIA, DOBEREINER e PEIXOTO, 2000; PILATI; BARROS, 2007).

Figura 1. 2. Distribuição de *Senecio brasiliensis* no Brasil.



Fonte: TOKARNIA, DOBEREINER e PEIXOTO, 2000.

Senecio brasiliensis é uma planta de ciclo de vida longo, de até 2 m de altura, com caule maleável, geralmente ramoso na parte superior; folhas alternadas, pecioladas, com a face inferior "branco-pubescente" de 10 – 20 cm de comprimento e com flores de coloração amarela, conforme ilustrado na Figura 1.3 (LORENZI, 1994; SANDINI, BERTO e SPINOSA, 2013).

Figura 1. 3. Planta de *Senecio brasiliensis*.



Fonte: acervo pessoal Mariléia Côrrea da Silva.

Esta planta apresenta facilidade de propagação, principalmente na presença de umidade e luz para a brotação, o que favorece sua ingestão pelos animais em qualquer período do ano (KARAM et al., 2002). No Estado do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, essa ingestão ocorre principalmente entre os meses de maio a agosto, período no qual Senecioneae está em brotação e quando diminui muito a disponibilidade de outras pastagens (MÉNDEZ; RIETCORREA, 2008; SANDINI, BERTO e SPINOSA, 2013). Há relatos também que bovinos muito famintos também ingerem a planta adulta. Uma vez que, as plantas desta família, murchas e secas são muito mais aceitáveis para alguns animais, pois o sabor amargo associado a planta diminui ao longo do tempo, depois de roçadas as mesmas não devem ser deixadas no pasto onde o gado está presente (TOKARNIA, DOBEREINER e PEIXOTO, 2000; CODEX, 2013).

A toxicidade das espécies de *Senecio* deve-se à presença de alcaloides pirrolizidínicos, que também são encontrados em plantas tóxicas dos gêneros *Crotalaria* (Leguminosae), *Erechtites* (Compositae), *Heliotropium*, *Echium*, *Trichodesma*, *Cynoglossum* e *Amsinckia* (Borraginaceae). Estes alcaloides são conhecidos por causarem intoxicações em animais herbívoros, como bovinos, ovinos, suínos e equinos, levando a perdas consideráveis na pecuária e também há relatos da ocorrência de intoxicações em seres humanos devido ao consumo direto ou indireto de produtos de origem animal contaminados por estas espécies. (TOKARNIA, DOBEREINER e PEIXOTO, 2000; SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006; AVULA et al., 2015).

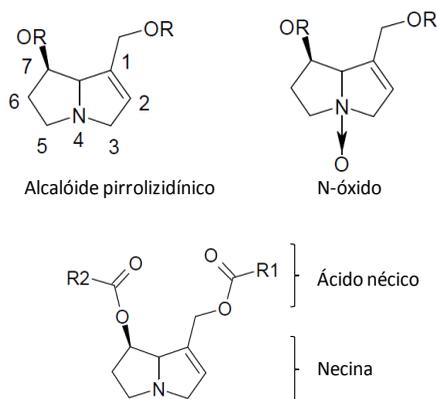
1.2.5. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Os alcalóides de pirrolizidina ou pirrolizidínicos são um grupo de centenas de compostos de defesa da planta, catalogados em milhares de espécies e abrangem cerca de 400 estruturas isoladas de mais de 560 espécies de plantas e têm sido associados como agentes hepatotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (CHEN, MEI e FU, 2010; MEI et al., 2010; KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010; STEGELMEIER, 2011). Possuem sabor amargo, fisiológico e farmacologicamente ativos, funcionam como uma defesa química das plantas contra herbívoros e acometem humanos e animais, principalmente no fígado e também podem causar lesões no rim e pulmões (TOKARNIA, DOBEREINER e PEIXOTO, 2000; WIEDENFELD e EDGAR, 2011).

Caracterizam-se quimicamente por serem ésteres de amino-álcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos), além de *N*-óxidos, que podem ocorrer na forma de

monoésteres, diésteres acíclicos e diésteres cíclicos, em ordem crescente de toxicidade. As necinas caracterizam-se por apresentar um sistema bicíclico com um nitrogênio terciário como “cabeça de ponte”, um grupamento hidroximetila em C1 e uma hidroxila em C7 como ilustrado na Figura 1.4, podendo ser classificadas como saturadas ou insaturadas, sendo as necinas insaturadas subdivididas em retronecina, heliotridina, otonecina e platinecina, sendo esta última atóxica (DA SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006; ROSEMANN, 2007; MICHEL; RAEZKE, 2009; SANDINI, BERTO e SPINOSA, 2013).

Figura 1. 4. Estrutura básica de um PA na sua forma de base livre e de N-óxido.

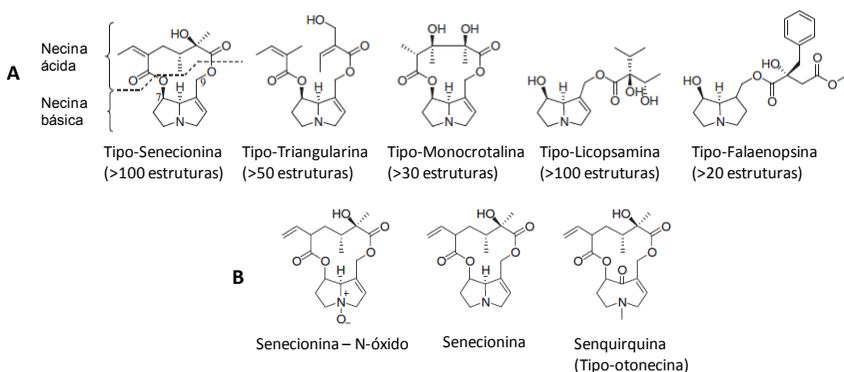


Fonte: Adaptado de MICHEL; RAEZKE, 2009.

A maioria dos PAs podem ser classificados em cinco diferentes tipos de estrutura (Figura 1.5A) e a sua ocorrência é restrita para os angiospermas, sendo principalmente limitado a apenas quatro famílias de plantas Asteraceae (Senecioneae e Eupatorieae), Boraginaceae,

Apocynaceae e a *Crotalaria* (Fabaceae). Os macrocíclicos diésteres do tipo senecionina são encontrados nas plantas de *Senecio*, e este tipo de estrutura pode ser biossinteticamente modificada para o PA tipo otonecina. Nas plantas os PAs estão presentes principalmente na forma de seus N-óxidos (Figura 1.5B) (KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010)

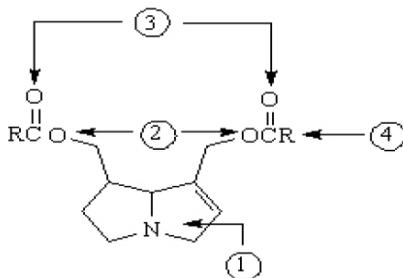
Figura 1. 5. A. Principais tipos de estruturas de PAs das plantas. B. Tipos de PAs e N-óxidos da planta *Senecio*.



Fonte: Adaptado de KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010

A estrutura básica responsável pela hepatotoxicidade dos PAs é determinada por quatro características estruturais mínimas, a saber: (i) um anel 3-pirrolina; (ii) um ou dois grupamentos hidroxilas ligado ao anel pirrolina; (iii) um ou dois grupamentos esterificados; (iv) e uma cadeia ramificada no resíduo ácido (Figura 1.6). No entanto, a característica imprescindível para a toxicidade hepática, tanto aguda quanto crônica, é a necina insaturada entre os carbonos 1 e 2 (SANDINI, BERTO e SPINOSA, 2013).

Figura 1. 6. Características estruturais essenciais para a toxicidade dos alcaloides pirrolizidínicos: 1) anel 3-pirrolina; 2) grupamentos hidroxilas ligados ao anel pirrolina; 3) grupamentos esterificados; e 4) cadeia ramificada no resíduo ácido.



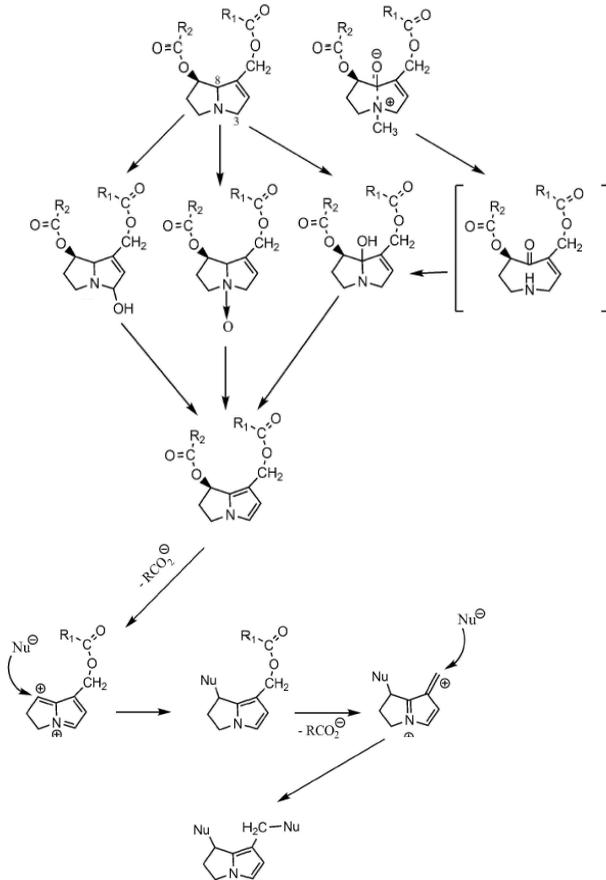
Fonte: SANDINI, BERTO e SPINOSA, 2013.

Os PAs somente se tornam tóxicos quando biotransformados pelo fígado, formando derivados pirrólicos altamente reativos que atuam como agentes alquilantes, causando efeitos hepatotóxicos (DA SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006).

Após a ingestão e absorção, os PAs são primeiramente biotransformados pelas enzimas microsossomais hepáticas do citocromo P-450 em um composto instável, que rapidamente sofre desidratação e se transforma no alcaloide dehidropirrolizidina, resultando em um rearranjo espontâneo de um sistema aromático pirrólico, conforme ilustrado na Figura 1.7. Os PAs ocorrem nas plantas principalmente na forma de seus N-óxidos, e estes como não podem ser diretamente oxidados a metabólitos pirrólicos no fígado, mas são frequentemente detectados na urina, são equivocadamente considerados não tóxicos. Porém, são previamente reduzidos pelas redutases da flora bacteriana

intestinal e portanto apresentam as mesmas toxicidades do que os PAs (WIEDENFELD, 2011; EDGAR, ROEDER e MOLYNEUX, 2002).

Figura 1. 7. Rota metabólica responsável pela toxicidade dos PAs.



Fonte: Adaptado de WIEDENFELD, 2011.

Estes compostos pirrólicos reagem com substâncias celulares de caráter nucleofílico e formam um aduto altamente tóxico, formando ligações irreversíveis com o DNA e RNA, e acarretando em efeitos citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (EDGAR, ROEDER e

MOLYNEUX, 2002; NOBRE et al., 2004; WIEDENFELD, 2011; KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010). Por outro lado, os PAs podem sofrer detoxificação onde o pirrol se conjuga com a glutatona formando compostos hidrossolúveis que são eliminados na urina (RODE, 2002; DA SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006; BAH e PEREDA-MIRANDA, 2007; SANTOS et al., 2008).

1.2.5.1. Toxicidade em seres humanos

A Comissão do *Codex Alimentarius*, da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), constituiu um grupo de trabalho, em 2011, o qual além do Brasil fazem parte outros 11 países, que visam reunir dados e avaliar a toxicidade, métodos de análise, ocorrência em plantas e o potencial risco dos PAs na saúde humana por meio da intoxicação direta ou indireta.

No ser humano, a principal manifestação da intoxicação por PAs é a doença veno-oclusiva hepática (DOV, do inglês *veno-occlusive disease*), que é caracterizada por dor epigástrica com distensão abdominal devido à ascite. A intoxicação não se correlaciona com a quantidade e duração de absorção de PAs, pois foi demonstrado que a susceptibilidade para a intoxicação é maior para homens, do que para mulheres e em crianças e especialmente recém-nascidos e fetos (PRAKASH et al., 1999; MARIO, 2003; WIEDENFELD, 2011).

Na maioria dos casos a intoxicação ocorre diretamente por meio do uso medicinal crônico de plantas na forma de chá, (SPERL et al., 1995; CHEN; MEI; FUO, 2010), mas pode acontecer de forma indireta através do consumo de produtos de origem animal contaminados por PAs, como, por exemplo, leite (DICKINSON et al., 1976; MOLINEUX;

JAMES, 1990; HOOGEBOON et al., 2011), ovos (EDGAR; SMITH, 2000) ou até através do mel e de alimentos com mel (BOPPRÉ et al., 2005; KAKAR et al., 2010; DUBECKE, BECKH, LULLMANN, 2011; COLEGATE, CAO e EDGAR, 2013; GRIFFIN et al., 2013; MARTINELLO et al., 2014).

Fica, pois, evidente, que o homem está exposto aos PAs por meio de diferentes fontes, podendo causar toxicidade aguda, sub-aguda ou crônica. A intoxicação aguda é caracterizada por hemorragia, necrose, hepatomegalia e ascite; enquanto que a intoxicação sub-aguda é caracterizada pela reincidência de hepatomegalia e ascite, bem como proliferação endotelial e oclusão das veias hepáticas, culminando na toxicidade crônica com surgimento da DOV, podendo ser fatal em alguns casos (PRAKASH et al., 1999; FU et al., 2004).

Há evidências também da ação teratogênica de PAs em seres humanos, uma vez que existem relatos de casos de DOV em recém-nascidos cujas mães consumiram, durante a gestação, chá de plantas que continham estes princípios ativos tóxicos (HUXTABLE, 1985; RASENACK et al., 2003). Dessa forma, constata-se que a toxicidade causada pelos PAs caracteriza sério risco à saúde humana pelo consumo de alimentos contaminados.

1.2.5.2. Alcaloides pirrolizidínicos em mel e pólen

A presença de PAs em mel, se da através do néctar, do pólen e estudos mais recentes mostram que os PAs hidrossolúveis podem ser lixiviados através do pólen para o mel (KEMPF et al., 2010). O conhecimento sobre a veiculação de PAs no mel aumenta a necessidade de se conhecer a toxicidade destes alcaloides. A elucidação dessas

relações pode ser incluída na apicultura, como medida preventiva para reduzir a contaminação do mel. Assim, uma estratégia para evitar a ingestão de PAs em mel/pólen seria uma cuidadosa seleção dos locais para o posicionamento das colmeias, juntamente com o conhecimento de plantas que sejam tóxicas (GRIFFIN et. al, 2013; CODEX, 2014).

As concentrações e os tipos de PAs diferem de um mel para outro, pois depende da origem botânica e/ou geográfica. Na literatura foram reportados alguns trabalhos, conforme Tabela 1.3.

Tabela 1. 3. Métodos para determinação de PAs em mel e pólen.

Autor/Ano	Matriz	Preparo de amostra	Metodologia	Analitos	LOQ
BEALES et al., 2004	Mel e pólen plantas <i>E. plantagineum</i> , <i>Heliotropium europaeum</i>	SPE	LC-MS/MS	Equimidina, equimulina, licopsamina, intermedina, heliotrina, lasiocarpina, senecionina e europina	-
BOPRE, COLEGATE, EDGAR, 2005	Pólen planta <i>Echium vulgare</i>	SPE	LC-MS/MS	Equimidina, acetilequimidina, uplandicina, angelilretronecina, equiuplatina, leptantina e equimiplatina	0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
COLEGATE et al., 2008	Pólen plantas <i>Echium vulgare</i> , <i>E. plantagineum</i> , <i>Senecio jacobaea</i> , <i>S. ovatus</i> e <i>Eupatorium cannabinu</i>	SPE	LC-MS/MS	Heliotrina, lasiocarpina, senecionina, sarracina e integerrimina, seus N-óxidos	0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
KEMPF et al., 2010.	Pólen plantas <i>Senecio jacobaea</i> , <i>S. vernalis</i> , <i>Echium vulgare</i> e <i>Phalaenopsis hybrids</i>	SPE	GC-MS	Monocrotalina, senecionina, senecifilina, senkirkina, heliotrina e retrorsina	0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$
DUBECKE, BECKH, LULLMAMM, 2011	Mel e pólen plantas <i>Echium</i> , <i>Senecio</i> e <i>Eupatorium</i>	SPE	LC-MS/MS	Senecifilina, equimidina, licopsamina, heliotrina, senkirkina, senecionina-N-óxido, senecifilina-N-óxido, monocrotalina, retrorsina e senecionina.	1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Continua

Continuação					
Autor/Ano	Matriz	Preparo de amostra	Metodologia	Analitos	LOQ
CRAMER, BEUERLE, 2012	Mel comercial	SPE	GC-MS	1,2- alcaloides pirrolizidínicos insaturados convertidos em necina	-
COLEGATE, CAO e EDGAR, 2013	Mel planta <i>Echium plantagineum</i>	SPE	LC-MS/MS	Equiumina, equiumina-N-óxido, equimidina, equimidina-N-óxido, acetilechiumina-N-óxido e acetilequimidina	50 ng g ⁻¹
GRIFFIN et al, 2013	Mel comercial	SPE	LC-MS/MS	Crotalina, retrorsina, senecionina, senkirkina, senecifilina, otosenina, equimidina, licopsamina, heliotrina, tricodesmina e jacobina	0,05 – 0,1 µg mL ⁻¹
BRETANHA, 2014	Mel comercial	Sólido Líquida	LC-MS/MS	Senecionia e Senecionica-N-óxido	188 – 195 ng kg ⁻¹
MARTINELLO et al, 2014	Mel comercial	QuEChERS	LC-MS	Equimidina, heliotrina, intermedina, lasiocarpina, licopsamina, senecifilina, senecionina, retrorsina e senkirkina.	0,081- 4,35 µg kg ⁻¹
Continua					

Continuação					
Autor/Ano	Matriz	Preparo de amostra	Metodologia	Analitos	LOQ
LUCCHETTI et al., 2016	Mel, planta <i>Echium vulgare</i> , néctar e pólen	SPE	LC-MS/MS	Equivulgarina, equivulgarina-N-óxido, acetilequimidinaacetilequimidina-N-óxido, equimidina, equimidina-N-óxido	1 ng g ⁻¹
MARTINELLO et al., 2017	Mel comercial	QuEChERS	HRMS	Atropina, escopolamina, heliotrina, equimidina, intermedina, lasiocarpina, licopsamina, senecifilina, senecionina, retrorsina e senicifilina	0,1- 0,7 µg kg ⁻¹

Fonte: O próprio autor

Os métodos analíticos reportados em literatura apresentam tempo de análise longos e principalmente preparo de amostra laboriosos, envolvendo diversas etapas de extração, fazendo uso de solventes orgânicos. Nenhum método conforme a Tabela 1.3 analisa os oito alcaloides pirrolizidínicos e nem faz a correlação entre as amostras. Existe também uma carência de métodos validados, fatos estes que motivaram a realização deste trabalho.

1.2.5.3. Regulamentação e avaliação de riscos

Ainda não existe nenhum limite máximo de resíduo (LMR, do inglês *maximum residue limit*) estabelecido para os PAs em alimentos. Orientações ou doses diárias toleráveis foram estabelecidas a partir de vários estudos independentes, mas as doses ainda não foram padronizadas frente a toxicidade destes alcaloides (EDGAR et al., 2011, GRIFFIN et. al, 2013).

As autoridades internacionais sugeriram diversos limites máximos de concentração de PAs em alimentos, mas não há nenhuma regulamentação específica ou até mesmo um consenso para amostras de mel. A Tabela 1.4 indica um panorama geral de limites de PAs em alimentos em alguns países (BEALES et al, 2004; MICHEL e RAEZKE, 2009; WIEDENFELD, 2011):

Tabela 1. 4. Quantidade de PAs e seus N-óxidos sugeridas em diversos países.

País	Quantidade de PAs e seus N-óxidos
Alemanha	1 $\mu\text{g dia}^{-1}$ - máximo 6 semanas por ano ou 0,007 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PA/kg de massa corpórea/dia.
Austrália e Nova Zelândia	1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corpórea/dia
União Europeia	4 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Holanda	1 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Fonte: Adaptado de MICHEL e RAEZKE, 2009.

Com base em uma estimativa de consumo mundial de 20 g de mel por dia, este não deve conter mais de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PAs, a fim de limitar a ingestão diária de menos de 1 μg de PAs. Há um consenso entre os países que se deve coletar mais dados a respeito da ocorrência de PAs em alimentos como leite, carne, ovos, salada, preparações de ervas, méis e alimentos para animais a fim de se obter uma melhor posição para as avaliações de risco perante a toxicidade destes compostos (MICHEL e RAEZKE, 2009).

Diante do exposto, o CODEX por meio da sua 37th reunião determinou que estudos mais aprofundados sobre a toxicidade dos PAs são indispensáveis, tanto no que se refere ao acompanhamento da veiculação dos PAs das plantas para produtos de origem animal e em alimentos para animais. Ainda se torna necessária a identificação de quais PAs possuem maior relevância (ocorrência e toxicidade) para a saúde; a avaliação dos danos à saúde provocado pelos mesmos e aprofundar o conhecimento no que concerne a veiculação dos PAs em alimentos para animais e produtos de origem animal, e com isso delinear um limite máximo de resíduo permitido (CODEX, 2014).

OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo realizar um estudo de correlação entre o perfil de alcaloides pirrolizidínicos em plantas da espécie *Senecio brasiliensis*, no pólen e em amostras de mel, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS).

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico para determinação de oito PAs utilizando LC-ESI-MS/MS;
- Realizar validação intralaboratorial do método desenvolvido de acordo com protocolo de validação 2002/CE/657 e o manual de garantia da qualidade analítica do MAPA; contemplando a avaliação de parâmetros de desempenho como linearidade, efeito de matriz, seletividade, robustez, exatidão, precisão, limites de detecção, limites de quantificação, recuperação, limite de decisão e capacidade de detecção e incerteza da medição;
- Aplicar o método analítico devidamente validado para determinação de PAs em méis comercializados em diferentes regiões do Brasil;
- Otimização do preparo de amostra de plantas e pólen utilizando planejamento fatorial Box-Benhken;

- Aplicar o método analítico validado na determinação dos compostos em plantas da espécie *Senecio brasiliensis*, no pólen e em amostras de mel produzidos nos mesmos locais de coleta destas plantas;
- Proporcionar aos apicultores através de palestras e cartilhas educativas o conhecimento a respeito da possível presença de PAs em méis florais e pólen provenientes das plantas do gênero *Senecio*;

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, D.; MARCHINI, L.C.; SODRÉ, G. S.; D'ÁVILA, M.V. **Plantas visitadas por abelhas e polinização**, Piracicaba, ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação, 2003, 40p.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S. BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n.1, p.105-111, 2005.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.

ARDREY, R. E.; **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**, Wiley: Huddersfield, 2003.

AVULA, 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

BAH, M.; PEREDA-MIRANDA, R. Alcaloides pirrolizidínicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC. Cap.32, p.847-868, 2007.

BARRETO, L.M.R.C; NORDI, J.C.; DIB, A.P.S.; CESAR, V.S. ALVARELI, L.G.; NORDI, N.T.; CANELLA, J.B. Qualidade físico-química do pólen apícola produzido no Vale do Paraíba-SP. **Revista Biociências**, v. 18, p. 64-70, 2012.

BARTH, O.M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

BEALES, K. A.; BETTERIDGE, K.; COLEGATE, S. M.; EDGAR, J. A. Solid-phase extraction and LC–MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honeys. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 6664–6672, 2004.

BERETTA, G. et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorometric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, n. 2, p. 185-191, 2005.

BERTONCELJ, J. et al. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 127, p. 296-302, 2011.

BETTERIDGE, K.; CAO, Y.; COLEGATE, S. M. Improved method for extraction and LC–MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey: Application to *Echium vulgare* honeys. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 1894–1902, 2005.

BLASA, M. et al. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1635 – 1640, 2007.

BOPPRE, M.; COLEGATE, S. M.; EDGAR, J. A.; FISCHER, O. W. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, p.5662-5672, 2008.

BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Widener University, Chester PA, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 jan. 2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=12479&word>>. Acesso em: 04 junho de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. MAPA, Brasília, 2000.

BRETANHA, L.C.; PIOVEZAN, M.; SAKO, A.F.V.; PIZZOLATI, M.G.; MICKE, G.A. Strategy for a fast and simple method for trace determination of senecionine and senecionine n-oxide in honey using large volume injection in HPLC-MS/MS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 681-687, 2014.

CAHILL, J. D.; FURLONG, E. T.; BURKHARDT, M. R.; KOLPIN, D.; ANDERSON, L. G. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v.1-2, p. 171, 2004.

CERNY, H.S.; AFFOLTER, M.; CERNY, C. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis. **Analytica Chemistry**, v. 75, p. 2349, 2003.

