

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NOS TEORES DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM MÉIS SILVESTRES

P. Brugnerotto¹, C. T. P. Deolindo², L. Molognoni³, S. K. T. Seraglio⁴, R. B. Hoff⁵, A.C.O. Costa⁶

1-Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 88034-001 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone +55 (48) 3721-5374 – e-mail: (patriciabrugnerotto@gmail.com)

2-Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 88034-001 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone +55 (48) 3721-5374 – e-mail: (carolinaturnes.pd@gmail.com)

3-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Seção Laboratorial Avançada de São José/SC – CEP: 88102-600 – São José – SC – Brasil, Telefone +55 (48) 3261-9900 – e-mail: (luciano.molognoni@contratado.agricultura.gov.br)

4-Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 88034-001 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone +55 (48) 3721-5374 – e-mail: (siluanaseraglio@hotmail.com)

5-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Seção Laboratorial Avançada de São José/SC – CEP: 88102-600 – São José – SC – Brasil, Telefone +55 (48) 3261-9900 – e-mail: (rodrigo.hoff@agricultura.gov.br)

6-Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 88034-001 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone +55 (48) 3721-5374 – e-mail: (ana.costa@ufsc.br)

RESUMO - Os alcaloides pirrolizidínicos (AP) são toxinas naturais relacionadas ao mecanismo de defesa de plantas, sendo considerados nocivos à saúde de animais e seres humanos. Nos méis, os AP são adicionados pelas abelhas, uma vez que, esses insetos coletam néctar/pólen de plantas que os contêm. Porém, ainda há carência de estudos sobre a estabilidade desses compostos em méis, especialmente frente ao aquecimento. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os teores de AP em méis e sua estabilidade quando o mel foi submetido ao tratamento térmico (TT) de 45 °C por 48 h. Dos oito AP investigados, a monocrotalina foi quantificada em todas as amostras, com teores < 50 µg kg⁻¹. O TT não apresentou influência significativa sobre os teores de AP, porém, foram encontradas diferenças significativas no teor de monocrotalina entre as amostras avaliadas, fato que pode estar fortemente relacionado às diferentes fontes botânicas de pólen/néctar coletados pelas abelhas.

ABSTRACT - Pyrrolizidine alkaloids (PA) are natural toxins related to plant defense mechanisms and are considered harmful to animals and humans health. In honeys, PA is added by the bees, since, these insects collect nectar/pollen from plants that contain PA. However, there is an absence of the studies about these compounds stability honeys, especially when facing heating. Therefore, the objective of this work was to evaluate PA levels in honey and its stability when the honey was subjected to a heat treatment (HT) of 45 °C for 48 h. Of the eight PA investigated, monocrotaline was quantified in all samples, with levels <50 µg kg⁻¹. The HT has not presented a significant influence on the AP contents, however, significant differences in the monocrotaline content were found among the evaluated samples, a fact that may be strongly related to the distinct botanical sources of pollen/nectar collected by the bees.

PALAVRAS-CHAVE: Aquecimento; *Apis mellifera*; LC-MS/MS; Qualidade; Segurança alimentar

KEYWORDS: Heating; *Apis mellifera*; LC-MS/MS; Quality; Food Safety

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem em sua composição diversas substâncias divididas em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários possuem funções relacionadas, principalmente, com a capacidade de competição e sobrevivência das plantas (Taiz; Zeiger, 2009) e estão distribuídos em três grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio. No último grupo são destacados os alcaloides (Vizzotto, Krolow e Weber, 2010). Especificamente os alcaloides pirrolizidínicos (AP), formados a partir de aminoácidos pirrolizidínicos (base necina) e ácido alifático ramificado (ácido necico), além de seus N-óxidos, são toxinas naturais e agem como mecanismo de defesa de diversas espécies de plantas (Moreira et al., 2018; Picron et al., 2019). Supõe-se que mais de 3 % (6.000) de todas as espécies de plantas com flores contêm AP/N-óxido (Kaltner et al., 2018), sendo que, muitas delas desenvolvem-se e crescem em sistemas de produção de mel (Jesus et al., 2019; Nedelcheva et al., 2015).

As abelhas que buscam recursos nectaríferos e/ou poliníferos em plantas que contêm AP, podem lixiviar tais toxinas para o mel (Valese et al., 2016). Portanto, os seres humanos podem ser expostos a essas toxinas de forma direta, pelo uso medicinal de chás ou outros produtos à base de plantas (Bodi et al., 2014); e/ou de forma indireta, pelo consumo de produtos de origem animal, por exemplo o mel (Draiaia et al., 2019; Jesus et al., 2019; Valese et al., 2016) e produtos derivados que utilizam mel em sua formulação (como produtos de panificação, sobremesas e suplementos alimentares). Os AP 1,2-insaturados e seus N-óxidos somente se tornam potencialmente tóxicos quando biotransformados, principalmente no fígado, pelas monoxigenases (enzimas microsossomais hepáticas) do citocromo P-450, formando derivados pirrólicos altamente reativos que atuam como agentes alquilantes e, portanto, vem sendo considerados substâncias potencialmente genotóxicas e cancerígenas (Chen et al., 2019; Ebmeyer et al., 2019; Louisse et al., 2019).

A aparência desempenha um papel fundamental na comercialização do mel pois, geralmente, os consumidores buscam um produto não cristalizado. O mel é coletado em estado líquido, no entanto, a cristalização é um fenômeno natural pelo qual o produto passa e a velocidade com que esse processo ocorre, depende de vários fatores, como a origem botânica e geográfica, temperatura de armazenamento, teor de umidade e de açúcares (Bergamo et al., 2019; Escriche et al., 2009; European Commission, 2013). Para retardar o processo natural de cristalização, muitos apicultores e entrepostos de mel submetem o produto a um processo de aquecimento antes de ser destinado ao varejo com o objetivo de dissolver os microcristais de açúcares e remover as bolhas de ar, que atuam como núcleos de cristalização (European Commission, 2013). Na literatura já está bem estabelecido que a falta de controle na temperatura aplicada, além do tempo que o mel permanece sobre o calor, podem levar a uma redução na qualidade desse produto (Castro-Vázquez et al., 2008; Moreira et al., 2007), no entanto, dados sobre a estabilidade de AP frente ao processamento térmico aplicado em méis, até o presente momento, são inexistentes. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do tratamento térmico nos teores de oito AP em méis silvestres, oriundos do município de Urubici, Santa Catarina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões analíticos

Os padrões analíticos de retrorsina, retrorsina-N-óxido, senecionina, senecionina N-óxido e monocrotalina foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). A equimidina, intermedina e licopsamina, foram adquiridos da Planta Analytica (Danbury, EUA). Todos os padrões comerciais possuem pureza superior a 95%.

2.2 Amostras e aplicação do tratamento térmico

Quatro quadros de méis silvestres fornecidos por diferentes apicultores de Urubici (Santa Catarina, Brasil) foram acondicionados em sacos plásticos e transportados em caixas isotérmicas ao Laboratório de Química de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina. No laboratório, os méis foram drenados manualmente e fracionados em duas partes. Uma das partes conservou-se sob congelamento ($-18 \pm 2,0$ °C) e a outra foi submetida ao aquecimento sob condição controlada em estufa (modelo Q315M, Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) a 45 ± 2 °C por 48 h (Escriche et al., 2009), seguida de resfriamento à temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C).