CHEN, T.; MEI, N.; FU, P. P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**, n. 30, p. 183-196, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHOU, M. W.; FU, P. P. Formation of DHP-derived DNA adducts in vivo from dietary supplements and Chinese herbal plant extracts containing carcinogenic pyrrolizidine alkaloids. **Toxicology and Industrial Health**, v.22, p.321-327, 2006.

CODEX - Codex Alimentarius Comission. Codex Standard for Honey, n. 12, v. 11, rev. 2, p. 1-8, 2001.

CODEX - Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Contaminants in Food. **7th Session**. 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). 12p. 2013.

CODEX - Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Contaminants in Food. **37th Session**. Distribution of the report of the eighth session of the codex committee on contaminants in foods. 121p. 2014

COLEGATE, S.M.; BOPPRÉ, M.; EDGAR, J.A.; FISCHER, O.W. Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in Pollen and Drying-Related Implications for Commercial Processing of Bee Pollen. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 5662-5672, 2008.

BEALES, K.A.; BETTERIDGE, K.; COLEGATE, S.M.; EDGAR, J.A. Solid-Phase Extraction and LC-MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6664-6672, 2004

COLLINS, C. H; BRAGA, G. B.; BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia** – Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. 3ª reimpressão (2010). 451p.

CRAMER, L.; BEUERLE, T. Detection and Quantification of Pyrrolizidine Alkaloids in Antibacterial Medical Honeys. **Planta Medica**, v. 78, p. 1976-1982, 2012.

CREWS, C.; STARTIN, J. R.; CLARKE, P. A. Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid phase extraction and HPLC-MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, p. 419-428, 1997.

CULVENOR, C. C. J.; EDGAR, J. A.; JAGO, M. V.; QUTTERIDGE, A.; PETERSON, J. E.; SMITH, L. W. Hepato- and pneumotoxicity of

pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. **Chemico-Biological Interactions**, v. 12, p. 299–324, 1976.

DA SILVA, C. M.; BOLZAN, A. A.; HEINZMANN, B. M. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p.1047-1053, 2006.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**. In: Cromatografia. n. 7, 1998.

DICKINSON, J. O.; COOKE, M. P.; KING, R. R.; MOHAMED, P. A. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 11, p. 1192-1196, 1976.

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

EDGAR, J. A.; COLEGATE, S. M.; BOPPRÉ, M.; MOLYNEUX, R. J. Pyrrolizidine alkaloids in food: A spectrum of potential health consequences. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, p. 308–324, 2011.

EDGAR, J. A.; SMITH, L. W. Transfer of pyrrolizidine alkaloids into eggs: food safety implications. **Natural and Selected Synthetic Toxins**, v. 8, p.118-128, 1999.

EDGAR, J.A.; ROEDER, E.; MOLYNEUX, R.J. Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 50, p. 2719-2730, 2002.

EFSA, SCIENTIFIC OPINION. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food

Chain (CONTAM) **European Food Safety Authority - EFSA Journal**, Parma, Italy, 134, 2011.

ESCUREDO, O.; MÍGUEZ, M.; FERNANDEZ-GONZALEZ, M.; CARMEN, S.M. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, v. 138, p. 851–856, 2013.

FALLICO, B. et al. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 305-313, 2004.

FU, P. P.; XIA, Q.; LIN, G. Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanism. **Drug Metabolism Reviews**, London, v. 36, n. 1, p. 1-55, 2004.

GHELDOF, N.; WANG, X. H.; ENGESETH, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5870-5877, 2002.

GOMES, S. et al. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 544–548, 2010

GOSETTI, F.; MAZZUCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M.C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929–3937, 2010.

GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P., MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ESTIMA-SILVA, P.; SALLIS, E. S. V. Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35 surtos de intoxicações por *Senecio* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 5, p. 389-397, 2010.

GRIFFIN, C.T.; DANAHER, M.; ELLIOT, C. T.; KENNEDY, D. G.; FUREY, A. Detection of pyrrolizidine alkaloids in commercial honey using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1577-1583, 2013.

HAGER, J. W.; YVES LE BLANC, J. C. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument. **Journal of Chromatography, A**, v. 1020, p. 3, 2003.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR 2004. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC. p. 765-792.

HERNANDEZ, F.; SANCHO, J. V.; POZO, O. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. **Journal Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 934, 2005.

HERODES, K.; LEITO, I.; KRUYE, A. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 75–80, 2009.

HOFF, R.B.; RUBENSAM, G.; JANK, L.; BARRETO, F.; PERALBA, M.C.R.; PIZZOLATO, T.M.; DIAZ-CRUZ, M.S.; BARCELO, D. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443-450, 2015.

HOFFMANN, E.; STROOBANT V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition, 2007.

HOOGENBOOM, L. A. P.; MULDER, P. P. J.; ZEILMAKER, M. J.; VAN DEN TOP, H. J.; REMMELINK, G. J.; BRANDON, E. F. A.;

KLIJNSTRA, M.; MEIJER, G. A. L.; SCHOTHORST, R.; VAN EGMOND, H. P. Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. **Food Additives and Contaminants**, v. 38, n. 3, p. 359-372, 2011.

HOSNY, L. M.; EL-GHANI, S. A.; NADIR, A. S. Nutrient composition and microbiological quality of three unifloral with emphasis on processing of honey probiotic youghurt. **Global Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 107-112, 2009.

HUXTABLE, R. Human embryotoxicity of pyrrolizidine-containing drugs. **Hepatology**, Baltimore, v. 9, n. 3, p. 510-511, 1985.

IURLINA, M. O. et al. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimization of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1141-1149, 2009.

KAKAR, F.; AKBARIAN, Z.; LESLIE, T.; MUSTAFA, M. L.; WATSON, J.; EGMOND, H. P.; OMAR, M. F.; MOFLEH, J. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Toxicology**, p.1-7, 2010.

KARABAGIAS, I. K. et al. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 146, p. 548–557, 2014.

KARAM, F. S. C.; MÉNDEZ, M. C.; JARENKOW, J. A.; RIETCORREA, F. Fenologia de quatro espécies tóxicas de Senecio (Asteraceae) na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 22, n. 1, p. 33-39, 2002.

KEMPF, M.; BEUERLE, T.; BÜHRINGER, M.; DENNER, M.; TROST, D.; VON DER OHE, K.; et al. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography– mass spectrometry. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 1193–1200, 2008.

KEMPF, M.; HEIL, S.; HAßLAUER, I.; SCHMIDT, L. VON DER OHE, K.; THEURINK, C.; REINHARD, A.; SCHREIER, P.; BEUERLE, T. Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 292-200, 2010.

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, p. 158-168, 2010.

KEMPF, M.; WITTING, M.; SCHONFELD, K.; CRAMER, L.; SCHREIER, P.; BEUERLE, T. Pyrrolizidine alkaloids in food: downstream contamination in the food chain caused by honey and pollen. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, p. 325-331, 2011

KRELL, R. Value-added products from beekeeping. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nation**, 1996. p.87-113 (FAO Agriculture Services Bulletin, v124.)

KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different typed from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC, CLAE**. Campinas: Átomo, 2009. 381 p.

LETSYO, Emmanuel et al. Pyrrolizidine alkaloids in floral honeys of tropical Ghana and health risk assessment. **Food Additives & Contaminants: Part B**, n. just-accepted, 2017.

LI, S.F.Y.; YU, L. Dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis for online preconcentration of toxic pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal medicine. **Electrophoresis**, v. 26, p. 4360-4367, 2005.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. 4. ed. Nova Odesa. Editora: Plantarum, 1994. p. 86-87.

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, 2016.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C.S. L. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, 4, 3, 197-207, 2012.

MARCHINI, L. C.; GENI, S.S.; MORETI, A. C. de C. C. **Mel Brasileiro: Composição e normas**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2004. 111p.

MARIO, C. Hepatic sinusoidal-obstruction syndrome: toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 437-446, 2003.

MARTINELLO, M.; CRISTOFOLI, C.; MUTINELLI, F.; GALINNA, A. 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, BORIN, A.; STELLA, R., BOVO, D.; BIANCOTTO, G., GALLINA, A., MUTINELLI, F. 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.

MATUSZEWSKI, B.K.; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 3019-3030, 2003.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIAC, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 12-19, 1999.

MEI, M.; GUO, L.; FU, P. P.; FUSCOE, J. C.; LUAN, Y.; CHEN, T. Metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity of comfrey. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews**, v.13, n.7-8, p. 509-526, 2010.

MÉNDEZ M., C.; RIET-CORREA, F. **Plantas tóxicas e micotoxícoses**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2008. 298 p.

MENDONÇA, K.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, B.A.; ALMEIDA-ANACLETO, D.; MORETI, A.C.C.C. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. **Neotropical Entomology**, v. 37, p.513-521, 2008.

MICHEL, R.; RAEZKE, K. Pyrrolizidine Alkaloids in Honey. **Intertek Food Services GmbH**, p. 1-20, 2009.

MOLINEUX, R. J.; JAMES, L. F. Pyrrolizidine alkaloids in milk: thresholds of intoxication. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 94-103, 1990.

MOLYNEUX, R. J.; PANTER, K. E. **Alkaloids toxic to livestock**. In: CORDELL, G. A. *The Alkaloids*. The Netherlands: Elsevier, v.67, p.143-216, 2009.

MORETI, A.C.C.C.; CARVALHO, C.A.L.; OLIVEIRA, P.C.F.; MARCHINI, L.C. Botânica e fisiologia vegetal. Espectro polínico de amostras de méis de *Apis mellifera* L. coletadas na Bahia. **Bragantia**, Campinas, v.59, n.1, p.1-6, 2000.

MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, V.C; RODRIGUES, R.R.; CARVALHO, C.A.L.; OLIVEIRA, P.C.F. **Atlas do pólen de plantas apícolas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual, 2002, 93p.

MULLER, R.C.S.; OLIVEIRA, P.S.; DANTAS, K.G.F.; ALVES, C.N.; VASCONCELOS, M.A.M.; VENTURIERI, G.C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da amazônia. **Química Nova**, v. 35, n 9, p. 1728-1732, 2012.

NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; TABOSA, I. M.; MEDEIROS, R. M. T.; BARBOSA FILHO, J. M. Intoxication by *Crotalaria retusa* in ruminants and equidae in the state of Paraíba, Northeast Brazil, p.275-279. In: Acamovich T., Stewart C.S., Pennycott T.W. (Eds), **Plants Poisoning and Related Toxins**. CAB International, lasgow, UK, 2004.

PICO, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45, 2004.

PILATI, C.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Asteracea) em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica**, v. 27, n. 7, p. 287-296, 2007.

PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; REILLY, P. E. B.; SEAWRIGHT, A. A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research**, v.443, p.53-67, 1999.

PROENÇA DA CUNHA, A.; SALGUEIRO, L.; ROQUE, O. R. Alcalóides com núcleo pirrolizidina. In: PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. Cap.26, p. 523-536, 2005.

RASENACK, R.; MULLER, C.; KLEINSCHMIDT, M.; RASENACK, J.; WIEDENFELD, H. Venous-occlusive disease in a foetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. **Fetal Diagnosis and Therapy**, Basel, v. 18, n. 4, p. 223-225, 2003.

RIET-CORREA, F.; SOARES, M. P.; MENDEZ, M. R. T. Intoxicações em eqüinos no Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 715-722, 1998.

RODE, D. Comfrey toxicity revisited. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, n. 11, p. 497-499, 2002.

RIZELIO, V. M.; TENFEN, L.; SILVEIRA, R.; GONZAGA, L.V.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**. v. 93, p. 62-66, 2012a.

RIZELIO, V. M.; GONZAGA, L.V.; BORGES, G.S.C.; MICKE, G.A.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**. v. 133, p. 1640-1645, 2012b.

RIZELIO, V.M.; GONZAGA, L.V.; BORGES, G.S.C.; MALTEZ, H.F.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Fast determination of cations in honey by capillary electrophoresis: A possible method for geographic origin discrimination. **Talanta**, v. 15, p. 450-456, 2012c

ROSEMANN, G. M. **Analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species by HPLC-MS/ MS in order to evaluate related food health risks**. 2007. 105f. Tese (Doutorado) – Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Petroria.

ROULET, M.; LAURINI, R.; RIVIER, L.; CALAME, A. Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. **Journal of pediatrics**, v.112, p.433-436, 1988.

SALOMÉ, J. A. **Levantamento e fenologia de plantas apícolas do Estado de Santa Catarina**. 2002, Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, 2002.

SANDINI, T. M.; BERTO, M. S. U.; SPINOSA, H. S. Senecio brasiliensis e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 83-92, 2013.

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; BARROS, C. S. L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.1, p.1-14, 2008.

SANTOS, R.F.; KIILL, L.H.P.; ARAÚJO, J.L.P. Levantamento da flora melífera de interesse apícola no município de Petrolina-PE. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.19, n.3, p.221-227. 2006.

SATO, T.; MIYATA, G. The nutraceutical benefit , part III: Honey. **Nutrition**, v. 16, n. 6, 2000.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 391-397, 2010.

SCHIMIDT, J.O.; BUCHMANN, S.L Other products of hive. In: GRAHAN, J.M.; AMGROSE, J.Y.; LANSTROTH, L.L. eds **The Hive and the honey bee: a new book on beekeeping wich contines tradition of "Langstroth on the hive and honeybee"**. Hamilton: Dadant, 1992. p.928-977.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. **Rational Phytotherapy – A physician´s guide to herbal medicine**. Berlin: Springer-Verlag, 386p. 2001.

SILVA, C. M. S., BOLZAN, A. A., HEINZMANN, B. M. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1047-1053, 2006.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYS, F. G. R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, 36, 3, 449-461, 2013.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 55, p. 95, 2002.

SOLER, C.; HAMILTON, B.; FUREY, A.; JAMES, K. J.; MANES, J.; PICO, Y.; Comparison of four mass analyzers for determining carbosulfan and its metabolites in citrus by liquid chromatography/mass spectrometry. **Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2151, 2006.

SPERL, W.; STUPPNER, H.; GASSNER I.; JUDMAIER, W.; DIETZE, O.; VOGEL, W. Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. **European Journal of Pediatrics**, Nova York, v. 154, n. 2, p. 112-116, 1995.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora Manole, 2008. 942 p.

STEGELMEIER, B. L. Pyrrolizidine Alkaloid - Containing Toxic Plants (Senecio, Crotalaria, Cynoglossum, Amsinckia, Heliotropium, and Echium spp.). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.27, p. 419-428, 2011.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320 p.

TORNUK, F. et al. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**. v. 46, p. 124– 131, 2013.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry**. Reviews, 30, 491, 2010.

TURHAN, I. et al. Quality of honeys influenced by thermal treatment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1396-1399, 2008.

VÉKEY, K.; Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 921, p. 227, 2001.

VILLANUEVA, M. T. O. et al. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 53, n. 3, p. 217-224, 2002.

WATERS CORPORATION, Micromass. **Q-ToF micro Mass Spectrometer Operator's Guide**, Milford, 2002.

WHITE, J. W. Composition of honey. In: CRANE, E. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann, p. 157-158, 1979.

WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 3, p. 282-292, 2011.

WIEDENFELD, H.; EDGAR, J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 137-151, 2011.

YÜCEL, Y.; SULTANOGLU, P. Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. **Food Bioscience**, v. 1, p. 16–25, 2013.

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM MEL

2.1 INTRODUÇÃO

Os alcaloides pirrolizidínicos (PAs, do inglês *pyrrolizidine alkaloids*) são toxinas naturais de sabor amargo, produzidos pelas plantas das famílias Asteraceae (tribos Senecioneae e Eupatorieae), Boraginaceae, Apocynaceae e Fabaceae (gênero *Crotalaria*). Funcionam como uma defesa química contra insetos, sendo encontradas em concentrações elevadas principalmente nas sementes e flores (EDGAR, ROEDER, MOLYNEUX, 2002; FLORES, TOZZI, TRIGO, 2009; KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010; WIEDENFELD, EDGAR, 2011; MARTINELLO et al., 2014).

Os PAs caracterizam-se quimicamente por serem ésteres de amino-álcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos). A necina caracteriza-se por possuir dois anéis fundidos de cinco membros com um átomo de nitrogênio na cabeça da ponte. Frequentemente, podem ocorrer na forma de base terciária ou de seus N-óxidos (PANOs, do inglês *pyrrolizidine N-oxides*). No entanto, a característica imprescindível para a toxicidade é a presença da necina insaturada entre os carbonos 1 e 2. Estes compostos pirrólicos reagem com substâncias celulares de caráter nucleofílico e formam um aduto altamente tóxico, formando ligações irreversíveis com o DNA e RNA, que acarretam em efeitos citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (MATTOCKS, 1986; EDGAR, ROEDER, MOLYNEUX, 2002;

KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010; WIEDENFELD, EDGAR, 2011; WIEDENFELD, 2011; MARTINELLO et al., 2014).

A intoxicação humana pode ocorrer através do consumo direto de chás e produtos naturais (WIEDENFELD, 2011; GRIFFIN, DANAHER, FUREY, 2014), ou através da contaminação indireta, pelo consumo de ovos (EDGAR, SMITH, 1999), leite (DEINZER, ARBOGAST, BUHLER, 1982; HOOGENBOOM et al., 2011), cereais (KAKAR et al., 2010; MOLYNEUX, GARDNER et al., 2011) e mel (EDGAR, ROEDER, MOLYNEUX, 2002; KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010; DÜBECKE, DECKH, LÜLLMANN, 2011; CAO, COLEGATE, EDGAR, 2013; GRIFFIN et al., 2013; MARTINELLO et al., 2014). Em humanos, os maiores efeitos causados por esta intoxicação, são cirrose de fígado, lesão hepatocelular e doença veno-oclusiva (MATTOCKS, 1986; WIEDENFELD, EDGAR, 2011).

Apesar dos graves efeitos tóxicos causados pelos PAs, ainda não existem legislações definindo limites máximos de resíduos (MRL, do inglês *maximum residue limit*) destes compostos em alimentos ou alimentos para animais. Orientações ou doses diárias toleráveis em alguns países foram estabelecidas a partir de vários estudos independentes, mas as doses ainda não foram padronizadas perante a toxicidade desses alcaloides. Os valores encontrados são bastante divergentes, variando de 0,007 a 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo/dia dependendo do fator de segurança aplicado (KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010; EDGAR, COLEGATE, BOPPRÉ, MOLYNEUX, 2011; EFSA, 2011; MARTINELLO et al., 2014). A Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*) publicou um parecer científico referente a PAs na

alimentação humana e animal, recomendando um levantamento de dados analíticos com uma lista de PAs de particular importância, incluindo os do tipo senecionina, licopsamina, heliotrina e do tipo monocrotalina (EFSA, 2011).

Dados fornecidos pela Divisão de Estatística da Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAOSTAT, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division*) mostram que a produção mundial de mel foi cerca de 1,7 milhões de toneladas em 2013. A União Europeia (EU, do inglês *European Union*) é um importante produtor de mel, em termos de volume de produção, visto que em 2014 a produção atingiu quase 204 mil toneladas, representando aproximadamente 23,6% da produção mundial. Outros principais produtores foram a Ásia (40,3%), América (23,4%), África (10,4%) e Oceania (2,2%). No Brasil, de acordo com dos dados apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística a produção foi cerca de 38.000 toneladas em 2015 e destes, mais de 22.000 toneladas de mel foram exportados (IBGE,2016). Os principais consumidores de mel no mundo são a EU (20-25% do consumo mundial), China (aproximadamente 15%) e nos Estados Unidos (aproximadamente 10%) (FAO, 2017).

Com o objetivo de garantir a segurança do consumidor, existe por parte das agências reguladoras, a necessidade de métodos analíticos que atinjam baixos limites de quantificação para determinar os níveis de PAs em amostras de mel. Com essa finalidade, muitos estudos relataram a utilização da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography tandem-mass spectrometry*) para determinar PAs em

mel, devido à sua sensibilidade e especificidade (BEALES, BETTERIDGE, COLEGATE, EDGAR, 2004; BOPPRE, COLEGATE et al., 2008; DÜBECKE, BECKH, LÜLLMANN, 2011; CRAMER, BEUERLE, 2012; GRIFFIN et al., 2013; CAO, COLEGATE, EDGAR, 2013; MARTINELLO et al., 2014; LUCHETTI et al., 2016; MARTINELLO et al., 2017) e em outras matrizes, como chá e produtos naturais (FLORES, TOZZI, TRIGO, 2009; WIEDENFELD, 2011; GRIFFIN, DANAHER, FUREY, 2014; MATHON, et al., 2014; SCHULZ et al., 2015; SHIMSHONI et al., 2015; CHEN et al., 2017; LETSYO et al., 2017).

Considerando a complexidade da matriz, a maioria dos métodos reportados na literatura faz uso de técnicas de preparo de amostra utilizando extrações em fase sólida (SPE do inglês, *solid phase extraction*). Este por sua vez envolve muitas etapas, é laborioso e faz uso de solventes orgânicos e ácidos fortes. (BEALES, BETTERIDGE, COLEGATE, EDGAR, 2004; EDGAR et al., 2008; KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010; COLEGATE, BOPPRÉ, MOLYNEUX, 2011; DÜBECKE, BECKH, LÜLLMANN, 2011; CRAMER, BEUERLE, 2012; CAO, COLEGATE, EDGAR, 2013; GRIFFIN et al., 2013; LUCHETTI et al., 2016). Martinello (2014 e 2017) utilizou a técnica de QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) que é conhecida pela simplicidade no preparo de amostra, porem também faz uso de solventes orgânicos e sais com custos elevados.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método com preparo de amostra simples, rápido e eficiente, visando aumentar a frequência analítica para determinação de oito PAs

em 92 amostras de méis comerciais do Brasil utilizando a técnica de LC-MS/MS.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos de retrorsina (RET), retrorsina-N-óxido (RET-N) e monocrotalina (MCT) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). A equimidina (ECH), intermedina (INT) e licopsamina (LYC), foram adquiridos da Planta Analytica (Danbury, EUA). Senecionina (SEN) e senecionina-N-óxido (SEN-N) foram doados pelo Dr. Gustavo Amadeu Micke (Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil). Todos os padrões comerciais possuem pureza superior a 95%.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Metanol, acetonitrila e ácido sulfúrico (grau HPLC) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido fórmico (grau HPLC) adquirido da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Água desionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Mega Purity (Billerica, MA, EUA).

2.2.2 SOLUÇÕES

As soluções estoque dos padrões de PAs foram preparadas isoladamente por dissolução de $10 \pm 0,2$ mg do padrão analítico em 10 mL de metanol, exceto para equimidina que foi dissolvida com uma solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Para o preparo das curvas de calibração e os experimentos de validação (efeito de matriz, precisão e exatidão), soluções de trabalho contendo todos os PAs nas concentrações de $1,0 \mu\text{g}$

mL^{-1} (para os níveis de 20-50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (para os níveis de 3-10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foram preparados diariamente em metanol.

2.2.3 INSTRUMENTAÇÃO

Os procedimentos analíticos foram realizados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) equipado com bomba binária, sistema de degaseificação, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 108 *vials* de 2,0 mL e forno para seis colunas analíticas, acoplado a um espectrômetro de massas híbrido constituído de um triploquadrupolo e *ion trap* linear, modelo QTRAP® 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, E.U.A.) equipado com célula de colisão *Quarved* LINAC®, guia de íons Qjet® 2, fonte de ionização Turbo V™, detector AcQuRate™ e eletrônica Fast eQTM. Foram utilizados gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, E.U.A.). O *software* Analyst versão 1.6.2 foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados.

O espectrômetro de massas foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante, nos modos de íons negativos e positivos por infusão de uma solução de polipropileno glicol (PPG, do inglês *polypropylene glycol*) nas concentrações de 3×10^{-5} e 2×10^{-7} mol L^{-1} , respectivamente. Ar sintético foi utilizado como gás nebulizante (GS1), gás secante (GS2) e gás de exaustão (Source exhaust) na fonte Turbo V™ e o nitrogênio foi empregado como gás de dessolvatação (CUR, do inglês *curtain gas*) e de colisão (CAD, do inglês *collision gas*). Os PAs foram monitorados e quantificados usando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*).

2.2.3.1 Otimização do sistema de detecção de massas

A otimização das condições de MS/MS foi realizada através da infusão das soluções individuais de cada alcaloide no espectrômetro de massas, em ambos os modos (positivo e negativo). As soluções de injeção de cada alcaloide foram obtidas por diluição das soluções estoque até a concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em uma mistura de metanol/água (1:1, v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico (v/v).

A seleção do íon precursor de cada analito foi realizada usando o modo *Q1 MS Scan* com tempo de varredura de três segundos e a aquisição dos espectros foi realizada utilizando o modo MCA (MCA, do inglês *Multiple Channel Acquisition*), com dez ciclos. Para verificar a estabilidade e intensidade do sinal antes de realizar a otimização automática pelo MRM, foi utilizado o modo de *Q1*. Depois de identificados os íons precursores, foi realizada a otimização dos fragmentos no modo automático, que avalia simultaneamente o potencial de desagregação (DP, do inglês *Declustering Potential*), potencial de entrada na cela de colisão (EP, do inglês *Entrance Potential*), energia de colisão (CE, do inglês *Collision Energy*) e potencial de saída da cela de colisão (CXP, do inglês *Collision Cell Exit Potential*). No modo automático, foram avaliados os cinco sinais mais intensos e destes apenas três foram escolhidos. Na Tabela 2.1, são apresentadas as energias otimizadas e os fragmentos majoritários para os analitos em estudo.

Tabela 2. 1. Energias otimizadas e os fragmentos majoritários para análise dos alcalóides pirrolizidínicos (PAs) em mel.

Analitos	[M+H] ⁺	Íon Produto	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Licopsamina	300,1	94,1	96	10	33	12
		138,1	96	10	27	8
		156,0	96	10	37	10
Intermedina	300,1	94,0	111	10	33	6
		138,0	111	10	27	8
		120,1	111	10	33	8
Monocrotalina	326,1	120,1	161	10	43	8
		94,1	161	10	73	12
		194,1	161	10	39	12
Senecionina	336,1	120,1	136	10	37	8
		93,9	136	10	39	12
		91,1	136	10	77	14
Senecionina-N- óxido	352,1	120,1	156	10	39	6
		138,2	156	10	37	14
		93,9	156	10	41	12
Retrorsina	352,1	119,2	161	10	43	8
		138,1	161	10	41	6
		94,0	161	10	73	12
Retrorsina-N- óxido	368,1	119,0	121	10	39	8
		94,1	121	10	71	6
		120,2	121	10	41	8
Equimidina	398,2	120,2	131	10	31	8
		220,1	131	10	23	10
		83,0	131	10	29	6

DP - potencial de desagregação; EP - potencial de entrada na cela de colisão;

CE - energia de colisão; CXP - potencial de saída da cela de colisão. Fonte: O próprio autor

2.2.3.2 Otimização dos parâmetros da fonte de ionização

A otimização dos parâmetros da fonte de ionização foi executada pela análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*), que tem por objetivo ajustar as condições de ionização dos analitos de forma que a maior parte possível de moléculas seja convertida para a forma ionizada. O analito escolhido para realizar essa otimização em FIA foi a retrorsina-N-óxido, por possuir a menor sensibilidade dentre os oito PAs estudados. O analito foi injetado pelo amostrador automático do HPLC sem a coluna e várias injeções da solução foram realizadas durante o processo de otimização com alteração dos parâmetros: temperatura da fonte (TEM, do inglês *temperature*), voltagem aplicada ao capilar (IS, do inglês *IonSpray voltage*), vazão do GS1, GS2, CUR e CAD. As condições foram estudadas para um fluxo de fase móvel de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e estão ilustradas na Tabela 2.2.

Tabela 2. 2. Condições de FIA para os alcaloides pirrolizidínicos.

Fonte/Gás	Condições
CUR	25
CAD	High
IS (V)	5500
TEM (°C)	650
GS1	50
GS2	55

TEM - temperatura da fonte; IS - voltagem aplicada ao capilar; GS1 - vazão do gás nebulizante; GS2 - gás secante (GS2); CUR - gás de interface;

CAD - gás de colisão. Fonte: O próprio autor.

2.2.3.3 Otimização das condições cromatográficas

2.2.3.3.1 Seleção da coluna cromatográfica

Para a separação cromatográfica dos analitos, foram avaliadas cinco colunas analíticas de fase reversa, sendo três delas C₁₈; uma contendo fase C₈ e outra com grupamentos fenila, como segue:

- ZORBAX C₁₈ (4,6x150 mm 3,5 µm, Agilent, Palo Alto, CA, E.U.A.);
- ZORBAX C₁₈ (4,6x100 mm 3,5 µm, Agilent, Palo Alto, CA, E.U.A.);
- VENUSIL XBP C₁₈ (L) (2,1x100 mm 3,0 µm, Bonna-Agela, Wilmington, DE, E.U.A.);
- DURASHELL Phenyl (2,1x150 mm 3,0 µm, Bonna-Agela, Wilmington, DE, E.U.A.);
- SYMMETRY C₈ (4,6x250mm 5,0 µm, Waters, Milford, MA, E.U.A.)

A coluna que apresentou a melhor separação dos analitos foi a ZORBAX C₁₈ (4,6x100 mm 3,5 µm, Agilent, Palo Alto, CA, E.U.A.) e as condições instrumentais do cromatógrafo líquido foram realizadas sob fluxo de 0,5 mL min⁻¹, temperatura do forno de coluna de 30 °C, temperatura do amostrador automático de 20 °C, volume de injeção de 5,00 µL. O tempo total de corrida foi de onze minutos, com quatro minutos de equilíbrio entre as injeções e a limpeza do injetor foi realizada com uma solução constituída por ACN:MeOH:H₂O (1:1:1, v/v/v) durante dez segundos, a fim de se evitar contaminação (*carry over*) entre as análises. A composição do gradiente adequada durante a corrida cromatográfica está indicada na Tabela 2.3.

Tabela 2. 3. Composição do gradiente utilizado para a separação cromatográfica de alcaloides pirrolizidínicos (PAs).

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Fluxo (mL min⁻¹)
4	98	2	0,5
2	98	2	0,5
5	85	15	0,5
8	50	50	0,5
9	10	90	0,5
11	98	2	0,5

Fase móvel A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico. Fase móvel B: acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico. Fonte: O próprio autor.

2.2.4 Amostras e preparo de amostras

Foram analisadas 92 amostras de méis florais de origem geográfica e fontes florais diferentes. As amostras foram obtidas em estabelecimentos com inspeção federal de onze estados do Brasil no ano de 2015: 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), Ceará (n = 1), Pará (n = 1) e Piauí (n = 1).

Antes das análises, as amostras foram homogeneizadas, colocadas num tubo de polipropileno tipo *falcon* com capacidade de 50 mL com tampa de rosca e armazenadas a -20 °C até o momento da utilização. No momento do preparo das amostras, elas foram

descongeladas em temperatura ambiente. As amostras que apresentaram cristalização foram colocadas em banho-maria tipo Dubnoff (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 20 minutos a 30°C. Amostras brancas foram obtidas de mel previamente analisado, em que não foi encontrada nenhuma quantidade detectável de PAs.

As amostras foram homogeneizadas e pesadas $2,0 \pm 0,1$ g em tubo de polipropileno tipo *falcon* com capacidade de 50 mL com uma tampa de rosca. A amostra foi dissolvida com 5 mL de água desionizada, agitada em agitador tipo vórtex (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 40 s e agitada em agitador orbital (Tecnal Equipamentos para Laboratório, SP, Brasil) durante 20 min. Em seguida, uma alíquota de 200 μ L de extrato e 800 μ L de fase móvel (98:2; A: B) foi transferida para um microtubo de polipropileno de capacidade de 1,5 mL, centrifugado (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, E.U.A.) a 14.000 rpm durante 20 min e transferido para *vials* com capacidade de 2 mL e submetido a análise.

2.2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método foi realizada de acordo com o protocolo de validação da Comissão Europeia 2002/657/CE para substâncias proibidas. Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de decisão ($CC\alpha$, do inglês *decision limit*), capacidade de detecção ($CC\beta$, do inglês *detection capability*), estabilidade e robustez. Além disso, também foram avaliados de acordo com o protocolo de validação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os parâmetros de efeito de matriz, limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) e limite de quantificação

(LOQ, do inglês *limit of quantification*) (Brasil, 2011). A incerteza de medição (MU, do inglês *measurement uncertainty*) foi calculada de acordo com o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (ISO / IEC Guia 98-3: 2008). O limite mínimo de desempenho requerido (MRPL, do inglês *minimum required performance limit*) foi definido como $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos.

2.2.5.1. Seletividade/ especificidade

A seletividade e especificidade do método foram avaliadas através da análise de 20 amostras diferentes a fim de verificar possíveis interferentes de outros componentes análogos aos analitos, como: isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, entre outras, no mesmo tempo de retenção do analito, utilizando o modo MRM com três transições de m/z para cada analito. Para confirmação da identidade dos compostos, a razão dos íons de quantificação e confirmação foram avaliadas pela média da razão dos íons, desvio padrão e desvio padrão relativo de 60 amostras fortificadas e 60 soluções de padrão utilizado em toda a validação. Os resultados foram confrontados considerando os critérios das tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas dos íons.

2.2.5.2. Linearidade e efeito de matriz

Para avaliação da linearidade e efeito de matriz, três curvas de calibração foram avaliadas: (i) curva de calibração do analito em solução (CCAS), construída a partir da diluição de soluções-padrão em fase móvel; (ii) curva de calibração da matriz branca fortificada (CCMBF), construída a partir da matriz branca fortificada com os

padrões e; (iii) curva de calibração do extrato da matriz branca fortificada (CCEMBF), construída a partir do extrato da matriz branca fortificado com os padrões após a extração. A linearidade foi avaliada pela curva analítica contendo dez pontos (0, 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{ kg}^{-1}$), preparados em três réplicas independentes e analisados no mesmo dia.

Os parâmetros das curvas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ponderados (WLSLR, do inglês *weighted least squares linear regression*) aplicado ao modelo $Y_i = a_w + b_w X_i$, em que Y_i representa a área dos analitos, X_i as concentrações dos padrões dos analitos, a e b estimativas de WLSLR dos parâmetros da equação. Foram construídos gráficos de resíduos da regressão para investigação da homoscedasticidade ou desvio de linearidade. Após análise visual, os gráficos residuais foram examinados para identificar possíveis *outliers* pelo teste de Grubbs. Foram verificadas as premissas de normalidade (teste de Anderson-Darling), homoscedasticidade (teste de Levene), independência dos resíduos (teste de Durbin-Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (testes F de Snedecor). Os testes de hipóteses foram realizados a $\alpha = 0,05$. A avaliação da regressão ponderada foi realizada utilizando o cálculo da porcentagem do erro relativo (%RE, do inglês *percentage relative error*) para os diferentes fatores de ponderação, de acordo com a equação 1, onde $C_{\text{calculado}}$ é a concentração experimental e C_{nominal} é a concentração teórica:

$$\%ER = \frac{C_{\text{calculado}} - C_{\text{nominal}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100 \quad (1)$$

Para avaliação do efeito de matriz (ME, do inglês *matrix effect*), a razão das inclinações das curvas dos analitos em solução e das curvas de calibração do extrato da matriz branca fortificada foram comparadas, de acordo com a equação 2, onde $\text{slope}_{\text{CCEMF}}$ é o coeficiente angular da curva de calibração da matriz branca fortificada e $\text{slope}_{\text{CCAS}}$ é o coeficiente angular da curva de calibração do analito em solução:

$$ME = \frac{\text{slope}_{\text{CCEMF}}}{\text{slope}_{\text{CCAS}}} \quad (2)$$

2.2.5.3. Exatidão e precisão

A exatidão e precisão foram realizadas em três dias de validação, determinadas através da fortificação de amostra branca em três níveis de concentração (4,0; 6,0 e 8,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), correspondentes a 1,0, 1,5 e 2,0 vezes o MRPL. Cada nível foi preparado em seis replicatas independentes e injetados aleatoriamente. A repetibilidade (precisão intra-dia) foi avaliada em três dias consecutivos através do desvio-padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*). A reprodutibilidade (precisão inter-dia) expressa como RSD, foi avaliada trocando o analista no terceiro dia de validação.

2.2.5.4. Limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β)

Para determinação do LOD do método, os menores pontos da curva de calibração foram diluídos até que o LOD fosse detectado pela relação sinal da razão do analito/ruído maior que três. O LOD do

método foi estabelecido como a menor concentração detectada dos analitos em solvente, mas não necessariamente quantificada. O LOQ foi estabelecido através da relação sinal do analito/ruído maior que dez. O LOQ é a menor concentração na qual o método possui exatidão e precisão. Foram preparadas sete réplicas independentes para cada analito e avaliado a média, desvio padrão e o desvio padrão relativo para os limites. O $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram calculados a fim de avaliar o desempenho do procedimento analítico a partir dos dados do ensaio de reprodutibilidade, de acordo com a equação 3 e 4, onde $S_{Repro\ MRPL}$ é o desvio padrão da reprodutibilidade:

$$CC\alpha = 2,33 \times S_{Repro\ MRPL} \quad (3)$$

$$CC\beta = 3,97 \times S_{Repro\ MRPL} \quad (4)$$

2.2.5.5. Robustez

Para determinar a robustez do método analítico, foi aplicado o teste de Youden. Sete parâmetros analíticos foram selecionados para avaliação e oito ensaios foram realizados para determinar a influência dos mesmos no resultado final. Os ensaios foram realizados com as condições analíticas em seu valor nominal (representado por letras maiúsculas) e com uma pequena variação (letras minúsculas).

Os sete parâmetros analíticos estabelecidos para avaliação da robustez do método foram: (i) porcentagem de ácido fórmico na fase móvel; (ii) volume de injeção;(iii) temperatura do forno da coluna cromatográfica; (iv) porcentagem de fase móvel para diluição da amostra; (v) tempo de equilíbrio da coluna cromatográfica; (vi) válvula

de descarte e fluxo de fase móvel. Os parâmetros e variações estão representados na Tabela 2.4.

Tabela 2. 4. Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez pelo teste de Younden para o método proposto.

	Parâmetro	Nominal	Variação
A/a	% de ácido fórmico	0,1	0,08
B/b	Volume de injeção (μL)	5,0	5,5
C/c	Temperatura forno de coluna ($^{\circ}\text{C}$)	30	28
D/d	% fase móvel reconstituição (A:B)	98:2	95:2
E/e	Tempo de equilíbrio (min)	4	3
F/f	Válvula de descarte	4	3
G/g	Fluxo fase móvel (mL min^{-1})	0,55	0,60

Fonte: o próprio autor.

Os sete parâmetros e suas respectivas variações foram combinados em oito experimentos realizados em ordem aleatória e em triplicata. A Tabela 2.5 demonstra a série de combinações do planejamento fatorial para os parâmetros avaliados no teste de Younden. Os resultados das análises são representados por letras de *s* a *z*.

Tabela 2. 5. Matriz de combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.

Parâmetro analítico	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
% de ácido fórmico	A	A	A	A	a	a	a	a
Volume de injeção (µL)	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura forno de coluna (°C)	C	c	C	c	C	c	C	c
% fase móvel reconstituição (A:E)	D	D	d	d	d	d	D	D
Tempo de equilíbrio (min)	E	e	E	e	e	E	e	E
Válvula de descarte	F	f	f	F	F	f	f	F
Fluxo fase móvel (mL min ⁻¹)	G	g	g	G	G	G	G	g
Resultado	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Fonte: (CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A., 2009)

Através da equação 5, foi determinada a influência da variação de cada parâmetro no resultado final.

$$\text{Efeito A/a} = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad (5)$$

4.2.5.6. Teste de estabilidade

Para avaliar a estabilidade do extrato da matriz, uma amostra branca foi fortificada no nível de uma vez o MRPL em triplicata para

cada período de 1, 2, 5, 10, 15 e 30 dias. Os extratos foram armazenados em microtubos de polipropileno com capacidade para 1,5 mL em três temperaturas: ambiente, a -20 °C e a 4 °C. As amostras foram analisadas e o resultado da concentração foi comparado com a concentração nominal através de análise de variância com um nível de significância de 5%.

4.2.5.7. Incerteza de medição (MU)

A MU foi calculada de acordo com o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (ISO/IEC Guia 98-3: 2008 no nível de 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$). O cálculo foi baseado no modelo de medição utilizando padronização externa. As fontes de incerteza identificadas, avaliadas e posteriormente quantificadas foram: incerteza da pesagem, da diluição, a interpolação do sinal analítico na curva de calibração e medição de incerteza associada à precisão. A Equação 6 foi utilizada para calcular as concentrações de PAs em $\mu\text{g kg}^{-1}$ como segue:

$$C_{PA_s} = \left(\left(\frac{L \cdot V}{m} \right) \cdot f_c \right) + R \& R \quad (6)$$

Onde C_{PA_s} é a concentração do analito ($\mu\text{g kg}^{-1}$); m a massa de amostra (g); V é o volume da solução de extração (mL); L resultados a partir da curva de calibração ($\mu\text{g kg}^{-1}$); f_c é o fator de correção da pureza do padrão (adimensional) e $R \& R$ é a precisão intra-dia e inter-dia.

A determinação da incerteza padrão combinada foi obtida correlacionando incertezas de padrão de saída. O cálculo foi realizado de acordo com a propagação da incerteza utilizando a Equação 7:

$$u_c^2(C(L, m, V, f_c, R\&R)) = \left(\frac{\partial C}{\partial L}\right)^2 \cdot (\sigma L)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial m}\right)^2 \cdot (\sigma m)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial V}\right)^2 \cdot (\sigma V)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial f_c}\right)^2 \cdot (\sigma f_c)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial R\&R}\right)^2 \cdot (\sigma R\&R)^2 + 2 \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial V}\right) \cdot (\sigma V) \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial f_c}\right) \cdot (\sigma f_c) \cdot r_{V, f_c} \quad (7)$$

Onde $u_c(C)$ é a incerteza padrão combinada; C é a medição; $(L, M, V, f_c, R\&R)$ são variáveis de medição; $(\sigma x_i)^2$ e (σx_j) é a incerteza padrão de saída; $\frac{\partial C}{\partial x_i}$ e $\frac{\partial C}{\partial x_j}$ coeficientes de sensibilidade e r_{V, f_c} coeficiente de correlação estimado.

A incerteza expandida (U) foi determinada pela multiplicação da incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência (k) de acordo com a seguinte equação 8:

$$U = k \cdot u_c(C) \quad (8)$$

Onde U é a incerteza expandida; $u_c(C)$ incerteza padrão combinada e k é o fator de abrangência.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE MASSAS

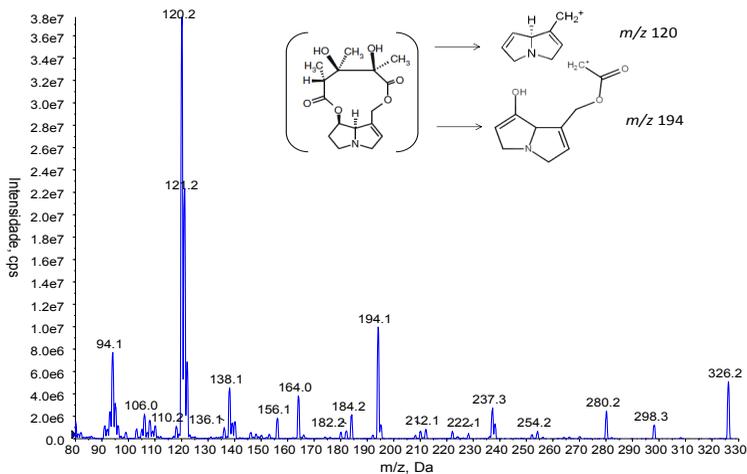
A etapa inicial de detecção consistiu na escolha do modo de ionização (positivo ou negativo) a ser utilizado e na determinação do íon precursor para cada analito. Compostos com caráter básico como os analitos em estudo, apresentam maior intensidade de sinal quando analisados no modo positivo.

Substâncias utilizadas como aditivos que apresentam um caráter ácido, como ácido fórmico ou ácido acético e caráter básico, como hidróxido de amônio ou acetato de amônio, favorecem a protonação ou a desprotonação das moléculas, dependendo da quantidade de sítios ionizáveis do composto de interesse. A utilização de aditivos é fundamental para a estabilidade do sinal na fonte de ionização, uma vez que aumenta a intensidade dos sinais obtidos.

Portanto, para a otimização das condições de MS/MS, foram avaliados os dois modos de ionização. Foram preparadas soluções individuais de cada alcaloide na concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em uma mistura de acetonitrila/água (1:1, v/v) e para a avaliação do modo positivo foi adicionado a esta solução 0,1% de ácido fórmico (v/v). Para a avaliação no modo negativo foi adicionado 0,05% de hidróxido de amônio. Todas as soluções foram infundidas no espectrômetro de massas e a intensidade de sinal foi avaliada. O modo positivo apresentou a melhor resposta instrumental para todos os analitos em estudo, com a obtenção de íons $[\text{M}+\text{H}]^+$. Nas Figuras 2.1 a 2.8, são apresentados os

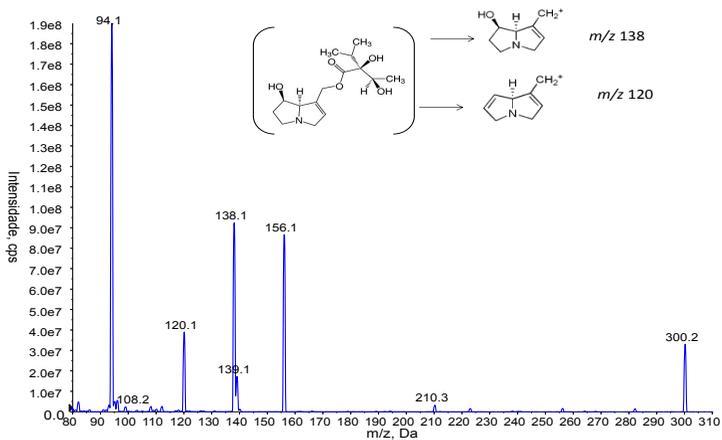
espectros de massa de cada composto e as estruturas sugeridas para os íons produtos observados.

Figura 2. 1. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da monocrotalina em ESI positivo.



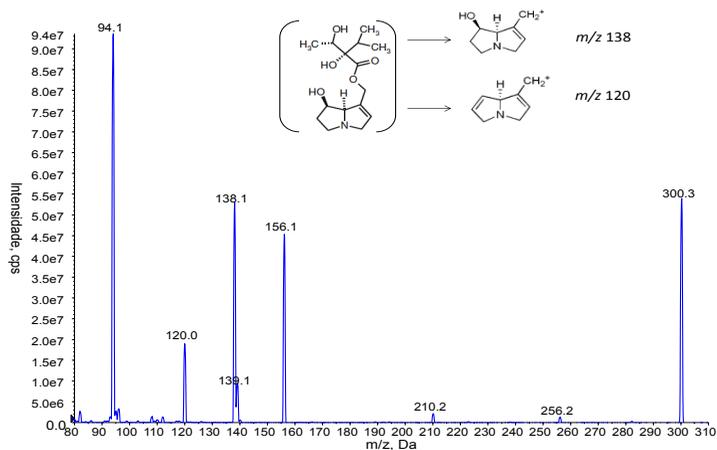
Fonte: O próprio autor.

Figura 2. 2. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da intermidina em ESI positivo.



Fonte: O próprio autor.

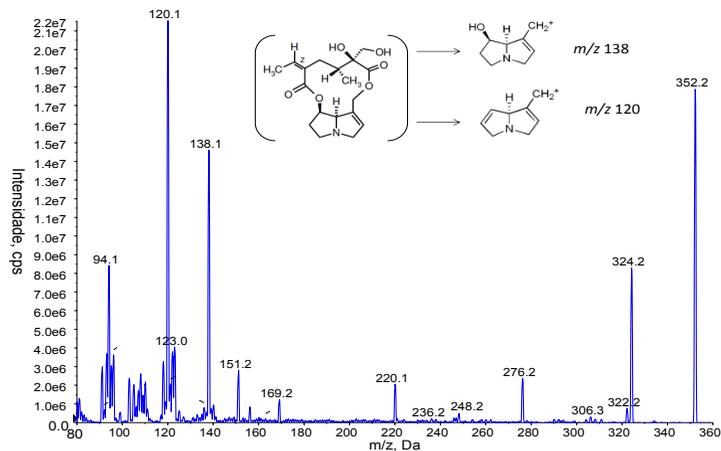
Figura 2. 3. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da licopsamina em ESI positivo.



Fonte:

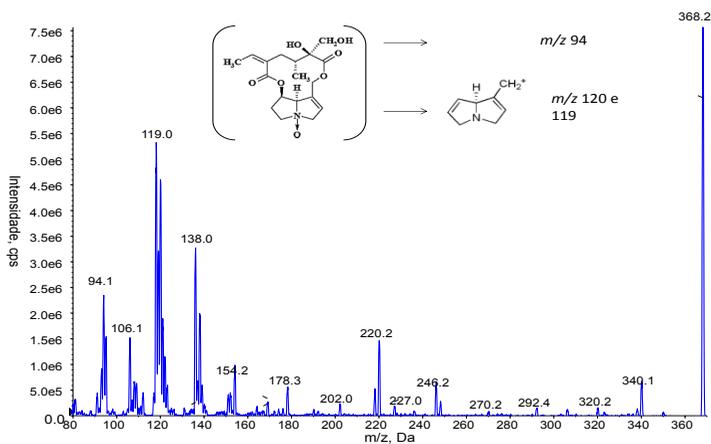
O próprio autor.

Figura 2. 4. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da retrorsina em ESI positivo.



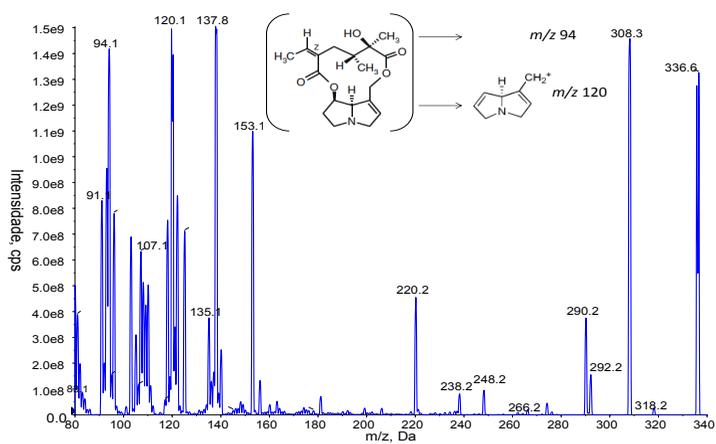
Fonte: O próprio autor.

Figura 2. 5. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da retrorsina-N-óxido em ESI positivo.



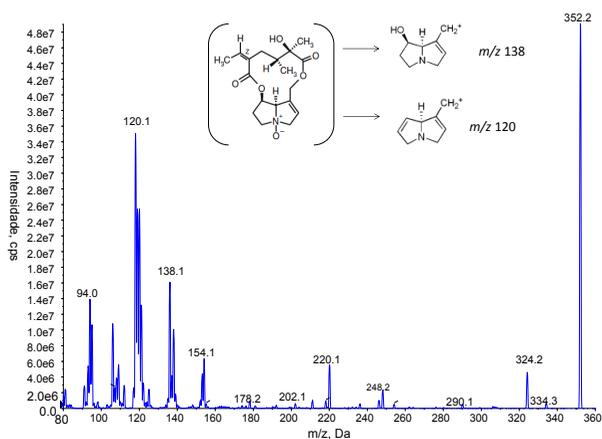
Fonte: O próprio autor.

Figura 2. 6. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da senecionina em ESI positivo.



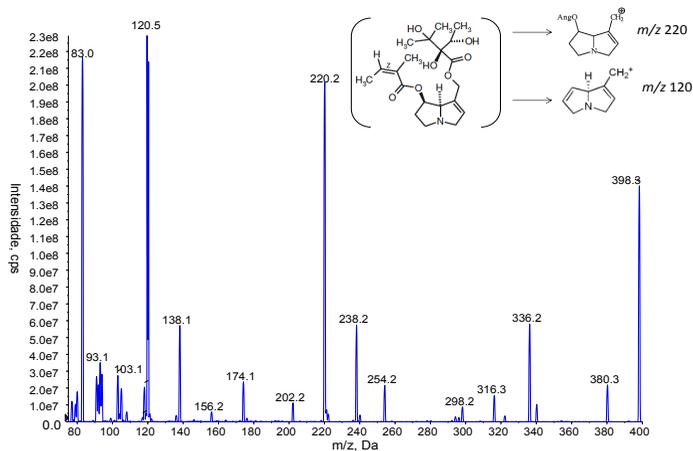
Fonte: O próprio autor.

Figura 2. 7. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da senecionina-N-óxido em ESI positivo.



Fonte: O próprio autor.

Figura 2. 8. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da equimidina em ESI positivo.



Fonte: O próprio autor.

Todos os fragmentos selecionados para os analitos estão de acordo com a literatura (AVULA, 2015; BOLECHOVA, 2015; JAHOUCH, 2015; MARTINELLO, 2017). As moléculas apresentaram em comum os fragmentos m/z 138, 120 e 94 que são característicos de compostos monoésteres, diésteres cíclicos e acíclicos. Estes representam a estrutura da base necina ligada independente do éster de ácido néxico. A licopsamina e a intermidina apresentaram o fragmento m/z 156 mais intenso quando comparado ao m/z 120, porém quando avaliada a matriz branca, este fragmento apresentou muito ruído na transição, não sendo um bom fragmento de confirmação.

Como foi observado, a licopsamina e a intermidina possuem a mesma m/z com os mesmos fragmentos, assim como a senecionina-N-óxido e a retrorsina, que são estereoisômeros. O detector utilizado neste trabalho, não possui uma resolução de massa adequada para diferenciação destes analitos, sendo assim é necessário que ocorra uma separação cromatográfica eficiente para identificação dos mesmos.

Os PAs foram determinados quantitativamente pelo modo MRM através do monitoramento de três transições de massa para cada íon precursor $[M+H]^+$, que confere ao método analítico um número de cinco pontos de identificação recomendado pela Comunidade Europeia (Commission Decision 2002/657/EC) para resíduos proibidos: i) seleção de um íon precursor; ii e iii) dois íons produtos e iv) tempo de retenção. Utilizou-se o fragmento mais intenso de cada alcaloide como íon de quantificação e as outras duas transições como íons de confirmação, conforme a seção 2.2.

2.3.2 OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA

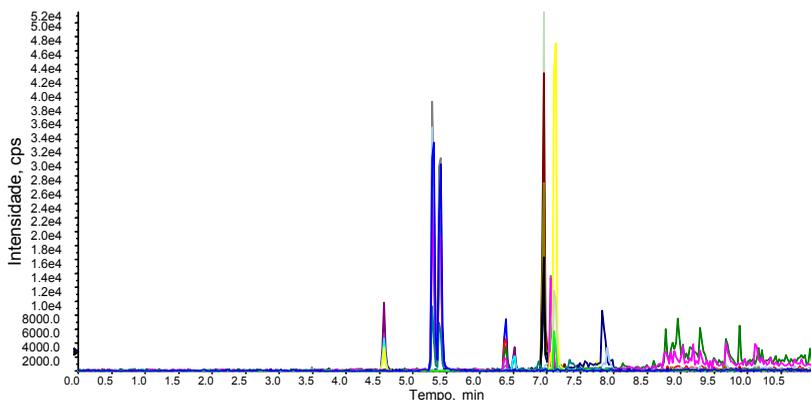
De acordo com as características químicas dos analitos, foram avaliadas diversas colunas cromatográficas de fase reversa com diferentes grupos funcionais (C_{18} , C_8 e fenil) perante aos parâmetros de simetria dos picos, resolução cromatográfica e relação sinal analito/ruído. A coluna que apresentou a melhor separação foi a C_{18} , com a qual foram avaliados diferentes fluxos (de acordo com o tamanho da partícula da coluna cromatográfica), solventes orgânicos (metanol e acetonitrila) e aditivos na fase móvel (ácido fórmico, ácido acético, formiato de amônio, acetato de amônio e hidróxido de amônio). Os solventes metanol e acetonitrila foram testados e observou-se que com uso de acetonitrila uma melhor relação sinal analito/ruído foi obtida, optando assim por trabalhar com acetonitrila. Quando utilizadas concentrações menores que 0,1% (v/v) de ácido e/ou na presença de aditivos de amônio, houve uma perda de sensibilidade, observada pela queda da relação sinal analito/ruído dos analitos. O uso de 0,1% (v/v) de ácido fórmico como aditivo nas duas fases móveis se mostrou relevante, uma vez que garantiu a boa ionização dos analitos na fonte, amplificando seu sinal.

Uma alta proporção de água no início da corrida (98%) torna-se uma estratégia importante para matrizes complexas, pois promove a eluição dos interferentes com caráter hidrofílico durante os primeiros minutos, principalmente com relação aos carboidratos presentes em altas concentrações em matrizes de mel (60-73%). Por outro lado, ao final do gradiente, uma alta porcentagem de solvente orgânico proporciona uma limpeza satisfatória na coluna, minimizando fenômenos de *carryover* (HOFF et al., 2014; MARTINS et al., 2014). Foi incluído um tempo de

equilíbrio da coluna de 4 minutos com a fase móvel inicial para evitar efeitos de *carryover*, prolongar tempo de vida da coluna e para manter a separação estável e reprodutível (MARTINS et al., 2014).

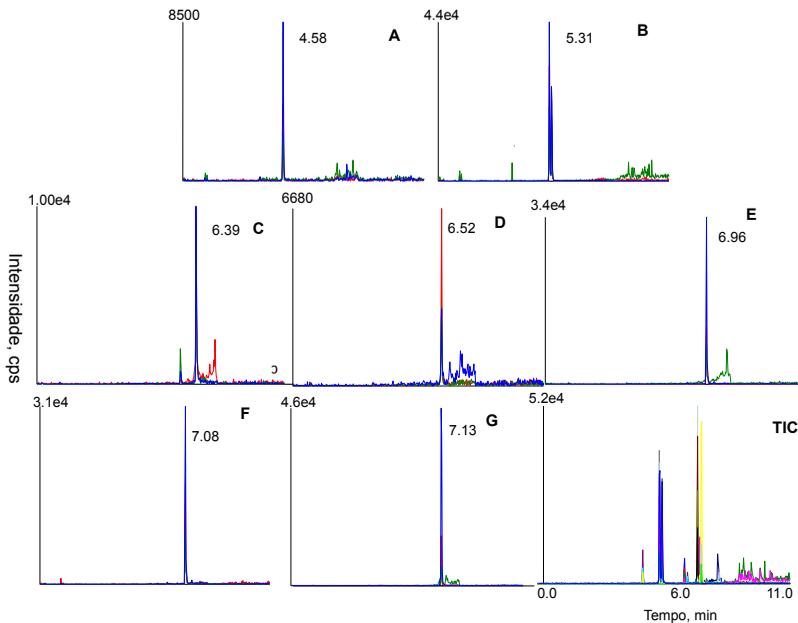
Como estratégia para minimizar a ação de interferentes, principalmente de caráter hidrofílico, foi utilizada uma válvula de desvio para direcionar o fluxo para o descarte antes da eluição dos analitos, assim como foi empregado por Griffin et al. (2013) e Bretanha, Piovezan, Sako, Pizzolati e Micke (2014) em análises de mel. Essa válvula foi aberta durante os quatro minutos iniciais de corrida, evitando assim a contaminação da fonte de ESI com carboidratos, aminoácidos e minerais. A Figura 2.9 ilustra o cromatograma dos PAs e a Figura 2.10, representa os cromatogramas de massas dos íons selecionados para os PAs, onde os picos cromatográficos mostram-se simétricos e com resolução adequada em um tempo total de 11 minutos.

Figura 2. 9. Cromatograma dos oito alcalóides pirrolizidínicos.



Fonte: O próprio autor.

Figura 2. 10. Cromatograma de íons selecionados dos oito alcaloides pirrolizidínicos. A. Monocrotalina. B. Licopsamina+ Intermidina. C. Retrorsina. D. Retrorsina-N-óxido. E. Senecionina. F. Senecionina-N-óxido. G. Equimidina.



Fonte: o próprio autor.

Apesar da co-eluição não ser um fator limitante quando utilizada a espectrometria de massas, é tecnicamente desejada a separação dos picos e se torna fundamental quando compostos apresentam fragmentos de quantificação e confirmação a partir do mesmo íon precursor, principalmente para espectrômetros de massa de baixa resolução.

A retrorsina e a senecionina-N-óxido mesmo sendo estereoisômeros separaram-se cromatograficamente (Figuras 2.10.C e 2.10.F). A equimidina e a senecionina-N-óxido co-eluíram, porém, como apresentam m/z diferente, é possível diferenciá-las por meio do cromatograma de massas de íons selecionados, que monitora individualmente cada transição m/z (Figura 2.10.G e Figura 2.10.F). A licopsamina e intermidina possuem mesma m/z com os mesmos íons produtos, e apesar de apresentarem duas bandas cromatográficas (Figura 2.10.B), quando injetados separadamente os padrões destes analitos apresentaram o mesmo perfil cromatográfico de duas bandas, sugerindo que eles são uma misturas dos dois isômeros, mesmo os padrões tendo pureza certificada pelos fabricantes, sendo assim, não foi possível diferencia-los. Portanto, a quantificação foi considerada como a soma dos dois (LYC + INT), de acordo com BEALES et al. (2004) e MULDER, SANCHEZ, THESE, PREISS-WEIGERT e CASTELLARIC (2015).

2.3.3. PREPARO DA AMOSTRA

Como relatado na revisão da literatura, a grande maioria dos trabalhos reportados utilizam a técnica de extração em fase sólida, devido às baixas concentrações dos analitos e a complexidade das matrizes estudadas. Entretanto, no presente trabalho buscaram-se alternativas ao uso de SPE, com o intuito de se ter um preparo de amostra simples, que não fosse laborioso e tampouco com muitas etapas, visando aumentar a frequência analítica em um laboratório de rotina e também o uso de alternativas ao emprego de solventes orgânicos.

A maioria dos alcaloides possui propriedades alcalinas, devido à presença do átomo de nitrogênio contendo um par de elétrons não-compartilhados. O grau da basicidade é muito variado, dependendo da estrutura da molécula, presença e localização de outros grupos funcionais. Por possuírem esse caráter de base fraca, os alcaloides em soluções aquosas ácidas ou alcalinas são convertidos na forma de sal, onde o nitrogênio libera um íon hidrogênio formando uma amina livre e a protonação do azoto na base livre geralmente resulta em um composto solúvel em água.

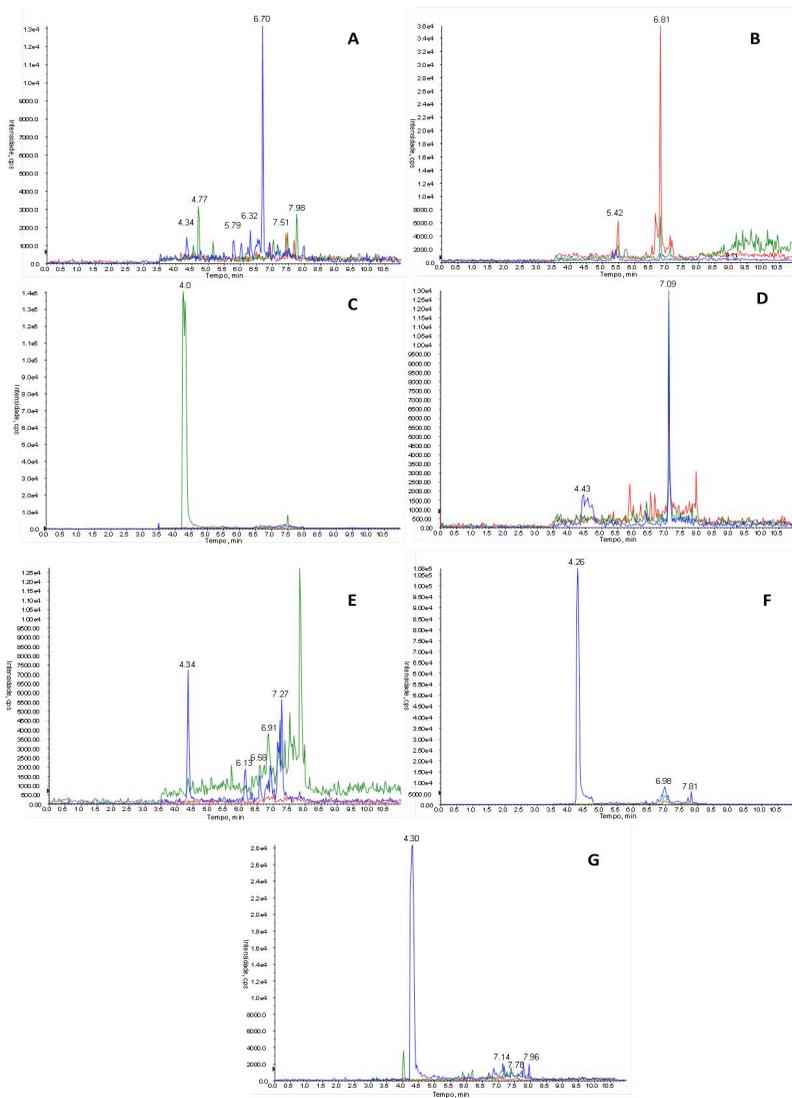
Com base nas informações supracitadas relacionadas às propriedades químicas dos analitos em estudo, foram avaliados cinco tipos de extrações: i) água desionizada; ii) água desionizada aquecida a 65°C iii) solução de ácido sulfúrico 0.05 mol L⁻¹ (DUBECKE, BECKH, LULLMANN, 2011; GRIFFIN et al., 2013; MARTINELLO et al., 2014); iv) solução de ácido fórmico:água (2:98, v/v) (JOOSTEN et al., 2010; HOONGEBOOM et al., 2010); v) metanol:água (1:1, v/v) (LI, et al., 2009; COLEGATE, CAO, EDGAR, 2013). Resultados similares foram obtidos para os quatro solventes utilizados, optando-se pela extração que utiliza apenas água desionizada, pois além de minimizar a toxicidade dos resíduos gerados, sabe-se que uma quantidade elevada de ácido sulfúrico pode prejudicar o sistema de detecção do espectrômetro de massas e proporcionar uma supressão de sinal. Para a extração ii) foi observado um aumento da solubilidade dos açúcares e substâncias particuladas presentes na amostra, mas nenhum ganho de sinal quando comparado à extração em temperatura ambiente.

2.3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

2.3.4.1. Seletividade/especificidade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostra branca com cromatogramas de íons selecionados que continham o analito estudado. A ausência de sinais provenientes de compostos interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção dos analitos, nas respectivas transições m/z , confirmou a seletividade do método. A figura 2.11 ilustra os cromatogramas de íons selecionados para os analitos em estudo no extrato de matriz branca, com picos que eluíram próximos ao tempo de retenção dos analitos, mas sem causar nenhum tipo de interferência da resposta nas transições avaliadas. O cromatograma de íons selecionados da MCT (Figura 2.11.A) revelou a presença de diversas bandas cromatográficas, porém nenhuma no tempo de retenção de 4,58 min, referente ao analito. A figura 2.11. B revela a presença de duas bandas e a figura 2.11. C apenas uma e, nenhum deles são interferentes nos tempos de retenção dos analitos. Para os analitos RET-N (figura 2.11. D), SEN (figura 2.11. E), SEN-N (figura 2.11. F) e ECH (figura 2.11. G) os cromatogramas apresentaram interferência no ruído para as transições avaliadas. Como as intensidades dos sinais foram baixas, principalmente na terceira transição, não se pode afirmar a presença dos analitos na matriz. Estes resultados não interferiram na seletividade do método, já que a relação sinal analito/ruído foi menor que 3. Além disso, os valores da precisão das razões dos íons (Tabela 2.6) foram avaliadas e ficaram dentro dos limites máximos permitidos para as intensidades relativas dos íons recomendados pela Comunidade Europeia em toda a validação e análise das amostras, demonstrando a seletividade do método.

Figura 2. 11. Cromatograma de íons selecionados dos alcalóides pirrolizidínicos. A. Monocrotalina. B. Licopsamina + Intermedina. C. Retrorsina. D. Retrorsina-N-óxido. E. Senecionina. F. Senecionina-N-óxido. G. Equimidina



Fonte: O próprio autor.

Tabela 2. 6. Precisão das razões dos íons de quantificação e confirmação dos alcaloides pirrolizidínicos (PAs).

Analito	Íon de quantificação	Íon de confirmação	Média ^a	SD	RSD	Tolerância (%)
ECH	120,2	220,1	0,24	0,02	8,47	25
LYC + INT	94,1	138,1	0,78	0,05	5,75	20
MCT	120,1	94,1	0,46	0,06	13,39	25
RET	138,1	119,2	0,39	0,07	18,47	25
RET-N	119,0	94,1	0,73	0,08	10,60	20
SEM	120,1	93,9	0,36	0,03	9,39	25
SEN-N	120,1	324,3	0,66	0,07	10,32	20

ECH: equimidina; INT: intermidina; LYC: licopsamina; MCT: monocrotalina;

RET: retrorsina; RET-N: retrorsina-N-óxido; SEN: senecionina; SEN-N: senecionine-N-óxido; SD, desvio padrão; RSD, desvio padrão relativo. ^a Média da razão dos íons de 60 amostras e 60 soluções-padrão.

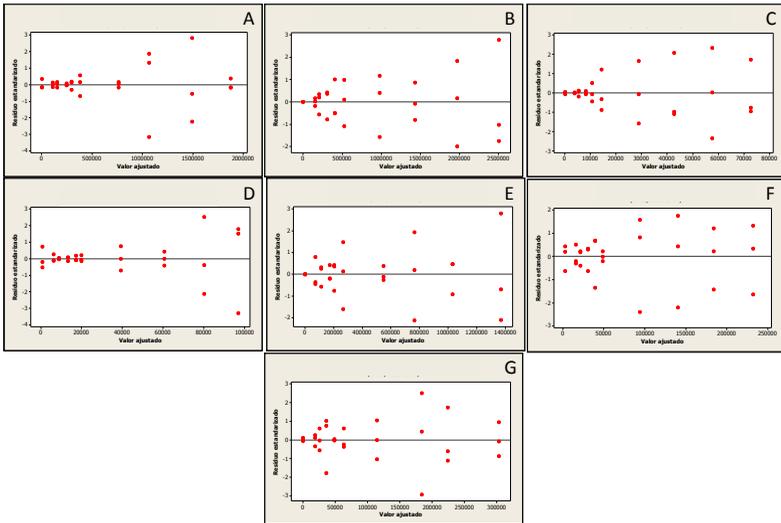
2.3.4.2. Linearidade e efeito de matriz

Neste estudo, foi utilizada uma ampla faixa linear, devido à diferença de concentração entre as amostras e a expectativa de concentrações elevadas dos analitos como observado por outros autores (BETTERIDGE, CAO, COLEGATE, 2005; DUBECKE, BECKH, LULLMANN, 2011; GRIFFIN et al., 2013; MARTINELLO et al., 2014;). A linearidade foi confirmada para todas as curvas estudadas (CCAS, CCMBF e CCEMBF), com coeficientes de determinação superiores a 0,99 para as curvas em solvente e 0,95 para as curvas em matriz.

Através do teste de Grubbs, não foi verificado nenhum valor extremo da regressão dos resíduos para nenhuma curva avaliada. Pelo

método de inspeção visual dos resíduos não foram observadas tendências para as curvas, conforme mostra a figura 2.12.

Figura 2. 12. Gráficos dos resíduos da regressão das curvas de APs em solvente. A. Equimidina. B. Licopsamina + Intermedina. C. Retrorsina. D. Retrorsina-N-óxido. E. Senecionina. F. Senecinina-N-óxido. G. Monocrotalina.



Fonte: o próprio autor.

Apesar dos resultados encontrados na inspeção visual e pelos coeficientes de determinação, estes não são adequados para verificação da linearidade e falta de ajuste do modelo, pois estão propensos a erros de interpretação. Sendo assim, são necessários testes estatísticos mais aprofundados para verificar o grau de ajuste dos dados da curva (BURKE, 2001; JUNKEIRA; SOUZA; GINN, 2005).

Para avaliar a distribuição normal dos resíduos, o teste de Anderson-Darling foi aplicado e os desvios da normalidade foram significativos ($p < 0,05$), portanto, a distribuição dos resíduos não apresentou normalidade. A distribuição dos resíduos da regressão não foi homogênea ao longo dos níveis para todas as curvas, demonstrando heteroscedasticidade, pois o teste de Bartlett foi significativo ($p < 0,05$) para todos os analitos. Houve independência dos resíduos da regressão para todas as curvas, uma vez que a estatística de Durbin-Watson calculada foi de 2,14 para a ECH; 1,41 para LYC + INT; 1,37 para a MCT; 2,24 para a RET; 1,70 para a RET-N, 1,39 pra a SEN e 1,63 para a SEN-N. Estas afirmativas foram comprovadas por meio dos valores críticos tabelados de Durbin-Watson para $n = 30$, onde $dL = 1,35$ e $dU = 1,49$, o qual estabelece que para que haja independência dos resíduos, estes valores devem estar de acordo com o teste, onde $dU < dw < 4-dU$ (DURBIN-WATSON, 1951).

As premissas de que os resíduos da regressão não seguem uma distribuição normal, são heteroscedásticos e independentes, foram confirmadas para todas as curvas dos analitos em estudo. Estes resultados demonstram que o método dos mínimos quadrados ordinários não seria eficiente e poderia subestimar a estimativa da variância da regressão e os intervalos de confiança, portanto, estudos mais aprofundados foram realizados para o ajuste da função (JUNKEIRA, SOUZA, GINN, 2005).

Quando a curva analítica se mostra heteroscedástica, é recomendado ajustá-la utilizando um modelo de regressão linear ponderada ou reduzir a faixa de calibração. As curvas de calibração foram divididas em duas faixas lineares (0 a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 10 a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$).

¹) e as premissas de homoscedasticidade foram testadas. Foi verificada a falta de ajuste para as duas curvas, portanto o modelo linear foi ajustado para um modelo de regressão linear ponderada. Desta forma, de acordo com Almeida e colaboradores (2002), fez-se avaliação de qual fator de ponderação seria mais adequado ($1/Y$, $1/Y^2$, $1/\sqrt{Y}$, $1/X$, $1/X^2$, $1/\sqrt{X}$) utilizando a equação 1 da seção “Materiais e métodos” para cada analito. A %RE é um indicador útil e sensível para avaliar a qualidade do ajuste de um fator de ponderação e, quanto menor o seu valor, melhor o ajuste (Almeida et al., 2002). Os resultados desta avaliação estão mostrados na tabela 2.7 e os menores valores de %RE foram selecionados como fatores de ponderação e estão destacados na tabela.

Tabela 2. 7. Valores da soma dos erros relativos (%RE) para cada fator de ponderação (w_i) obtidos no ensaio de homocedasticidade (n=30).

Analito	Ordinária	$1/Y$	$1/Y^2$	$1/\sqrt{Y}$	$1/X$	$1/X^2$	$1/\sqrt{X}$
ECH	32,6	31,5	33,2	29,3	32,2	29,5	33,2
LYC + INT	24,5	38,2	33,3	24,6	35,6	32,3	28,8
MCT	52,8	50,0	50,1	61,0	47,6	46,9	47,5
RET	81,4	86,5	92,6	64,7	85,2	65,6	71,9
RET-N	52,8	49,9	49,7	69,5	52,6	65,8	63,6
SEN	32,5	31,5	33,2	41,2	35,5	39,3	41,3
SEN-N	51,3	43,9	41,8	51,5	54,1	49,9	54,7

ECH: equimidina; INT: intermidina; LYC: licopsamina; MCT: monocrotalina;

RET: retrorsina; RET-N: retrorsine-N-óxido; SEN: senecionina; SEN-N:

senecionina-N-oxide. Fonte: o próprio autor.

Para a ECH, LYC+INT e RET, o fator de ponderação que utiliza a variância ($1/\sqrt{Y}$) apresentou a menor redução de %ER quando

comparado aos valores obtidos da regressão ordinária. Já o fator $1/Y^2$ apresentou os menores valores para a RET-N e SEN-N. Para a SEN o menor fator foi $1/Y$ e para a MCT $1/X^2$. A Tabela 2.8 mostra os parâmetros das curvas analíticas utilizando a regressão ponderada com o fator de ponderação escolhido para cada analito.

Tabela 2. 8. Parâmetros da curva de calibração e efeito de matriz.

Analitos	Equação da curva analítica ajustada	R ²	ME
ECH	$y=6.66x10^4x-164$	0,998	0,944
LYC + INT	$y=4.39x10^4x-1.128x10^4$	0,997	0,936
MCT	$y=5.03x10^3x+667$	0,998	1,01
RET	$y=553x+227$	0,992	0,941
RET-N	$y=1.52x10^3x+518$	0,995	0,983
SEN	$y=2.59x10^4x+930$	0,996	0,949
SEN-N	$y=4.43x10^3x+697$	0,996	0,945

r² - coeficiente de regressão; ME – efeito de matriz; ECH: equimidina; INT: intermidina; LYC: licopsamina; MCT: monocrotalina; RET: retrorsina; RET-N: retrorsine-N-óxido; SEN: senecionina; SEN-N: senecionina-N-oxide. Fonte: O próprio autor.

O ajuste linear ponderado foi eficiente no modelamento das curvas analíticas, não havendo a necessidade de se recorrer a modelos mais complexos, como o quadrático. O comportamento heteroscedástico das respostas mostrou-se frequente em todos os experimentos realizados, indicando o que parece ser uma característica das respostas instrumentais da técnica de LC-MS/MS.

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por meio da razão do coeficiente angular obtido das curvas de calibração de matriz fortificada após a extração e da curva em solvente. Para razões abaixo

de 0,9 ou acima de 1,1, o efeito de matriz está associado com supressão ou ganho de sinal, respectivamente. E para valores dentro desse intervalo, o ME é considerado insignificante. De acordo com a tabela 2.8, para todos os analitos em estudo, essa razão ficou dentro do intervalo de 0,9 a 1,1, demonstrando que para a quantificação dos analitos, não é necessária a preparação das curvas de calibração em matriz.

2.3.4.3. Precisão e exatidão

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação por adição de padrão (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002). A exatidão foi avaliada pelo ensaio de recuperação relativa, no qual foram adicionadas concentrações conhecidas de padrões de PAs na matriz branca antes da extração, nos três níveis de interesse (1,0; 1,5 e 2,0 vezes o MRPL). Os valores obtidos para estes ensaios encontram-se na Tabela 2.9 e foram satisfatórios, uma vez que ficaram na faixa de 93 a 110%, e de acordo com o protocolo de validação adotado, os valores aceitos para as concentrações em estudo são de 70 a 110%.

A precisão intra-ensaio foi determinada também nos três níveis de interesse (1,0; 1,5 e 2,0 vezes o MRPL) através da adição de padrões de PAs na matriz branca antes da extração e 21 injeções foram realizadas. Cada nível foi preparado em triplicata e os ensaios foram realizados no mesmo dia, com mesmo equipamento e mesmo analista.

Já para a avaliação inter-ensaio, seguiu os mesmos parâmetros da intra-ensaio, porém, foi realizada em dia diferente com outro analista. Ambas as precisões são mostradas na Tabela 2.9. Para a medida da precisão intra-ensaio, o desvio padrão relativo foi inferior a 6,3% para os níveis estudados e inferiores a 10,2% para a precisão inter-ensaio. Estes valores estão de acordo com o protocolo da Comissão Europeia 2002/657/CE, onde para os níveis de concentração trabalhados, este deve ser inferior a 20%, demonstrando boa precisão do método.

Tabela 2. 9. Parâmetros de validação do método otimizado para os oito PAs por LC- MS/MS.

Nível de fortificação	ECH	LYC + INT	MCT	RET	RET-N	SEN	SEN-N
Recuperação (%)							
4,0 µg kg⁻¹	102,0±	99,6±	100,0±	101,0±	101,0±	94,9±	99,7±
	2,81	3,67	4,12	3,98	5,15	3,21	3,67
6,0 µg kg⁻¹	98,8±	99,2±	103,0±	98,9±	99,9±	99,4±	100,0±
	2,45	4,01	0,99	1,23	3,29	2,43	2,43
8,0 µg kg⁻¹	97,9±	97,6±	101,0±	100,0±	99,1±	97,7±	99,8±
	1,81	3,11	1,10	0,86	2,81	2,11	1,95
Precisão intra-ensaio^a (n=21)							
4,0 µg kg⁻¹	2,2	4,5	10,2	5,4	4,0	5,9	6,3
6,0 µg kg⁻¹	1,7	2,3	1,4	3,5	2,5	4,0	4,5
8,0 µg kg⁻¹	3,4	3,2	5,5	3,8	3,4	3,2	3,3
Precisão inter-ensaio^a (n=63)							
4,0 µg kg⁻¹	2,2	4,5	10,2	5,7	4,1	6,0	7,1
6,0 µg kg⁻¹	1,8	3,3	1,6	3,7	2,7	4,1	6,3
8,0 µg kg⁻¹	3,5	3,4	5,7	4,1	3,6	3,6	3,5

^a Os resultados da precisão estão expressos em desvio padrão relativo (%RSD).

ECH: equimidina; INT: intermidina; LYC: licopsamina; MCT: monocrotalina;

RET: retrorsina; RET-N: retrorsina-N-óxido; SEN: senecionina; SEN-N:

senecionina-N-óxido. Fonte: O próprio autor.

2.3.4.4. Limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β)

Os valores encontrados para LOD e LOQ, mostrados na tabela 2.10, ficaram na faixa de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 0,2 a 1,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados ficaram abaixo dos LOD de métodos reportados em literatura que fazem uso de estratégias de concentração dos analitos na amostra (DUBECKE et al., 2011; HOOGENBOOM et al., 2011; COLEGATE et al., 2013) ou que utilizam um grande volume de injeção no sistema de LC para aumentar a detectabilidade do método (BRETANHA et al., 2014).

Os limites de decisão e capacidade de detecção são parâmetros definidos no protocolo de validação adotado da Comissão Europeia 2002/657/CE, que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão. O CC α definiu o menor nível de concentração no qual o método possui uma certeza estatística que os PAs estão presentes na matriz. E a CC β representou a menor quantidade de PAs que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada nas amostras de mel com uma probabilidade de erro aceitável. Todos os valores foram satisfatórios, como mostra a tabela 2.10, com valores máximos de CC α e CC β de 0,93 e 1,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. E estes valores foram inferiores ao MRPL adotado, mostrando que é possível determinar e quantificar os analitos com segurança.

Tabela 2. 10. Limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção $CC\beta$ para os alcaloides pirrolizidínicos

Analitos	LOD*	LOQ*	$CC\alpha$*	$CC\beta$*
ECH	0,1±0,01	0,2±0,01	0,5	0,8
LYC + INT	0,1±0,01	0,2±0,01	0,5	0,9
MCT	0,3±0,02	0,5±0,03	0,9	1,6
RET	0,1±0,01	0,2±0,02	0,7	1,1
RET-N	1,0±0,08	1,5±0,10	1,6	1,7
SEN	0,1±0,01	0,2±0,03	0,7	1,1
SEN-N	0,2±0,02	0,5±0,04	0,7	1,1

* Valores em $\mu\text{g kg}^{-1}$ ECH: equimidina; INT: intermidina; LYC:

licopsamina; MCT: monocrotalina; RET: retrorsina; RET-N: retrorsina-N-óxido; SEN: senecionina; SEN-N: senecionina-N-óxido. Fonte: O próprio autor.

2.3.4.5. Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é frente às variações nas condições experimentais que podem variar a resposta durante uma rotina de análises do laboratório. De acordo com a tabela 2.11, o método mostrou-se robusto quando submetido a pequenas variações nos parâmetros analisados, como podemos observar com os resultados encontrados. Os parâmetros que mais influenciaram nas respostas foram a porcentagem de ácido fórmico na fase móvel, que influencia diretamente na protonação dos analitos, favorecendo a ionização. O segundo fator que mais influenciou foi a temperatura de forno de coluna.

Tabela 2. 11. Efeito dos parâmetros analíticos na quantificação do método para os alcaloides pirrolizidínicos.

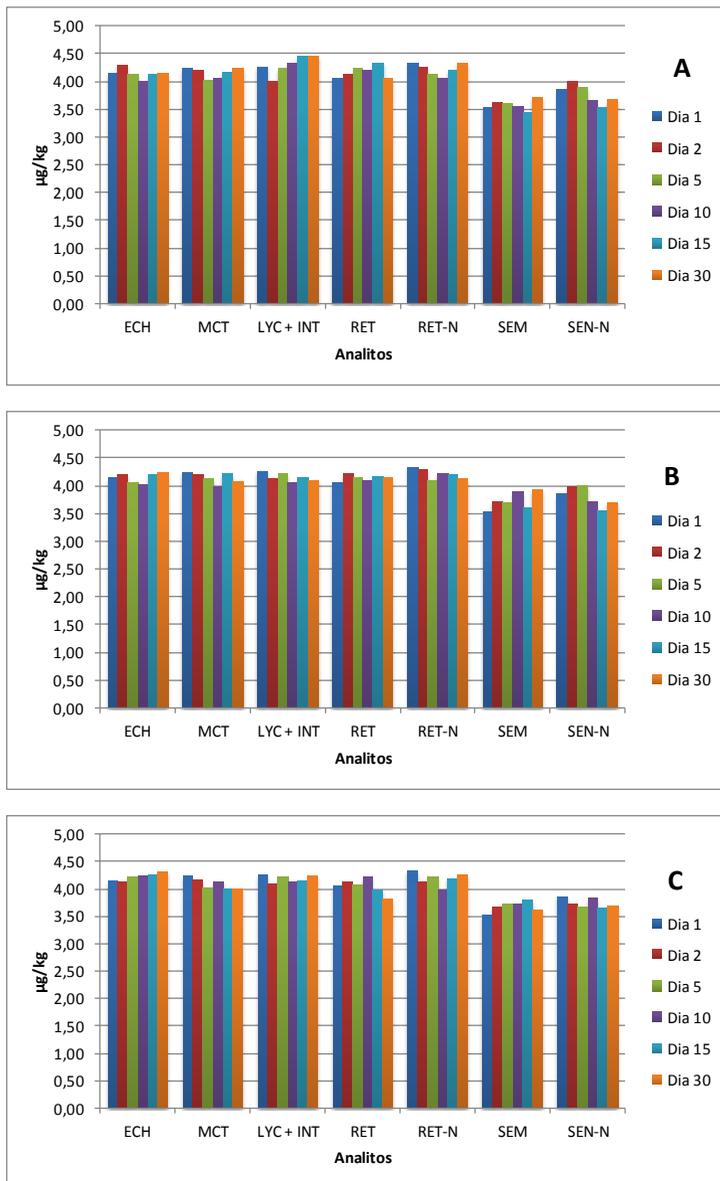
Efeito	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
	ECH	LYC + INT	MCT	RET	RET-N	SEN	SEN-N
% de ácido fórmico	0,024	0,056	0,079	-0,062	0,061	-0,078	0,101
Volume de injeção (μL)	-0,015	0,106	0,006	-0,003	0,040	0,059	-0,091
Temperatura forno de coluna ($^{\circ}\text{C}$)	0,011	0,193	-0,026	0,089	-0,033	-0,121	0,010
% fase móvel reconstituição (A:B)	0,024	0,056	0,075	-0,057	-0,014	-0,078	-0,007
Tempo de equilíbrio (min)	0,011	-0,137	0,038	0,056	-0,006	-0,072	-0,034
Válvula de descarte	0,007	-0,028	-0,060	0,086	-0,025	0,115	0,064
Fluxo fase móvel (mL min^{-1})	0,068	-0,109	-0,033	-0,034	-0,017	0,034	0,027

ECH: equimidina; INT: intermidina; LYC: licopsamina; MCT: monocrotalina; RET: retrorsina; RET-N: retrorsina-N-óxido; SEN: senecionina; SEN-N: senecionina-N-óxido. Fonte: O próprio autor.

2.3.4.6. Estabilidade

O estudo de estabilidade demonstrou que no período de 30 dias os extratos de matriz branca fortificadas em todas as temperaturas de armazenamento estudadas foram estáveis, conforme observado na figura 2.13. Não foi observado um decréscimo significativo de concentração dos analitos com a aplicação do teste t-Student ($t_{\text{crit}} < t_{\text{calc}}$).

Figura 2. 13. Estudo de estabilidade em extrato de matriz branca fortificada no MRPL. A. Temperatura ambiente. B. Temperatura de 4°C. C. Temperatura de -20°C.



Fonte: O próprio autor.

2.3.4.7. Incerteza de medição

A estimativa da incerteza de medição não é exigida no protocolo de validação da Comissão Europeia 2002/657/CE, já que as decisões são tomadas levando em consideração somente os níveis de interesse. Entretanto, a confiabilidade dos resultados em qualquer faixa de quantificação de um método também é de fundamental importância. Neste estudo, o método apresentado no ISO GUIDE (1998) foi adaptado com sucesso para calcular a incerteza de medição do método cromatográfico. Os valores da incerteza padrão para os analitos estão demonstrados no Apêndice A. Como é possível observar, as maiores contribuições para MU foram para a precisão (97,9 a 99,1%), seguida do volume de extração (0,8 – 2,0%). A MU considera outras fontes de incerteza, tais como os efeitos aleatórios do tipo B, como: processos analíticos de pesagem, erros de amostragem, de diluição, impureza de padrões, interpolação do sinal analítico em curvas de calibração, resolução de equipamentos, incertezas de instrumentos de medida, entre outras, e do tipo A, como: curvas de calibração e precisão. Como eram esperados, os valores de incerteza foram superiores aos valores de $CC\beta$, já que este leva em consideração apenas o desvio da curva de calibração e a precisão.

2.3.4.8. Aplicabilidade do método

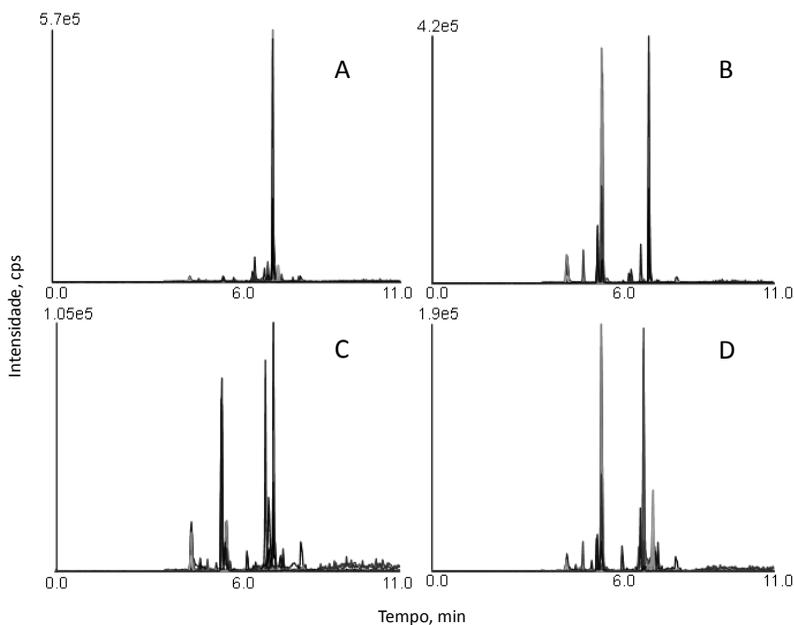
O método validado foi aplicado para a determinação de PAs em diversas amostras de mel do Brasil. A Figura 2.14 ilustra os cromatogramas de quatro amostras de méis de diferentes regiões, onde é possível verificar a diferença entre os perfis cromatográficos atribuídos

às floradas e origens geográficas distintas. Das amostras analisadas, em 99,1% foram detectados pelo menos três PAs e apenas uma foi considerada isenta (<LOD). A Tabela 2.19 apresenta as concentrações mínimas, máximas, média e mediana de cada alcaloide e quantas amostras tiveram a presença dessas substâncias. O PA mais abundante, presente em 92,3% de amostras positivas e que apresentou a maior concentração foi a senecionina-N-óxido com $248,0 \pm 14,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a senecionina com $180,1 \pm 10,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ presentes em 84,6% das amostras. A menor concentração foi observada para a equimidina (com uma concentração máxima de $17,7 \pm 5,1 \mu\text{g kg}^{-1}$), encontrada em apenas 7,7% das amostras analisadas. A soma total dos analitos variaram de <LOD até $423,4 \mu\text{g kg}^{-1}$. No entanto, a concentração total de PAs pode ser substancialmente maior do que o relatado, visto que neste estudo oito PAs foram considerados e muitos outros poderiam ter sido detectados.

Com base na estimativa de consumo mundial de 20 g de mel por dia e de modo a limitar a ingestão diária de menos de $1 \mu\text{g PA}$, o mel não deve conter mais do que $50 \mu\text{g PA/kg}$ (DÜBECKE, BECKH, LÜLLMANN, 2011; GRIFFIN et al., 2013; KEMPF et al., 2008). Entre as amostras analisadas, 35% apresentaram concentrações superiores a este valor. Das amostras avaliadas, 84 foram positivas para um ou dois PAs do tipo senecionina e 62 foram positivas para PAs do tipo licopsamina. Monocrotalina foi encontrada em 70 das 92 amostras analisadas. As plantas das tribos Eupatorieae contêm frequentemente licopsamina e/ou os seus isômeros (HARTMANN, WITTE, 1995; EDGAR, ROEDER, MOLYNEUX, 2002). Embora a senecionina também ocorra em plantas de outros gêneros, a grande maioria das

plantas contendo senecionina pertence ao gênero *Senecio*, enquanto monocrotalina é o alcaloide predominante nas plantas de *Crotalaria* (PALOMINO, VAZQUEZ, 1991; HARTMANN, WITTE, 1995; CHEECKE, 1998).

Figura 2. 14. Cromatograma de monitoramento de múltiplas reações dos oito alcaloides pirrolizidínicos de quatro amostras de méis comerciais diferentes. A. Bocaina do Sul 1. B. São Joaquim 2. C. Urupema 1. D. São Joaquim 1.



Fonte: O próprio autor.

Tabela 2. 12. Concentrações máximas, mínima, média, mediana e número de amostras de mel positivas para alcaloides pirrolizidínicos.

	PAs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
	LYC + INT	MCT	SEN	SEN-N	RET	RET-N	ECH
Mínimo	<LOD	<LOD	1,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Máximo	21,8	16,0	180,0	248,0	32,2	55,7	17,7
Média	3,5	3,2	20,8	8,1	5,6	5,5	3,8
Mediana	1,9	2,5	4,4	4,3	0,5	2,6	0,3
Número de amostras positivas	62	70	77	84	45	23	7

LYC: licopsamina; INT: intermidina; MCT: monocrotalina; SEN: senecionina;

SEN-N: senecionina-N-óxido; RET: retrorsina; RET-N: retrorsina-N-óxido;

ECH: equimidina. Fonte: O próprio autor.

2.4. CONCLUSÃO

As premissas de que os resíduos da regressão não seguem uma distribuição normal, são heteroscedásticos e independentes foram confirmadas para todas as curvas dos analitos em estudo. Portanto, as curvas analíticas foram ajustadas utilizando um modelo de regressão linear ponderado, obtendo assim resultados mais confiáveis e com maior exatidão. Os parâmetros de desempenho analíticos de acordo com o protocolo de validação da Comissão Europeia 2002/657/CE foram adequados para uso, em termos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, $CC\alpha$, $CC\beta$, estabilidade e robustez. Além disso, não foram observados efeitos de matriz. Uma vez que os métodos descritos na literatura adotam estratégias de pré-concentração, o LOD e LOQ encontrados neste estudo foram satisfatórios, já que foram menores que os métodos reportados na literatura. No método proposto, oito PAs foram determinados em 11 minutos, com uma separação satisfatória. O método proposto possui preparo de amostra simples, rápido e eficiente e a aplicabilidade do método foi verificada em 92 amostras comerciais, mostrando bom desempenho analítico que o torna adequado para aplicação em laboratórios de alimentos para a análise de rotina. Entre as amostras analisadas, 35% apresentaram concentrações superiores aos valores recomendados para ingestão diária em 99,1% das amostras avaliadas foram detectados pelo menos três PAs, senecionina, senecionina-N-óxido e monocrotalina.

2.5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 215–222, 2002.

ANDERSON, T.W.; DARLING, D.A. A test of Goodness of fit. **Journal of the American Statistical Association**, 49, 1954.

AL-TAHER, F.; BANASZEWSKI, K.; JACKSON, L.; ZWEIGENBAUM, J.; RYU, D.; CAPPOZZO, J. Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 2378-2384, 2013.

BEALES, K.A.; BETTERIDGE, K.; COLEGATE, S.M.; EDGAR, J.A. Solid-Phase Extraction and LC-MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6664-6672, 2004.

BETTERIDGE, K.; CAO, Y.; COLEGATE, S. M. Improved method for extraction and LC–MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey: Application to *Echium vulgare* honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1894–1902, 2005.

BOLECHOVÁ, M.; CASLAVSKY, J.; POSPICALOVA, M., KOSUBOVÁ, P. UPLC–MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed. **Food Chemistry**, v. 170, p. 265-270, 2015.

BOPPRE, M.; COLEGATE, S.M.; EDGAR, J.A.; FISCHER, O.W. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5662-5672, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, **Manual de garantia da qualidade analítica**, 1st ed., MAPA/ACS, Brasília, 2011

BRETANHA, L.C., PIOVEZAN, M., SAKO, A.F.V., PIZZOLATI, M.G., MICKE, G.A. Strategy for a fast and simple method for trace determination of senecionine and senecionine n-oxide in honey using large volume injection in HPLC-MS/MS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, p. 681-687, 2014.

CAO, Y., COLEGATE, S.M., & EDGAR, J.A. Persistence of echimidine, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid, from honey into mead. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 106-109, 2013.

CÉSAR, I.B., & PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 235-240, 2009.

CHEECKE, P.R. *Natural toxicants in feeds, forages and poisonous plants*. Danville: Interstate Publishers, 1998.

CHEN, Lu et al. Risk assessment for pyrrolizidine alkaloids detected in (herbal) teas and plant food supplements. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 86, p. 292-302, 2017.

CRAMER, L., BEUERLE, T. Detection and Quantification of Pyrrolizidine Alkaloids in Antibacterial Medical Honeys. **Planta Medica**, v. 78, p. 1976-1982. 2012.

DEINZER, M.L., ARBOGAST, B.L., BUHLER, D.R. Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. **Analytical Chemistry**, v.54, p.1811-1814, 1982.

DEVENTER, K., POZO, O. J., VERSTRAETE, A. G., VAN EENOO, P. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine

analysis in doping control and analytical toxicology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1-13, 2014.

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

Durbin, J., Watson, G.S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression II. **Biometrika**, v. 38, p. 159–178, 1951.

EDGAR, J. A., SMITH, L. W. Transfer of pyrrolizidine alkaloids into eggs: food safety implications. **ACS Symposium Series**, v. 8, p. 118-128, 1999.

EDGAR, J.A., COLEGATE, S. M., BOPPRÉ, M., MOLYNEUX, R.J. Pyrrolizidine alkaloids in food: A spectrum of potential health consequences. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, p. 308–324, 2011.

EDGAR, J.A., MOLYNEUX, R.J., COLEGATE, S.M. Pyrrolizidine alkaloids: potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, p. 4-20, 2015.

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**, 50, 2719-2730, 2002.

European Commission, Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, Official Journal of the European Communities (2002) 8–36.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Scientific opinion on pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Journal, 9, 2406.

EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. 2016.

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

Food and Agriculture Organization of the United Nations statistics division (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>) (Accessed Agosto 2017).

GARDEN, J.S., MITCHELL, D.G., MILLS, W.N. Nonconstant variance regression techniques for calibration-curve-based analysis. **Analytical Chemistry**, v. 52, p. 2310, 1980.

GÓMEZ-PÉREZ, M. L., PLAZA-BOLAÑOS, P., ROMERO-GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ-VIDAL, J. L., GARRIDO-FRENICH, A. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1248, p. 130-138, 2012.

GRIFFIN, C.T., DANAHER, M., FUREY, A. Investigation of pyrrolizidine alkaloids in herbal teas and traditional Chinese medicines sourced in Ireland using LC-ESI-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, p. 940-961, 2014.

GRIFFIN, C.T., DANAHER, M., ELLIOT, C.T., KENNEDY, D.G., & FUREY, A. Detection of pyrrolizidine alkaloids in commercial honey using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1577-1583, 2013.

GRUBBS, F. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**, v.11,p. 1-21., 1969.

HARTMANN, T., WITTE, L. Alkaloids: chemical and biological perspectives. Chapter 4, *Chemistry, biology and chemoeology of the pyrrolizidine alkaloids* (pp 155-233). London, United Kingdom. 1995.

HOFF, R.B., RUBENSAM, G., JANK, L., BARRETO, F., PERALBA, M.C.R., PIZZOLATO, T.M., DÍAS-CRUZ, M. S., BARCELÓ, D. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v.135,p. 443-450, 2014.

HOOGENBOOM, L. A. P., MULDER, P. P. J., ZEILMAKER, M. J., VAN DEN TOP, H. J., REMMELINK, G. J., BRANDON, E. F. A., KLIJNSTRA, M., MEIJER, G. A. L., SCHOTHORST, R., VAN EGMOND, H. P. Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 38, p 359-372, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Vocabulário internacional de metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008). Rio de Janeiro, 2009. [VIM 2009]. Portaria Inmetro no 319, de 23 de outubro de 2009. Tradução autorizada pelo BIPM da 3. ed. internacional do VIM – International Vocabulary of Metrology. Basic and general concepts and associated terms. JCGM 200:2008

ISO/IEC Guide 98-3:2008. (2008). Uncertainty of measurement -- Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995). Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

JOHNSON, E.L., REYNOLDS, D.L., WRIGHT, D.S., PACHLA, L.A. Biological Sample Preparation and Data Reduction Concepts in Pharmaceutical Analysis. **Journal of Chromatography Science**, p. 26, v. 372, 1988.

JOOSTEN, L., MULDER, P. P.J., VRIELING, K., VEENA, J. A., & KLINKHAMERA, P.G.L. The Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in *Jacobaea vulgaris*; a Comparison of Extraction and Detection Methods. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 197–204, 2010.

KAKAR, F., AKBARIAN, Z., LESLIE, T., MUSTAFA, M.L., WATSON, J., EGMOND, H.P., OMAR, M.F., MOFLEH, J. 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, p. 1-7, 2010.

KARNES, H.T., SHIU, G., SHAH, V.P. Validation of Bioanalytical Methods. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 421, 1991.

KEMPF, M., BEUERLE, T., BÜHRINGER, M., DENNER, M., TROST, D., VON DER OHE K., BHAVANAM, V.B.R., SCHEREIER, P. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography–mass spectrometry. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 1193–1200, 2008.

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 & Food Research**, v. 54, p. 158-168, 2010.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I., GHURYE, S.G., HOEFFDING, W., MADOW, W.G., MANN H.B. (Ed.), *Contributions to probability and statistics* (pp. 278/292). Stanford: Stanford University Press. 1960.

LETSYO, E. et al. Pyrrolizidine alkaloids in floral honeys of tropical Ghana and health risk assessment. **Food Additives & Contaminants: Part B**, n. just-accepted, 2017.

LIU, F., WAN, S.Y., JIANG, Z., LI, S.F., ONG, E.S., OSORIO, J.C. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 80, p. 916-923, 2009.

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, 2016.

MARTINELLO, M., CRISTOFOLI, C., GALINNA, A., MUTINELLI, F. 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.

MARTINS, M.T., MELO, J., BARRETO, F., HOFF, R.B., JANK, L., BITTENCOURT, M.S., ARSAND, J.B., & SHAPOVAL, E.E.S. A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 129, p. 374–383, 2014.

MATTOCKS, A. R. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. London: Academic Press. (1986).

MATHON, C., EDDER, P., BIERI, S., & CHRISTEN, P. Survey of pyrrolizidine alkaloids in teas and herbal teas on the Swiss market using HPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 7345-7354, 2014.

MILLER, J.N. Basic Statistical Methods for Analytical Chemistry Part 2. Calibration and Regression Methods. *Analyst*, 116, 3. 1991.

MOLYNEUX, R.J., GARDNER, D.L., COLEGATE, S.M., & EDGAR, J.A. Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 28, p. 293-307, 2011.

MOLOGNONI, L., DE SÁ PLOÊNCIO, L. A., VALESE, A. C., LINDNER, J. D. D., DAGUER, H. A simple and fast method for the inspection of preservatives in cheeses and cream by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Talanta**, v.147, p. 370-382, 2016.

MULDER, P.P.J., SÁNCHEZ, P.L., THESE, A., PREISS-WEIGERT, A., & CASTELLARIC, M. Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. European Food Safety Authority, supporting publication 2015:EN-859, 2015.

MULHOLLAND, M., & HIBBERT, D.B. Linearity and the limitations of least squares calibration. **Journal of Chromatography A**, v. 762, p. 73, 1997.

NICOLICH, R.S., WERNECK-BARROSO, E., & MARQUES, M.A.S. Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 565, p. 97–102, 2006.

PALOMINO, G., VÁZQUEZ, R. Cytogenetic studies in mexican populations of species of *Crotalaria* (Leguminosae - Papilionoideae). **Cytologia**, v. 56, p. 343-351, 1991.

RIZELIO, V.M., TENFEN, L., DA SILVEIRA, R., GONZAGA, L.V., COSTA, A.C., FETT, R. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, v. 15, p. 62-66, 2012.

SCHULZ, M., MEINS, J., DIEMERT, S., ZAGERMANN-MUNCKE, P., GOEBEL, R., SCHRENK, D., SCHUBERT-ZSILAVECZ, M., ABDEL-TAWAB, M. Detection of pyrrolizidine alkaloids in German licensed herbal medicinal teas. *Phytomedicine*, v. 22, p. 648-656, 2015.

SHIMSHONI, J.A., DUEBECKE, A., MULDER, P.P., CUNEAH, O., BAREL, S. Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas peppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, p. 2058-2067, 2015.

SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*, 8th ed., State University press, Iowa., 1989.

THOMPSON, M. Variation of precision with concentration in an analytical system. **Analyst**, v. 113, p. 1579, 1988.

WHO (2011) Discussion paper on pyrrolizidine alkaloids, Joint FAO/WHO food standards programme, Codex committee on contaminants in foods, 5th session, The Hague, The Netherlands, 21–25 March. (ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf5/cf05_14e.pdf) (Accessed September 2015).

WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, p. 282-292, 2011.

WIEDENFELD, H., & EDGAR, J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 137-151, 2011.

YOUNG, W.J., STEINER, E.H. Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 88., 1975.

CAPITULO 3: DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM PÓLEN, PLANTAS *SENECIO BRASILIENSIS* E MEL POR LC-MS/MS

3.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da flora apícola de uma região é importante por identificar espécies vegetais que contribuem na formação do mel produzido em um determinado local, como também é necessário na preservação e multiplicação destas plantas para estabelecer uma apicultura sustentável, quer pela participação direta da abelha por meio da polinização, quer pela ação do homem procurando melhorar as condições apícolas (MORETI et al., 1998; SANTOS; KILL e ARAÚJO, 2006; MENDONÇA et al., 2008).

As abelhas visitam as flores para suprirem suas necessidades nutricionais já que o pólen e o néctar encontrados constituem basicamente sua única fonte de alimento. O pólen é fonte concentrada de proteína com importância vital no desenvolvimento das colônias devido ao seu papel na dieta das larvas, além de constituir a principal fonte de gorduras, vitaminas e minerais, e o néctar é uma complexa mistura de açúcares, sendo uma importante fonte energética (ARRUDA et al., 2013; CAMPOS et al., 2008; SATTTLER et al., 2015).

A análise palinológica constitui em uma análise microscópica do pólen presente no mel e é o método mais utilizado para determinação da origem botânica e geográfica (VORWHOL, 1981; COTTE et al., 2004; PONNUCHAMY et al., 2014). Essa técnica é relevante para se conhecer a origem floral dos méis e para caracterização do produto a ser comercializado. Além disso, ela pode indicar as fontes adequadas de

néctar e pólen, maximizando o seu aproveitamento em áreas de vegetação natural (MORETI et al., 2000; SANTOS et al., 2006).

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56000 espécies de plantas, que corresponde a quase 19% da flora mundial (UNEP-WCMC, 2010; STRASSBURG et al., 2014). Por isso, é de extrema importância conhecer a origem floral das amostras de méis a fim de caracterizar o produto e principalmente melhorar a qualidade do mesmo, visto que existem inúmeras plantas tóxicas que podem causar enfermidades nos seres humanos e animais. Sabe-se que plantas do gênero *Senecio* possuem como princípios ativos tóxicos os alcaloides pirrolizidínicos. O gênero *Senecio* (tribo Senecioneae, Asteraceae) é constituído por mais de 3000 espécies de ampla distribuição mundial. No Brasil, foram catalogadas cerca de 85 espécies pertencentes ao gênero, dentre as quais 33 são nativas da região sul (SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006). A espécie mais frequente no Brasil é o *Senecio brasiliensis* que apresenta distribuição geográfica principalmente nas regiões sul e sudeste (TOKARNIA; DÖBEREINER, 2000; PILATI; BARROS, 2007; STEGELMEIER, 2011).

Estudos mostram que os alcaloides pirrolizidínicos podem ser lixiviados do pólen para o mel (KEMPF et al., 2010), podendo ser encontrados em concentrações elevadas no pólen (BOPRE et al., 2005; BOPRE et al., 2008; KEMPF, REINHARD, BEUERLE, 2010; DUBECKE, BECKH, LULLMANN, 2011). Portanto, torna-se cada vez mais necessário identificar quais PAs e em que concentrações estão presentes no pólen e mel, assim como determinar a origem botânica do mel, a fim de nortear medidas preventivas para reduzir sua contaminação, como a seleção dos locais para o posicionamento das

colmeias, a remoção das plantas tóxicas (GRIFFIN et. al, 2013; CODEX, 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi utilizar um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken para o preparo de amostra, o que reduz significativamente o número de experimentos necessários e aplicar o método desenvolvido por VALESE et al. (2016), descrito no capítulo anterior, para determinação de PAs em mel, pólen e plantas da espécie *Senecio brasiliensis* a fim de nortear medidas preventivas para redução da contaminação do mel, permitindo a seleção dos melhores locais para o posicionamento das colmeias, a remoção das plantas tóxicas e sua substituição por outras, disponibilizando flores de melhor qualidade para as abelhas, conforme as orientações de GRIFFIN et al. (2013) e do Codex Alimentarius (2014).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos de retrorsina (RET), retrorsina-N-óxido (RET-N) e monocrotalina (MCT) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). A equimidina (ECH), intermedina (INT) e licopsamina (LYC), foram adquiridos da Planta Analytica (Danbury, Connecticut, E.U.A.). Senecionina (SEN) e senecionina-N-óxido (SEN-N) foram doados pelo Dr. Gustavo Amadeu Micke (Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil). Todos os padrões comerciais possuem pureza superior a 95%.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Metanol, acetonitrila e ácido sulfúrico (grau HPLC) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido fórmico (grau HPLC) adquirido da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, E.U.A.). Água desionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Mega Purity (Billerica, MA, E.U.A.).

3.2.2 SOLUÇÕES

As soluções estoque dos padrões de PAs foram preparadas isoladamente por dissolução de $10 \pm 0,2$ mg do padrão analítico em 10 mL de metanol, exceto para a equimidina que foi dissolvida com uma solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Para o preparo das curvas de calibração soluções de trabalho contendo todos os PAs nas concentrações de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (para os níveis de $20\text{-}50 \mu\text{g kg}^{-1}$) e $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (para os níveis de $3\text{-}10 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram preparados diariamente em metanol.

3.2.3 INSTRUMENTAÇÃO

Os procedimentos analíticos foram realizados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) equipado com bomba binária, sistema de degaseificação, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 108 *vials* de 2,0 mL e forno para seis colunas analíticas, acoplado a um espectrômetro de massas híbrido constituído de um triploquadrupolo e *ion trap* linear, modelo QTRAP® 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, E.U.A.) equipado com célula de colisão *Quarved* LINAC®, guia de íons Qjet®, fonte de ionização Turbo V™, detector AcQuRate™ e eletrônica Fast eQTM. Foram utilizados gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, E.U.A.). O *software* Analyst versão 1.6.2 foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados.

O espectrômetro de massas foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante, nos modos de íons negativos e positivos por infusão de uma solução de polipropileno glicol (PPG, do inglês *polypropylene glycol*) nas concentrações de 3×10^{-5} e 2×10^{-7} mol L⁻¹, respectivamente. Ar sintético foi utilizado como gás nebulizante (GS1), gás secante (GS2) na fonte Turbo V™ e nitrogênio foi empregado como gás de dessolvatação (CUR, do inglês *curtain gas*) e de colisão (CAD, do inglês *collision gas*). Os PAs foram monitorados e quantificados usando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*).

3.2.4. SEPARAÇÃO POR LC-MS/MS

Os experimentos foram realizados utilizando uma fonte *electrospray* no modo de ionização positivo e os parâmetros dependentes da fonte de ionização otimizados foram: tensão do capilar, 5500 V; temperatura da fonte, 650°C; gás nebulizante, 50 psi; gás secante, 55 psi; gás de colisão, alto; cortina de gás de dessolvatação, 25 psi.

Para a separação cromatográfica, foi utilizada uma coluna cromatográfica da marca ZORBAX C₁₈ (4,6x100 mm 3,5 µm, Agilent, Palo Alto, CA, E.U.A.) e as condições instrumentais do cromatógrafo líquido foram realizadas sob fluxo de 0,5 mL min⁻¹, temperatura do forno de coluna de 30°C, temperatura do amostrador automático de 20°C, volume de injeção de 5,00 µL. O tempo total de corrida foi de onze minutos, com quatro minutos de equilíbrio entre as injeções e a limpeza do injetor foi realizada com uma solução constituída por ACN:MeOH:H₂O (1:1:1, v/v/v) durante dez segundos, a fim de se evitar contaminação (*carry over*) entre as análises. A composição do gradiente adequada durante a corrida cromatográfica está indicada na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1. Composição do gradiente de eluição utilizado para a separação cromatográfica de alcalóides pirrolizidínicos (PAs).

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Fluxo (mL min ⁻¹)
4	98	2	0,5
2	98	2	0,5
5	85	15	0,5
8	50	50	0,5
9	10	90	0,5
11	98	2	0,5

Fase móvel A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico. Fase móvel

B: acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico. Fonte: O próprio

autor

3.2.5. AMOSTRAS

3.2.5.1. Amostras de plantas

Foram coletadas no mês de novembro do ano de 2015, sete amostras de plantas *Senecio brasiliensis* (caule e flor) próximas das colmeias, nas regiões de acordo com a tabela 3.2. Também foram coletadas no mesmo mês, 24 amostras de plantas nectaríferas e poliníferas em um raio de 2 km das colmeias na região de Urupema, Santa Catarina. As amostras foram coletadas, armazenadas a 4°C e encaminhadas para o laboratório. As flores foram separadas do caule e folha e ambos foram secas em temperatura de 45°C durante 12 horas em estufa de ar circulante (Thermo Scientific™ Precision™ High-Performance Ovens, Waltham, MA, E.U.A.), trituradas em moinho ultracentrífugo ZM 200 (Retsch, Haan, Alemanha) e armazenados em

frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz, mantidos em temperatura de -18°C até o momento da análise.

Tabela 3. 2. Localização geográfica dos municípios de origem das amostras.

Amostra	Município	Latitude	Longitude	Altitude (m)
BS1	Bocaina do Sul	27°45' 17,5"	49°58' 3,8"	975
BS2	Bocaina do Sul	27° 55' 47''	49° 58' 24,2''	990
SJ1	São Joaquim	28°15' 49,5"	49°57' 20,9"	1254
SJ2	São Joaquim	28°19' 22,5"	50°1' 22,5"	1291
SJ3	São Joaquim	28° 17' 4''	49° 55' 5''	1353
UP1	Urupema	27° 57' 10''	49° 52' 23''	1350
UP2	Urupema	27° 57' 10''	49° 54' 54,5''	1371

Fonte: O próprio autor.

3.2.5.1.1. Identificação das plantas

A identificação botânica das plantas coletadas em seus habitats foi realizada pelo professor Dr. Daniel B. Falkenberg no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. Uma parte das amostras foi congelada a -20°C e a outra desidratada a 45°C durante 12 horas em estufa de ar circulante (Thermo Scientific™ Precision™ High-Performance Ovens, Waltham, MA, E.U.A.). A identificação foi realizada utilizando a metodologia taxonômica tradicional (STUESSY, 2009), que consiste na comparação das plantas com revisão e interpretação de descrições na literatura, através de bibliografias específicas e na análise de exsicatas (plantas secas) de herbários.

3.2.5.2. Amostras de mel

Foram coletadas sete amostras de méis, nas regiões descritas na Tabela 3.2. As amostras foram coletadas no mês de novembro de 2015 com a ajuda dos produtores locais, diretamente das colmeias. Após a coleta, foram mantidas em refrigeração a 4°C e encaminhadas para o laboratório. No laboratório, os favos foram espremidos, o mel coletado em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL que foram então centrifugados (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, E.U.A.) a 4000 rpm, durante 30 minutos. O material particulado foi descartado e as amostras armazenadas em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz, mantidos em temperatura de -18°C até o momento da análise.

3.2.5.3 Amostras de pólen

Foram coletadas sete amostras de favos diretamente das colmeias. As amostras foram coletadas nas mesmas regiões e períodos descritos no item 3.2.5.2. Após a coleta, foram mantidas em refrigeração a 4°C e encaminhadas para o laboratório. As amostras de pólen foram coletadas diretamente dos favos, com auxílio de pinças e armazenadas em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL a -18°C. No momento da análise, as amostras foram trituradas e homogêneas em gral e pistilo de porcelana.

3.2.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

3.2.6.1 Preparo das amostras de plantas e pólen

Para otimização do preparo de amostra, optou-se por um planejamento do tipo Box-Behnken, que reduz significativamente o

número de experimentos necessários. Este método consiste basicamente no planejamento fatorial clássico de dois níveis (2^k) acrescido de pontos centrais que permitem a estimativa dos coeficientes de segunda ordem. Os fatores (porcentagem de metanol, porcentagem de ácido fosfórico e temperatura) e os níveis experimentais estão apresentados na Tabela 3.3. Foram realizados 15 experimentos de forma aleatória e a resposta para o planejamento foi a soma das concentrações dos analitos em estudo. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,1$ (confiança 90%) para a matriz de pólen e $\alpha = 0,05$ para a matriz de planta. Os dados foram tratados no *software* Statistica® 11.0.

Tabela 3. 3. Planejamento fatorial Box-Behnken do preparo das amostras de plantas e pólen para análise de alcaloides pirrolizidínicos por LC-MS/MS.

Variáveis	Fator	Nível		
		-1	0	1
1	Metanol (%)	30	50	70
2	Ácido fórmico (%)	1	2	3
3	Temperatura (°C)	80	85	90

Fonte: O próprio autor.

As amostras foram homogeneizadas e pesadas ($0,05 \pm 0,005$ g) em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL. A condição escolhida de acordo com o planejamento fatorial foi de 10 mL de uma solução com 70% metanol (v:v) acidificada com 2% (v:v) de ácido fórmico, agitado em banho maria tipo Dubnoff (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos a 90°C. As amostras foram centrifugadas por 15 min, 4000 rpm a 4°C (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, E.U.A.). Amostras de plantas foram diluídas 4000 vezes (v:v)

e as amostras de pólen 200 vezes (v:v) em fase móvel inicial (98:2, A:B), transferidas para *vials* com capacidade de 2 mL e submetidas à análise.

3.2.6.2 Preparo de amostras de mel

O preparo de amostra foi realizado seguido VALESE et al (2016) , onde as amostras foram homogeneizadas e pesadas ($2,0 \pm 0,1$ g) em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL. A amostra foi dissolvida com 5 mL de água desionizada, agitada em vórtex durante 40 s e agitada em agitador orbital (Tecnal Equipamentos para Laboratório, SP, Brasil) durante 20 min. Em seguida, uma alíquota de 200 μ L de extrato e 800 μ L de fase móvel (98:2; A: B) foi transferida para um microtubo de polipropileno de capacidade de 1,5 mL, centrifugada (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, E.U.A.) a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C e transferida para *vial* com capacidade de 2 mL e submetida à análise.

3.2.7 ANÁLISE PALINOLÓGICA

A identificação dos grãos de pólen foi realizada no Centro de Pesquisa em Palinologia do Instituto Botânico do Departamento do Meio Ambiente do Estado de São Paulo pela pesquisadora Dr. Cynthia Fernandes Pinto da Luz. As amostras foram processadas sem aplicação de acetólise, de acordo com *European Standard Protocol* (MAURIZIO, LOUVEAUX, 1965) para estudos palinológicos, o qual 10 g de amostra de mel foram dissolvidas em 20 mL de água destilada (MAURIZIO, LOUVEAUX, 1965; VON DER OSHE et al., 2004) e o sedimento foi

ressuspendido em glicerol:água (1:1, v:v) para posterior montagem e observação em lâmina de microscópio ótico (Olympus BX50, com ampliação de lente de 400 a 1000 vezes). A identificação dos grãos de pólen foi realizada com base em Barth (1989) e Roubik e Moreno (1991), de acordo com os grãos de pólen utilizados como referência pertencentes. Os grãos de pólen foram identificados de acordo com a espécie de planta, bem como um grupo de espécies ou que apresentam morfologia polínica similar. Em cada amostra, o resultado foi analisado em termos de tipo de pólen dominante, considerando representações superiores e inferiores de cada pólen e contribuições de néctar das plantas (nectaríferas, poliníferas e anemófilas) (BARTH, 1970a, 1970b, 1970c, 1970d, 1970e, 1989, 1990).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL

Considerando a grande variação estrutural dos PAs e a ocorrência de seus respectivos N-óxidos, o método de extração deve garantir a extração simultânea de ambos os compostos. Em geral, os PAs são alcaloides e sua forma reduzida contém características básicas, devido à presença do átomo de nitrogênio. De acordo com a literatura, extrações clássicas de alcaloides fazem uso de solventes orgânicos semi-polares a polares (metanol e acetonitrila) ou soluções aquosas acidificadas. Já os N-óxidos são moléculas polares que podem ser facilmente extraídas com solventes polares, como o metanol ou soluções aquosas diluídas (JOOSTEN et al., 2009; CREWS; BERTHILLER; KRŠKA, 2010; HOOGENBOOM, et al., 2011; THESE, et al., 2013; AVULA, et al., 2015; SHIMSHONI, et al., 2015).

Através de testes preliminares, foi realizada uma triagem dos fatores que poderiam influenciar de forma mais significativa a eficiência da extração sólido-líquida dos alcaloides pirrolizidínicos nas amostras de plantas e pólen, como tempo de agitação, pH, proporção de solvente orgânico e temperatura. Foram realizadas diversas extrações, variando apenas a concentração de ácido fórmico, sem fazer uso de solvente orgânico. Extratos com muito material particulado, principalmente das amostras de plantas, foram obtidos e, Com adição de metanol, os extratos se tornaram mais límpidos. A temperatura teve influência positiva, devido ao uso de um banho-maria com água à temperatura

máxima de 90 °C. Para os estudos de proporção de ácido fórmico, foram levados em consideração os pKa_s dos analitos em estudo.

O planejamento fatorial Box-Behnken, é um modelo quadrático com base em três níveis fatoriais incompletos, que permite a modelagem de superfícies de resposta, dado por $n = 2k(k-1) + C_0$; onde k é o número de variáveis e C₀ o número de replicatas no ponto central. No presente estudo, k = 3, totalizando assim 15 experimentos. Os fatores e os níveis experimentais estabelecidos para os mesmos estão apresentados na Tabela 3.4. Outros fatores, de menor influência, foram fixados com base nos testes preliminares, como é o caso do tempo de agitação que foi fixado em 30 minutos. Os experimentos foram realizados de forma aleatória e o fator resposta foi a soma total da concentração dos analitos.

Tabela 3. 4. Fatores, níveis experimentais e respostas estabelecidas para o planejamento Box-Behnken.

Ensaio	Fatores			Resposta ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Metanol (%)	Ácido Fórmico (%)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Pólen	Planta
1	30 (-1)	1(-1)	85 (0)	0,57	50,02
2	70 (+1)	1(-1)	85 (0)	0,70	76,84
3	30 (-1)	3 (+1)	85 (0)	0,68	41,21
4	70 (+1)	3 (+1)	85 (0)	0,63	67,80
5	30 (-1)	2 (0)	80 (-1)	0,54	45,94
6	70 (+1)	2 (0)	80 (-1)	0,39	50,24
7	30 (-1)	2 (0)	90 (+1)	0,51	53,16
8	70 (+1)	2 (0)	90 (+1)	0,63	79,55
9	50 (0)	1(-1)	80 (-1)	0,38	64,86
10	50 (0)	3 (+1)	80 (-1)	0,35	57,79
11	50 (0)	1(-1)	90 (+1)	0,64	63,20
12	50 (0)	3 (+1)	90 (+1)	0,56	62,73
13 (PC)	50 (0)	2 (0)	85 (0)	0,49	61,43
14 (PC)	50 (0)	2 (0)	85 (0)	0,56	61,10
15 (PC)	50 (0)	2 (0)	85 (0)	0,51	60,90

PC – Ponto central. Fonte: O próprio autor.

De acordo com a tabela 3.4, observa-se que as maiores concentrações para a amostra de planta foram obtidas nos experimentos 2 e 8, com valores máximos para os fatores de porcentagem de metanol e temperatura. Já para o pólen, nos experimentos 2 e 3, tiveram valores máximos para os fatores de porcentagem de ácido fórmico e metanol.

As Tabelas 3.5 e 3.6 apresentam as avaliações estatísticas dos coeficientes dos modelos ajustados. Os valores de t de Student foram calculados pela razão entre os coeficientes e os respectivos erros padrões estimados. O p-valor foi calculado como o valor absoluto de t de

Student estimado, e os limites de confiança para os coeficientes do modelo correspondem ao intervalo relacionado ao valor de t de Student ao nível de confiança avaliado multiplicado pelos respectivos erros dos coeficientes do modelo ajustado.

Tabela 3. 5. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2³) da matriz *Senecio Brasiliensis*.

Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	Teste t (2)	p-valor	- 95%	+95%
Média/Intercepto	<u>59,44</u>	<u>0,08</u>	<u>767,64</u>	<u>0,00</u>	<u>59,11</u>	<u>59,78</u>
MeOH (L)	<u>10,51</u>	<u>0,09</u>	<u>110,83</u>	<u>0,00</u>	<u>10,10</u>	<u>10,92</u>
MeOH (Q)	<u>1,77</u>	<u>0,07</u>	<u>25,43</u>	<u>0,00</u>	<u>1,47</u>	<u>2,08</u>
Ácido Fórmico (L)	<u>-3,17</u>	<u>0,09</u>	<u>-33,48</u>	<u>0,00</u>	<u>-3,58</u>	<u>-2,77</u>
Ácido Fórmico (Q)	<u>-0,69</u>	<u>0,07</u>	<u>-9,84</u>	<u>0,01</u>	<u>-0,99</u>	<u>-0,39</u>
Temperatura (L)	<u>4,98</u>	<u>0,09</u>	<u>52,46</u>	<u>0,00</u>	<u>4,57</u>	<u>5,38</u>
Temperatura (Q)	0,19	0,07	2,67	0,12	-0,11	0,49
MeOH (L) *Ácido Fórmico (L)	-0,06	0,13	-0,43	0,71	-0,64	0,52
MeOH (L) *Temperatura (L)	<u>5,52</u>	<u>0,13</u>	<u>41,17</u>	<u>0,00</u>	<u>4,94</u>	<u>6,10</u>
Ácido Fórmico (L) *Temperatura (L)	<u>1,65</u>	<u>0,13</u>	<u>12,32</u>	<u>0,01</u>	<u>1,08</u>	<u>2,23</u>

L=Termo linear do modelo ajustado. Q= Termo quadrático do modelo ajustado.

Fonte: O próprio autor

Tabela 3. 6. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2³) da matriz pólen.

Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	Teste t (2)	p-valor	-90%	+90%
Média/Intercepto	<u>0,55</u>	<u>0,01</u>	<u>50,89</u>	<u>0,00</u>	<u>0,52</u>	<u>0,58</u>
MeOH (L)	0,01	0,01	0,46	0,69	-0,03	0,04
MeOH (Q)	<u>-0,04</u>	<u>0,01</u>	<u>-4,05</u>	<u>0,06</u>	<u>-0,07</u>	<u>-0,01</u>
Ácido Fórmico (L)	-0,01	0,01	-0,78	0,51	-0,05	0,03
Ácido Fórmico (Q)	-0,02	0,01	-2,36	0,14	-0,05	0,01
Temperatura (L)	<u>0,08</u>	<u>0,01</u>	<u>6,42</u>	<u>0,02</u>	<u>0,05</u>	<u>0,12</u>
Temperatura (Q)	<u>0,04</u>	<u>0,01</u>	<u>4,31</u>	<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,07</u>
MeOH (L) *Ácido Fórmico (L)	-0,04	0,02	-2,32	0,15	-0,10	0,01
MeOH (L) *Temperatura (L)	<u>0,07</u>	<u>0,02</u>	<u>3,66</u>	<u>0,07</u>	<u>0,01</u>	<u>0,12</u>
Ácido Fórmico (L) *Temperatura(L)	-0,01	0,02	-0,66	0,57	-0,07	0,04

L=Termo linear do modelo ajustado. Q= Termo quadrático do modelo ajustado.

Fonte: O próprio autor

Os fatores considerados como significativos são aqueles que apresentam valores de coeficientes maiores que o produto entre o erro do respectivo coeficiente pelo valor de t de Student ($t_{(2; 0,05)} = 4,303$, $t_{(2; 0,1)} = 2,92$). Para as amostras de planta, ao nível de confiança de 95%, os fatores que apresentaram significância estatística estão em negrito e sublinhado e são porcentagem de metanol, porcentagem de ácido fórmico e temperatura, o termo quadrático do fator metanol e ácido fórmico, bem como as interações entre a porcentagem de metanol com temperatura e a interação de ácido fórmico com temperatura. Já para o pólen, ao nível de confiança de 90%, os fatores que apresentaram significância estatística foram porcentagem de metanol e temperatura no

termo linear, temperatura no termo quadrático e as interações entre metanol e temperatura.

Para a construção do modelo foram consideradas apenas as variáveis que foram significativas no intervalo de confiança estipulado para cada matriz. As tabelas 3.7 e 3.8 apresentam as avaliações estatísticas dos coeficientes dos modelos ajustados após a retirada dos fatores que não influenciaram de forma significativa a resposta.

Tabela 3. 7. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2³) da matriz *Senecio Brasiliensis*.

Fatores	Coefficientes	Erro Padrão	Teste t (2)	p-valor	-95%	+95%
Média/Intercepto	<u>59,50</u>	<u>0,07</u>	<u>799,76</u>	<u>0,00</u>	<u>59,18</u>	<u>59,82</u>
MeOH (L)	<u>10,51</u>	<u>0,09</u>	<u>110,83</u>	<u>0,00</u>	<u>10,10</u>	<u>10,92</u>
MeOH (Q)	<u>1,76</u>	<u>0,07</u>	<u>25,30</u>	<u>0,00</u>	<u>1,46</u>	<u>2,06</u>
Ácido Fórmico (L)	<u>-3,17</u>	<u>0,09</u>	<u>-33,48</u>	<u>0,00</u>	<u>-3,58</u>	<u>-2,77</u>
Ácido Fórmico (Q)	<u>-0,70</u>	<u>0,07</u>	<u>-10,08</u>	<u>0,01</u>	<u>-1,00</u>	<u>-0,40</u>
Temperatura (Q)	<u>4,98</u>	<u>0,09</u>	<u>52,46</u>	<u>0,00</u>	<u>4,57</u>	<u>5,38</u>
MeOH (L)	<u>5,52</u>	<u>0,13</u>	<u>41,17</u>	<u>0,00</u>	<u>4,94</u>	<u>6,10</u>
*Temperatura (L)	<u>1,65</u>	<u>0,13</u>	<u>12,32</u>	<u>0,01</u>	<u>1,08</u>	<u>2,23</u>

L=Termo linear do modelo ajustado. Q= Termo quadrático do modelo ajustado.

Fonte: O próprio autor

Tabela 3. 8. Coeficientes de regressão dos fatores e suas interações (Planejamento Box-Behnken 2³) da matriz pólen.

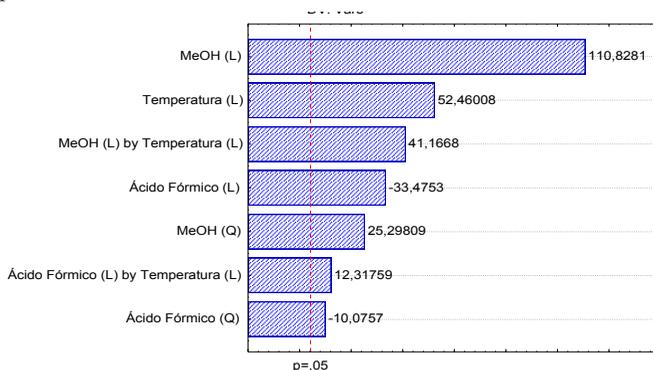
Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	Teste t (2)	p-valor	-95%	+95%
Média/Intercepto	<u>0,54</u>	<u>0,01</u>	<u>52,29</u>	<u>0,00</u>	<u>0,51</u>	<u>0,57</u>
MeOH (Q)	<u>-0,04</u>	<u>0,01</u>	<u>-3,88</u>	<u>0,06</u>	<u>-0,07</u>	<u>-0,01</u>
Temperatura (L)	<u>0,08</u>	<u>0,01</u>	<u>6,42</u>	<u>0,02</u>	<u>0,05</u>	<u>0,12</u>
Temperatura (Q)	<u>0,04</u>	<u>0,01</u>	<u>4,51</u>	<u>0,05</u>	<u>0,02</u>	<u>0,07</u>
Metanol (L)*	<u>0,07</u>	<u>0,02</u>	<u>3,66</u>	<u>0,07</u>	<u>0,01</u>	<u>0,12</u>
Temperatura (L)						

L=Termo linear do modelo ajustado. Q= Termo quadrático do modelo ajustado.

Fonte: O próprio autor.

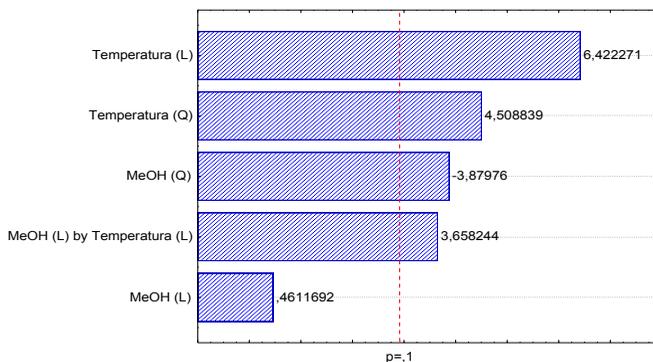
Para a matriz planta, todos os fatores apresentaram significância estatística. Já para o pólen, a porcentagem de metanol no termo linear não apresentou significância estatística. Podemos visualizar melhor pelo gráfico de Pareto, no qual se pode avaliar a significância de cada fator estudado e a interação entre os fatores. Os gráficos de Pareto estão ilustrados na Figura 3.1 e 3.2.

Figura 3. 1. Diagrama de Pareto para a concentração dos PAs em planta.



Fonte: O próprio autor.

Figura 3. 2. Diagrama de Pareto para a concentração dos PAs em pólen.



Fonte: O próprio autor.

Como observado na Figura 3.1, dentre as variáveis independentes o metanol foi a variável que mais interferiu na resposta, seguida pela temperatura e depois pela interação das variáveis metanol e

temperatura. A variável ácido fórmico exerce um efeito negativo na resposta e, quando combinada com o efeito temperatura, exerce um efeito positivo. Para a matriz pólen, conforme ilustra a figura 3.2, a temperatura tanto no termo linear quanto quadrático, foi o fator que mais influenciou a resposta. O metanol no fator linear não interferiu na resposta e no modelo quadrático influenciou de forma negativa, porém quando combinado com o fator de temperatura, influenciou na resposta. Nos dois casos, os fatores quando combinados com a temperatura, influenciaram na resposta positivamente. Este fato pode ser explicado pelo aumento de solubilidade dos analitos, onde a temperatura afeta a velocidade de transferência de massa. O ácido fórmico teve influência negativa na planta e isso pode ser atribuído a sua composição química, que varia de acordo com os tecidos e órgãos, mas de modo geral, os principais constituintes químicos são: amido, lipídeos, proteínas, carboidratos, lignina, flavonoides e clorofila. Este último constituinte é instável em pH ácido, o que pode ter resultado em um efeito negativo na resposta.

O fator metanol influenciou de forma positiva na planta e negativa no pólen devido a diferença na composição das matrizes. O pólen é composto predominantemente por sais minerais, vitaminas, carboidratos e ácidos orgânicos, estes que são altamente solúveis em água. Já as plantas, conforme mencionado anteriormente, possui compostos hidrofóbicos, como a clorofila, lignina e para solubilização destes componentes se faz necessário o uso de solvente orgânico.

Para a construção do modelo foram consideradas apenas as variáveis significativas na faixa de confiança trabalhada. A equação 1 ilustra o modelo para a planta e a equação 2 para o polén.

$$Y = 59,50 + 10,51M + 1,76M^2 - 3,17A - 0,7A^2 + 4,98T + 5,52MT + 1,65 AT \quad (1)$$

$$Y = 0,54 - 0,04M^2 + 0,08T + 0,04T^2 + 0,07MT \quad (2)$$

Onde: Y é a resposta, M é a porcentagem de metanol, A porcentagem de ácido fórmico e T temperatura.

O emprego da equação matemática expressa a relação entre as variáveis de interesse indicando os fatores que alteram o resultado. Os resultados experimentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para avaliar a qualidade do ajuste dos modelos, apresentada nas tabelas 3.9 e 3.10.

Tabela 3. 9. Análise de variância – Planejamento Box-Behnken 2³ para matriz de planta.

Fatores	SQ	gl	MQ	F	p
MeOH (L+Q)	929,93	2,00	464,96	6461,44	0,00
Ácido fórmico (L+Q)	87,94	2,00	43,97	611,06	0,00
Temperatura (L)	198,04	1,00	198,04	2752,06	0,00
MeOH (L) *Temperatura (L)	121,95	1,00	121,95	1694,71	0,00
Ácido fórmico (L) *Temperatura (L)	10,92	1,00	10,92	151,72	0,01
Falta de ajuste	216,57	5,00	43,31	601,92	0,00
Erro puro	0,14	2,00	0,07		
Soma total	1568,40	14,00			

SQ = soma quadrática, gl = grau de liberdade, MQ = média quadrática. Fonte: O próprio autor.

Tabela 3. 10. Análise de variância – Planejamento Box-Behnken 2³ para matriz de pólen.

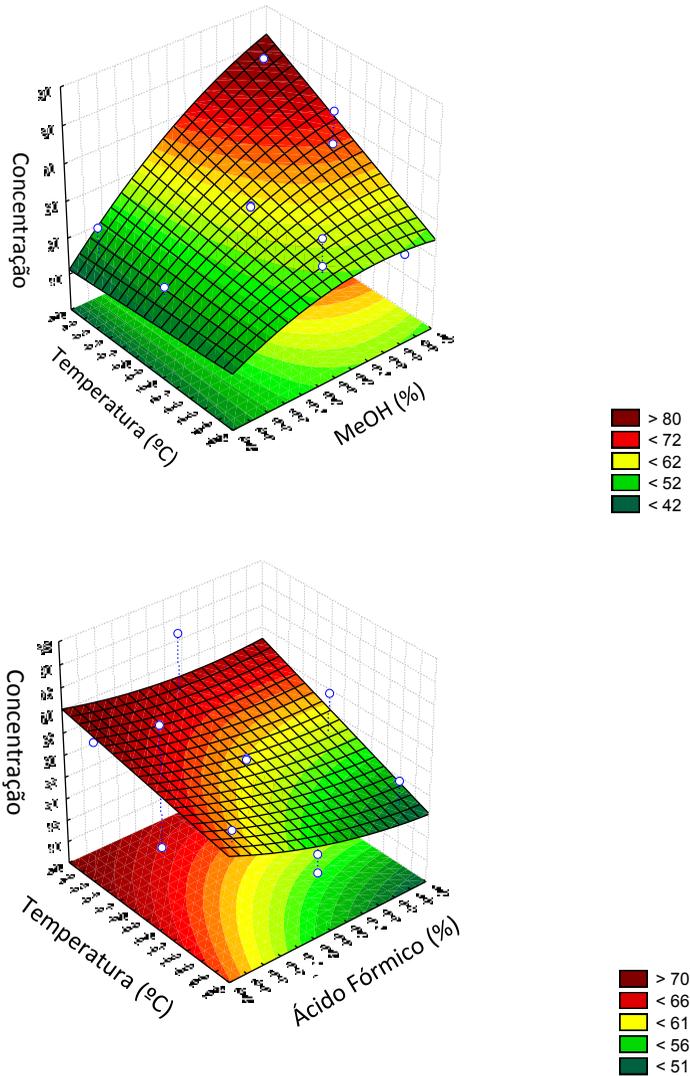
Fatores	SQ	gl	MQ	F	p
MeOH (L+Q)	0,02	2,00	0,01	7,63	0,12
Temperatura (L+Q)	0,09	2,00	0,04	30,79	0,03
MeOH (L) *Temperatura (L)	0,02	1,00	0,02	13,38	0,07
Falta de ajuste	0,03	7,00	0,00	3,14	0,26
Erro puro	0,00	2,00	0,00		
Soma total	0,16	14,00			

SQ = soma quadrática, gl = grau de liberdade, MQ = média quadrática. Fonte: O próprio autor.

De acordo com os dados de ANOVA da tabela 3.9, todos os fatores influenciaram de forma significativa estão sublinhado e destacado em negrito. O modelo é adequado, haja visto o erro puro não ser estatisticamente significativo, com valor de p de 0,07 superior a 0,05. O coeficiente de determinação obtido foi de 0,86, demonstrando que boa parte dos valores estão normalmente distribuídos, não havendo comportamento tendencioso no modelo. Para o modelo do pólen (Tabela 3.10), o fator metanol não é significativo, porém quando o fator interage com a temperatura, ele influencia de forma significativa a resposta. Apesar do erro puro ser significativo ($p < 0,01$), não houve falta de ajuste do modelo, já que o valor encontrado não foi significativo (0,26). O coeficiente de determinação obtido foi de 0,79 demonstrando que boa parte dos valores encontram-se normalmente distribuída, não havendo comportamento tendencioso no modelo.

Os modelos quadráticos obtidos permitiram a construção de superfícies de resposta. Nessas superfícies, a soma total das concentrações dos APs nas amostras de pólen e plantas foram relacionadas com os fatores avaliados nas etapas de extração. A figura 3.3 ilustra as superfícies de respostas das interações que foram significativas para a planta e a figura 3.4 para a amostra de pólen.

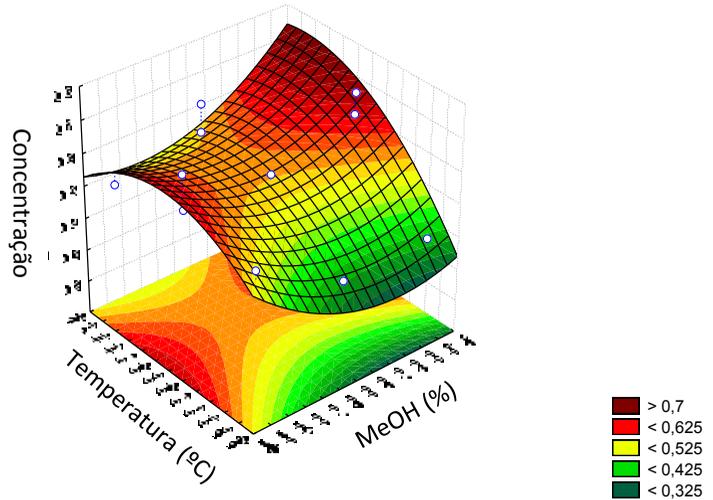
Figura 3. 3. Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em planta.



Fonte: O próprio autor.

As superfícies de resposta, apresentadas pela Figura 3.3, mostram que os fatores avaliados metanol e temperatura apresentaram efeito positivo na concentração dos analitos. Dessa maneira, a adição de metanol relacionada com a temperatura da fase extratora melhora a extração dos analitos, o que pode ser explicado pelo aumento da solubilidade. A temperatura é um parâmetro extremamente importante em um procedimento de extração, pois afeta tanto a velocidade da transferência de massa, quanto o equilíbrio de partição. Já o aumento da porcentagem de ácido fórmico na fase extratora não contribui para aumento dos valores da resposta, fato já discutido anteriormente. Dessa forma, selecionou-se o experimento 8 (temperatura de 90°C, porcentagem de metanol de 70% e porcentagem de ácido fórmico de 2%) como condição ótima para a extração dos PAs em plantas. A superfície de resposta mostrou que a temperatura ótima não está contemplada neste experimento. Diante de limitações experimentais causadas pelo equipamento utilizado para a extração e devido à temperatura de ebulição da água, não seria possível ter o controle exato de temperaturas superiores a 90°C.

Figura 3. 4. Superfícies de resposta para o modelo quadrático ajustado para extração em pólen.



Fonte: O próprio autor.

A superfície de resposta mostra que os fatores avaliados metanol e temperatura apresentaram efeito positivo na concentração dos analitos (Figura 3.4). O mesmo efeito foi observado quando comparado com a superfície de resposta utilizada para a planta. Como o fator de porcentagem de ácido fórmico não teve efeito significativo, optou-se por padronizar as extrações e por utilizar o experimento 8.

3.3.2 Análise das amostras

As amostras de mel foram submetidas a análise palinológica para se conhecer a flora apícola da região, com base na identificação de grãos de pólen que contribuíram para a formação do mel. Foi

identificado um total de 33 tipos polínicos nas sete amostras analisadas (Tabela 3.11). Somente 19 tipos polínicos foram relacionados a plantas nectaríferas, o restante relacionou-se a plantas que não produzem néctar, mas produzem muito pólen (tipos polínicos de plantas poliníferas) ou ainda daquelas que dispersam seus grãos de pólen pelo vento (tipos polínicos de plantas anemófilas) e que ingressaram nas amostras de mel como “contaminação” pelos estoques de pólen das colmeias. Duas amostras foram consideradas monoflorais (amostra BS1 e SJ1), enquanto que as restantes foram biflorais ou heteroflorais. Conforme as listas florísticas apresentadas em Zoucas (2002), Martins (2009) e na flora virtual de Santa Catarina (<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/home>), os conjuntos polínicos observados nas amostras de mel analisadas configuraram suas origens botânica e fitogeográfica como da floresta ombrófila do sul do Brasil, com espectros de plantas arbóreas e arbustivas nativas do interior da mata (por exemplo, Camboatá, Aroeira, Andrade, Casca d'anta e Coentrilho) quanto de herbáceas e subarbustos observados em clareiras, capoeirão, pastagens, trilhas e beira de estrada (Maria Mole, Assa peixe, Carqueja e Pariparoba).

Tabela 3. 11. Frequências totais, incluindo tipos poliníferos, nectaríferos e anemófilos (origem fitogeográfica das amostras) das amostras de méis de Santa Catarina, Brasil.

Código amostra	BS1	SJ1	SJ2	SJ3	BS2	UP1	UP2
Tipo polínico							
Amaranthaceae#	0,19%						
Anacardiaceae							
<i>Schinus*</i>			0,65%	57,75%	4,05%	17,91%	19,08%
Aquifoliaceae							
<i>Ilex*</i>		2,04%	45,76%	1,05%	44,93%	2,98%	
Asteraceae	0,38%		2,61%				0,51%
<i>Baccharis*</i>	7,64%	8,48%	0,65%	40,42%	2,32%	30,84%	25,78%
<i>Senecio brasiliensis**</i>			2,61%			1,99%	0,51%
<i>Vernonia**</i>	1,33%	6,73%	13,07%	0,52%	15,07%	1,00%	8,77%
Boraginaceae							
<i>Ecchium**</i>			4,57%				
Euphorbiaceae							
<i>Acalypha#</i>		0,58%					
Fabaceae							
<i>Crotalaria#</i>		2,04%	1,31%				
<i>Mimosa scabrella*</i>	85,88%	70,18%	1,31%		12,75%	34,82%	36,09%
<i>Senna</i>	0,19%						
Iridaceae*							
						0,49%	
Lauracea							
<i>Persea**</i>	1,16%					1,00%	
Loranthaceae							
<i>Struthanthus**</i>						1,00%	0,51%
Continua							
Continuação							
Código amostra	BS1	SJ1	SJ2	SJ3	BS2	UP1	UP2
Onagraceae*				0,26%			
Menispermaceae							
<i>Disciphania*</i>	1,33%						
Monocotiledonea#	0,19%			0,29%			
Myrtaceae							
Myrcia#	0,57%	5,86%			0,58%	1,99%	
Continua							

Continuação Código amostra	BS1	SJ1	SJ2	SJ3	BS2	UP1	UP2
Tipo polínico							
Nyctaginaceae							
<i>Guapira*</i>					0,58%		
Poaceae						1,00%	0,51%
Piperaceae							
<i>Piper#</i>					0,58%		
Rosaceae							
<i>Malus*</i>	1,54%						7,73%
Rutaceae							
<i>Zanthoxylum**</i>	1,00%		20,27%				1,00%
Sapindaceae							
<i>Matayba**</i>	0,19%	0,29%	5,23%				
<i>Talisia**</i>			0,65%				
Solanaceae							
Solanum#		0,89%					0,51%
Vitaceae							
<i>Vitis**</i>		1,75%			17,98%		
Winteraceae							
Drymis		0,29%					
Não identificado	0,38%	0,58%	1,31%			3,98%	
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Legenda. BS Bocaina do Sul, SJ São Joaquim e UP Urupema. *Fonte floral de menor contribuição nectarífera. **Fonte floral com maior contribuição nectarífera. #Tipos polínicos de plantas não nectaríferas. Fonte: Instituto Botânico de São Paulo.

Nas amostras BS1, SJ1, UP1 e UP2, predominou o tipo polínico da *Mimosa scabrella*, chegando a 85% na amostra BS1. Essa planta é popularmente conhecida como bracatinga, árvore nativa das regiões mais frias do Sul do Brasil, seguida pela *Baccharis*, popularmente conhecida como carqueja ou vassoura lageana. Já na região de Bocaina do Sul predominou o gênero *Ilex* sp., popularmente conhecida como caúna, congonha ou erva-mate. Na amostra SJ3, predominou o gênero

Schinus sp., conhecido como aroeira. Amostras de São Joaquim e Urupema indicaram a presença de pólen de *Senecio brasiliensis*.

Os grãos de pólen de plantas exóticas identificados foram *Echium* sp. (provavelmente da espécie *Echium plantagineum*), *Malus* sp. (macieira) e *Vitis* sp. (videira). A primeira é erva nativa da Europa que se tornou invasiva nas pastagens do sul do Brasil. Esse gênero de planta, em conjunto com *Senecio* sp., *Crotalaria* sp. e *Heliotropium* sp., abrigam as principais espécies de plantas envolvidas na intoxicação espontânea por alcaloides pirrolizidínicos em herbívoros e humanos (CHEEKE, 1994). Sugere-se que a toxicidade de seus grãos de pólen e néctar no mel deve ser melhor investigada. A segunda e terceira, macieira e videira, são plantas muito cultivadas no mundo devido ao consumo de seus frutos e, no Brasil, os cultivos se dão principalmente na região sul. Portanto, a representatividade polínica das amostras de mel analisadas revelou recursos nectaríferos recolhidos pelas abelhas *Apis mellifera* nas flores de plantas arbóreas, arbustivas e herbáceas típicas da floresta ombrófila do sul do Brasil, assim como de plantas de clareiras, trilhas, pastagens e cultivos.

Tabela 3. 12. Concentrações de senecionina, senecionina-N-óxido, retrorsina-N-óxido em amostras de mel, pólen e plantas.

Amostras	Senecionina (mg/100g)				Senecionina-N-óxido (mg/100g)				Retrorsina-N-óxido (mg/100g)			
	Mel	Pólen	Planta		Mel	Pólen	Planta		Mel	Pólen	Planta	
			Flor	Folha			Flor	Folha			Flor	Folha
BS1	0,0085	2,9011	42,8267	63,5154	0,0004	3,1909	6039,4024	5514,8584	0,0004	0,4218	3238,4967	5170,2484
BS2	N.D.	0,4522	81,2130	53,4393	N.D.	2,0480	3942,7976	2010,3837	N.D.	1,3296	3916,1866	1058,2726
SJ1	0,0041	N.D.	41,4889	50,0000	0,0001	4,2442	6516,9312	5320,0000	0,0002	1,2604	2473,2275	5200,0000
SJ2	0,0307	4,4283	103,7249	101,5753	0,0060	15,6232	9216,4829	6182,3724	0,0005	2,0488	4733,5433	4887,3831
SJ3	0,0057	N.D.	86,8880	83,9936	0,0007	2,1829	5320,0000	4141,0202	0,0002	0,3042	3827,8631	1455,1844
UP1	0,0150	6,0858	89,0358	100,5385	0,0019	6,5875	5706,3387	9100,6859	0,0016	1,7994	3950,0073	5508,1875
UP2	0,0128	0,8586	60,6359	64,9894	0,0017	16,8566	6538,4696	9445,8561	0,0009	1,3343	3104,2830	3328,9416

N.D.- não detectado. BS Bocaina do Sul, SJ São Joaquim e UP Urupema . Fonte: O próprio autor.

Tabela 3. 13. Concentração total de alcaloides pirrolizidínicos em amostras de mel, pólen e plantas e análise palinológica.

Amostras	Total PAs (mg/100g)				Palinologia (% de <i>Senecio</i>)
	Mel	Pólen	Planta		
			Flor	Folha	
BS1	0,0107	10,6010	9320,7258	10748,6221	N.D.
BS2	N.D.	3,8298	7940,1972	3122,0956	N.D.
SJ1	0,0044	5,5046	9031,6476	10570,0000	N.D.
SJ2	0,0383	22,1003	14053,7512	11171,3308	2,61%
SJ3	0,0075	2,4871	9234,7511	5680,1982	N.D.
UP1	0,0185	14,4727	9745,3819	14709,4119	1,99%
UP2	0,0153	19,0494	9703,3884	12839,7871	0,51%

N.D.- não detectado. BS Bocaina do Sul, SJ São Joaquim e UP Urupema. Fonte: O próprio autor.

A fim de investigar a presença de alcaloides pirrolizidínicos nas amostras desse estudo, as condições ótimas do planejamento fatorial foram aplicadas nas amostras de méis, pólen e plantas (flor e folha) e os resultados estão demonstrados nas tabelas 3.12 e 3.13. Dos oito PAs estudados, os predominantes foram a senecionina, senecionina-N-óxido e retrorsina-N-óxido. Na época do ano e região em que as amostras foram coletadas, as plantas que predominavam eram as do gênero *Senecio* sp., que possuem como princípios ativos tóxicos os alcaloides pirrolizidínicos. Uma das espécies mais predominantes era a *Senecio brasiliensis*, que de acordo com a literatura possui como PAs principais a integerrimina, senecionina e retrorsina (FLORES et al., 2003). A integerrimina não foi avaliada neste estudo e as demais foram encontradas em todas as amostras.

Os valores encontrados de PAs na matriz mel variou de 0,0044 a 0,0185 mg/100g, já para o pólen foi de 2,48 a 22,10 mg/100g e para a planta nas flores variou de 9031,64 a 14053,75 mg/100g e na folha de 3122,09 a 14709,41 mg/100g.

A amostra SJ2, da região de São Joaquim, apresentou as maiores concentrações de PAs e a maior proporção de pólen (2,61%) de *Senecio brasiliensis*, seguida das amostras UP1 e UP2, da região de Urupema. Nessas duas regiões, as colmeias estavam localizadas bem próximas das plantas de *Senecio brasiliensis* (Figura 3.5), o que se confirmou com a presença de grãos de pólen dessa planta no mel. As amostras de pólen dessas regiões também apresentaram as maiores concentrações de PAs, compostos estes que são lixiviados para o mel, o que justifica maiores concentrações desses analitos. Na amostra BS2, da

região de Bocaina, não foi detectado nenhum PAs. Esse fato pode ser atribuído ao posicionamento da colmeia e por possuir poucas plantas do gênero *Senecio*. O analito equimidina foi detectado apenas no mel e pólen da amostra BS1, na concentração de $0,0010 \pm 0,0006$ mg/100g e $4,0872 \pm 0,2336$ mg/100g, respectivamente. A licopsamina/intermidina foi encontrada nas amostras de mel da região de São Joaquim (amostras SJ2 e SJ3) na concentração de $0,0011 \pm 0,0008$ mg/100g e $0,0009 \pm 0,0001$ mg/100g, respectivamente. Na amostra BS1, a concentração foi de $0,0003 \pm 0,0001$ mg/100g. A amostra SJ2 apresentou grãos de pólen da família *Ecchium*, que de acordo com El-Shazly e Wink (2014), possuem o alcaloide equimidina, característico dessas plantas. Já as plantas da família *Asteraceae* contêm frequentemente licopsamina e/ou seus isômeros, o que foi confirmado pela presença de seus grãos de pólen, encontrados nas amostras positivas para esse analito (HARTMANN, WITTE, 1995; EDGAR, ROEDER, MOLYNEUX, 2002).

Figura 3. 5. Colmeia localizada na região de Urupema.



Fonte: acervo pessoal Mariléia Côrrea da Silva

Não foi realizada a identificação botânica dos grãos polínicos, pois o objetivo desse trabalho era identificar e determinar as concentrações de PAs presentes no pólen a fim de avaliar a veiculação para o produto final mel. Os valores encontrados de PAs nesse trabalho estão bem acima dos reportados na literatura em estudos realizados nos Estados Unidos e Austrália, que foram de 0,52 a 1,28 mg/100g (BOPRE, 2008; KEMP et al., 2010).

As maiores concentrações de alcaloides são encontradas quando a planta está em período de floração e sabe-se que o conteúdo de alcaloides em cada uma das espécies varia muito durante o ciclo de crescimento da planta e de ano para ano. Também foi verificado que as flores da maioria das espécies tóxicas de *Senecio* continha mais PAs do

que nas folhas e caules, evidenciando, dessa forma, que há uma grande variação da quantidade de PAs nas diferentes partes da planta (JOHNSON et al., 1985; HATMAN, ZIMMER, 1986; BILLER et al., 1994; BOPPRE et al, 2005).

Neste estudo, nem toda amostra de flor apresentou concentração superior a da folha+caule, fato este que pode ser explicado pelo estágio de maturação da planta. De acordo com os resultados encontrados, foi possível correlacionar os valores de PAs nas três matrizes, ou seja, as maiores concentrações encontradas no mel são oriundos da transferência dos alcaloides do pólen. O mel que apresentou a maior concentração de PAs total 0,0383 mg/100g é oriundo da região que possui o pólen e a flor de *Senecio Brasiliensis* mais contaminados.

3.4 CONCLUSÃO

O procedimento proposto no capítulo anterior foi adequado para determinação de alcalóides pirrolizidínicos em amostras de pólen e plantas do gênero *Senecio Brasiliensis*. O planejamento utilizado para otimização do preparo de amostra, determinaram quais fatores apresentavam efeitos relevantes na resposta, além de permitir identificar e quantificar as correlações entre os diferentes fatores. O planejamento fatorial viabilizou o preparo de amostra ótimo com um número reduzido de experimentos. Foi evidenciado que as maiores concentrações encontradas no mel foram também encontradas nas amostras de pólen e planta da mesma região. Todas as amostras de mel analisadas, exceto a amostra de São Joaquim 1 estão acima dos valores recomendados de ingestão diária, assim como as amostras de pólen que chegam até 4000 vezes acima do valor recomendado, indicando a importância do posicionamento das colmeias, assim como a remoção das plantas tóxicas e sua substituição por outras com flores de melhor qualidade para as abelhas.

3.5 REFERÊNCIAS

AVULA, 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.

BARTH, O.M. (1989). O Pólen no mel brasileiro. Luxor Editora (ed.) Rio de Janeiro. RJ. p. 50–65.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: A review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 342–350, 2004.

BARTH, O.M. Pollen, in monofloral honeys from Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.29, p. 89-94, 1990.

BARTH, O.M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen Dominante. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, p.351-366, 1970a.

BARTH, O.M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 2. Pólen Acessório. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, p.571-590, 1970b.

BARTH, O.M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 3. Pólen Isolado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, p.747-772, 1970c.

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, 1970d.

BARTH OM. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 5. Melato (“honeydew”) em mel de abelhas. **Revista Brasileira de Biologia**, v.30, p.601-608, 1970e.

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

BOPPRE, M.; COLEGATE, S. M.; EDGAR, J. A.; FISCHER, O. W. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, p.5662-5672, 2008.

CAMPOS, Maria GR et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, v. 47, n. 2, p. 154-161, 2008.

Cheeke P.R. A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. **Vet. Human Toxicol**, v. 36, p. 240-247, 1994.

CODEX - Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Contaminants in Food. **37th Session**. Distribution of the report of the eighth session of the codex committee on contaminants in foods. 121p. 2014

COTTE, J. et al. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 380, n. 4, p. 698-705, 2004.

CREWS, C.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 1, p. 327-338, 2010.

DA SILVA, C. M.; BOLZAN, A. A.; HEINZMANN, B. M. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p.1047-1053, 2006.

DE ARRUDA, V. et al. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 2, p. 100-105, 2013.

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

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

Flora de Santa Catarina.
<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/home> (acesso 21 de dezembro de 2015).

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

GRIFFIN, C.T.; DANAHER, M.; ELLIOT, C. T.; KENNEDY, D. G.; FUREY, A. Detection of pyrrolizidine alkaloids in commercial honey using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1577-1583, 2013.

HARTMANN, T., ZIMMER, M. Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. **Journal of plant physiology**, v.122, p.67-80, 1986.

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, 2011.

JOHNSON, E.L., REYNOLDS, D.L., WRIGHT, D.S., PACHLA, L.A. Biological Sample Preparation and Data Reduction Concepts in Pharmaceutical Analysis. **Journal of Chromatography Science**, p. 26, v. 372, 1988.

JOOSTEN, L. et al. The analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Jacobaea vulgaris*; a comparison of extraction and detection methods. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 2, p. 197-204, 2010.

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, p. 158-168, 2010.

MARTINS, Daiane. 2009. Florística, fitossociologia e potencialidades medicinais em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. Dissertação do Programa de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade do Estado e Santa Catarina – UDESC. 127p.

MAURIZIO A, LOUVEAUX J. 1965. Pollens de plantes mellifères d'Europe. Union des Groupements Apicoles Français, Paris.

MENDONÇA, K.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, B.A.; ALMEIDA-ANACLETO, D.; MORETI, A.C.C.C. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. **Neotropical Entomology**, v. 37, p.513-521, 2008.

MORETI, A.C.C.C.; CARVALHO, C.A.L.; OLIVEIRA, P.C.F.; MARCHINI, L.C. Botânica e fisiologia vegetal. Espectro polínico de amostras de méis de *Apis mellifera* L. coletadas na Bahia. **Bragantia**, Campinas, v.59, n.1, p.1-6, 2000.

PILATI, C.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Asteracea) em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica**, v. 27, n. 7, p. 287-296, 2007.

PONNUCHAMY, Raja et al. Honey pollen: using melissopalynology to understand foraging preferences of bees in tropical South India. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e101618, 2014.

ROUBIK, D.W. & MORENO, J.E.P. (1991). Pollen and spores of Barro Colorado Island. St Louis: Miss. Botan. Gard. Press, Monogr. Syst. Bot., 36: 268.

SANTOS, R.F.; KIILL, L.H.P.; ARAÚJO, J.L.P. Levantamento da flora melífera de interesse apícola no município de Petrolina-PE. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.19, n.3, p.221-227. 2006.

SATTLER, José Augusto Gasparotto et al. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**, v. 77, p. 82-91, 2015.

SHIMSHONI, Jakob Avi et al. Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas peppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 12, p. 2058-2067, 2015.

STEGELMEIER, B. L. Pyrrolizidine Alkaloid - Containing Toxic Plants (Senecio, Crotalaria, Cynoglossum, Amsinckia, Heliotropium, and Echium spp.). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.27, p. 419-428, 2011.

STRASSBURG, Bernardo BN et al. When enough should be enough: Improving the use of current agricultural lands could meet production demands and spare natural habitats in Brazil. **Global Environmental Change**, v. 28, p. 84-97, 2014.

STUESSY, Tod F. Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data. Columbia University Press, 2009.

THESE, A. et al. Structural screening by multiple reaction monitoring as a new approach for tandem mass spectrometry: presented for the

determination of pyrrolizidine alkaloids in plants. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 29, p. 9375-9383, 2013.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320 p.

UNEP-WCMC, 2010. United Nations Environment Programme World Conservation Monitoring Centre (UNEP-WCMC), 2009–2010. UNEP-WCMC Species Database. UNEP-WCMC, Cambridge, UK., In: <http://www.unep-wcmc.org>

VALESE, A. 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, 2016.

VORWOHL, G. Pollen spectra of African honeys. In: **Proc IVth Int Palynol Conf. Lucknow, Sweden**. 1981. p. 499-502.

ZOUCAS, Beatriz Casses. 2002. Subsídios para restauração de áreas degradadas: Banco de dados e análise das espécies vegetais de ocorrência no Sul de Santa Catarina. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina. 132p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os alcaloides pirrolizidínicos são toxinas naturais, produzidos pelas plantas, que podem causar intoxicação humana através do consumo direto ou através da contaminação indireta. Apesar dos graves efeitos tóxicos causados pelos PAs, ainda não existem legislações definindo limites máximos de resíduos em alimentos ou alimentos para animais. Orientações ou doses diárias toleráveis em alguns países foram estabelecidas a partir de vários estudos independentes, mas as doses ainda não foram padronizadas perante a toxicidade desses alcaloides. Devido a essa problemática e para garantir a segurança do consumidor, nesse trabalho foi possível desenvolver uma metodologia sensível capaz de quantificar com precisão e exatidão oito PAs através de um procedimento simplificado de preparação de amostras aplicável a matriz mel, pólen e plantas do gênero *Senecio Brasiliensis*, o qual foi desenvolvido e validado. Os parâmetros de desempenho analíticos estão todos de acordo com o protocolo de validação da Comissão Europeia 2002/657/CE, em termos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, $CC\alpha$, $CC\beta$, estabilidade e robustez.

No método proposto, oito PAs foram determinadas em 11 minutos, com preparo de amostra simples, rápido e eficiente e a aplicabilidade do método foi verificada e aplicada em 92 amostras comerciais, mostrando bom desempenho analítico que o torna adequado para aplicação em laboratórios de alimentos para a análise de rotina. Das amostras analisadas, foram encontrados resíduos em 99,1%, demonstrando a importância de controlar esses compostos e delas 35% estavam acima do valor recomendado para ingestão diária. Desta

maneira é essencial que os órgãos competentes incluam em seus programas de monitoramento a análise desses compostos de maneira a incluir todos os alimentos relevantes e possibilitar a condução de uma avaliação de risco mais completa.

Um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken foi utilizado a fim de viabilizar o preparo de amostra ótimo com um número reduzido de experimentos. No planejamento fatorial foi possível observar que os fatores temperatura e proporção de solvente orgânico apresentavam efeito positivo na resposta das matrizes pólen e plantas do gênero *Senecio brasiliensis*. O método desenvolvido foi aplicado nas amostras de mel, pólen e plantas, todas coletadas na mesma época e região e de acordo com os resultados encontrados, foi evidenciado que as maiores concentrações encontradas no mel foram também encontradas nas amostras de pólen e planta da mesma região. Todas as amostras de mel analisadas, exceto a São Joaquim 1 estão acima dos valores recomendados de ingestão diária, assim como as amostras de pólen que chegam até 4000 vezes acima do valor recomendado.

Como perspectivas de trabalho, a divulgação desse trabalho em forma de cartilhas e palestras será realizada para órgãos regulamentadores federais e estaduais a fim de orientar os apicultores com medidas preventivas, como a seleção dos melhores locais para o posicionamento das colmeias e remoção das plantas tóxicas para reduzir a contaminação do mel.

APÊNDICE A

Tabela 2.15. Valor da incerteza padrão da determinação de equimidina em mel por LC-MS/MS.

Tipo	Fonte	Valor	Divisor	u(x)	Unidade entrada	Distribuição	Ci	u(y)	Unidade de saída	Veff	Contribuição
B	u(m)	0,00767	2,00	0,0038	g	t-Student	-3,63E-02	-0,0001	ug kg-1	∞	-0,03%
B	u(V)	0,00947	2,00	0,0047	ml	t-Student	1,90E+00	0,0090	ug kg-1	∞	2,00%
B	u(fc)	0,01411	2,00	0,0071	ug kg-1	t-Student	8,19E-02	0,0006	ug kg-1	∞	0,13%
A	u(L)	0,26946	2,00	0,1342	ug kg-1	t-Student	1,77E-08	0,0000	ug kg-1	17,00	0,00%
A	u(R&R)	0,44208	1,00	0,4421	ug kg-1	t-Student	1,00E+00	0,4421	ug kg-1	12,00	97,90%
				Incerteza padrão combinada (uc)=			0,4422	Veff=	12,01		
				incerteza expandida (U) =			0,9860				
				fator de abrangência (K)=			2,23				

u(x) - Incerteza padrão de entrada ; u(y) - Incerteza padrão de saída; Ci- Coeficiente de sensibilidade.

Tabela 2.16. Valor da incerteza padrão da determinação de licopsamina+intermidina em mel por LC-MS/MS.

TIPO	Fonte	Valor	Divisor	u(x)	Unidade entrada	Distribuição	Ci	u(y)	Unidade de saída	Veff	Contribuição
B	u(m)	0,00767	2,00	0,0038	g	t-Student	-5,98E-02	-0,0002	ug kg-1	∞	-0,02%
B	u(V)	0,00947	2,00	0,0047	ml	t-Student	2,10E+00	0,0099	ug kg-1	∞	1,25%
B	u(fc)	0,01519	2,00	0,0076	ug kg-1	t-Student	7,69E-02	0,0006	ug kg-1	∞	0,07%
A	u(L)	0,42878	2,00	0,2144	ug kg-1	t-Student	2,19E-08	0,0000	ug kg-1	17,00	0,00%
A	u(R&R)	0,78222	1,00	0,7822	ug kg-1	t-Student	1,00E+00	0,7822	ug kg-1	12,00	98,69%
				Incerteza padrão combinada (uc)=			0,7823	Veff=	12,00		
				incerteza expandida (U) =			1,7445				
				fator de abrangência (K)=			2,23				

u(x) - Incerteza padrão de entrada ; u(y) - Incerteza padrão de saída; Ci- Coeficiente de sensibilidade.

Tabela 2.17. Valor da incerteza padrão da determinação de monocrotalina em mel por LC-MS/MS .

Tipo	Fonte	Valor	Divisor	u(x)	Unidade entrada	Distribuição	Ci	u(y)	Unidade de saída	Veff	Contribuição
B	u(m)	0,00767	2,00	0,0038	g	t-Student	-5,98E-02	-0,0002	ug kg-1	∞	-0,01%
B	u(V)	0,00947	2,00	0,0047	ml	t-Student	3,14E+00	0,0149	ug kg-1	∞	1,88%
B	u(fc)	0,01316	2,00	0,0066	ug kg-1	t-Student	8,76E-02	0,0006	ug kg-1	∞	0,07%
A	u(L)	0,42878	2,00	0,2144	ug kg-1	t-Student	2,19E-08	0,0000	ug kg-1	17,00	0,00%
A	u(R&R)	0,77534	1,00	0,7753	ug kg-1	t-Student	1,00E+00	0,7753	ug kg-1	12,00	98,07%
				Incerteza padrão combinada (uc)=			0,7755	Veff=	12,01		
				incerteza expandida (U) =			1,7293				
				fator de abrangência (K)=			2,23				

u(x) - Incerteza padrão de entrada ; u(y) - Incerteza padrão de saída; Ci- Coeficiente de sensibilidade.

Tabela 2.18. Valor da incerteza padrão da determinação de retrorsina em mel por LC-MS/MS.

Tipo	Fonte	Valor	Divisor	u(x)	Unidade entrada	Distribuição	Ci	u(y)	Unidade de saída	Veff	Contribuição
B	u(m)	0,00767	2,00	0,0038	g	t-Student	-3,63E-02	-0,0001	ug kg-1	∞	-0,01%
B	u(V)	0,00947	2,00	0,0047	ml	t-Student	1,90E+00	0,0090	ug kg-1	∞	1,00%
B	u(fc)	0,01151	2,00	0,0058	ug kg-1	t-Student	1,00E-01	0,0006	ug kg-1	∞	0,06%
A	u(L)	0,21232	2,00	0,1062	ug kg-1	t-Student	1,45E-08	0,0000	ug kg-1	17,00	0,00%
A	u(R&R)	0,89208	1,00	0,8921	ug kg-1	t-Student	1,00E+00	0,8921	ug kg-1	12,00	98,95%
				Incerteza padrão combinada (uc)=			0,8921	Veff=	12,00		
				incerteza expandida (U) =			1,9895				
				fator de abrangência (K)=			2,23				

u(x) - Incerteza padrão de entrada ; u(y) - Incerteza padrão de saída; Ci- Coeficiente de sensibilidade.