2.3 Preparo de amostras

O preparo dos extratos foi realizado conforme descrito por Valese et al. (2016). As amostras homogeneizadas ($2,0 \pm 0,1$ g) foram dissolvidas em 5 mL de água ultrapura (Milli-Q Simplicity® UV system, Millipore Corporation, França) e homogeneizadas em vórtex (Morconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 40 s. Posteriormente, uma alíquota de 200 µL de cada extrato e 800 µL de fase móvel (98:2; água + 0,1 % ácido fórmico:acetonitrila + 0,1 % ácido fórmico) foram combinados e centrifugados (Thermo Fisher Scientific, MA, E.U.A.) a 9861 g durante 20 min e o sobrenadante injetado no sistema de cromatográfica líquida. O procedimento foi realizado em três réplicas independentes para cada amostra.

2.4 Condições instrumentais

O procedimento analítico foi realizado com base na metodologia descrita por Valese et al. (2016). Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Agilent Technologies, modelo 1290 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) acoplado a um espectrômetro de massas, modelo QTRAP® 5500 (AB Sciex, Foster City, CA), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*.

2.5 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e para identificar diferenças significativas entre as amostras foi realizada análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ($p < 0,05$) empregando o *software Statistica* (versão 13.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de AP quantificados nos méis silvestres com e sem tratamento térmico são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Teores de alcaloides pirrolizidínicos ($\mu\text{g kg}^{-1}$; média $\pm$ desvio padrão) nas amostras de méis com e sem tratamento térmico.

	Méis	MON	SEN
1	ST	$36,30 \pm 0,03^{ab}$	$33,40 \pm 2,90^a$
	CT	$31,10 \pm 1,27^{bc}$	$33,15 \pm 0,42^a$
2	ST	$48,90 \pm 4,90^a$	<LOQ
	CT	$35,90 \pm 0,71^{abc}$	
3	ST	$19,55 \pm 3,04^{cd}$	<LOQ
	CT	$13,80 \pm 0,57^d$	
4	ST	$41,05 \pm 3,32^{ab}$	$29,95 \pm 1,91^a$
	CT	$43,50 \pm 9,62^{ab}$	$30,24 \pm 1,91^a$

Legenda: ST – sem tratamento térmico; CT – com tratamento térmico; MON – monocrotalina; SEN – senecionina; ^{a-d} letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao considerar uma porção de consumo de 20 g de mel por dia (Dübecke et al., 2011) e, baseando-se em uma ingestão diária menor que $1 \mu\text{g AP/kg/dia}$, o mel não deve conter mais de $50 \mu\text{g}$ de AP/kg de produto (Dübecke et al., 2011; Valse et al., 2016). Conforme apresentado na Tabela 1, dos dois AP determinados nos méis, com e sem tratamento térmico, ambos apresentaram teores abaixo do recomendado ($< 50 \mu\text{g}$ de AP/kg). A equimidina, licopsamina+intermedina, senecionina N-óxido, retrorcina, retrorcina N-óxido e equimidina ficaram abaixo do limite de quantificação ($0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$).

A senecionina foi quantificada apenas nas amostras 1 e 4 e as concentrações nas amostras sem tratamento térmico variaram de $29,95 \pm 1,91$ a $33,40 \pm 2,90 \mu\text{g kg}^{-1}$. A monocrotalina foi o AP majoritário em todas as amostras ($19,55 \pm 3,04$ a $48,9 \pm 4,90 \mu\text{g kg}^{-1}$). O mesmo comportamento foi observado para os méis tratados termicamente. Conforme os resultados obtidos, também foi possível concluir que o tratamento térmico aplicado nesse estudo não resultou em alterações significativas nos teores de AP quando comparados às amostras não tratadas termicamente, indicando que os AP investigados são estáveis a esta condição de aquecimento. Portanto, o aquecimento térmico moderado, como o aplicado nesse estudo, não parece ser uma eficiente estratégia para redução do teor de AP em méis.

Diferenças significativas foram observadas entre as amostras para a monocrotalina. Essas diferenças observadas podem ser comuns, considerando que os AP são compostos secundários produzidos exclusivamente por plantas, as diferentes fontes ofertantes de néctar e pólen dos diferentes locais de coleta (apiários distintos) influenciam diretamente na composição e concentração do(s) AP. Dessa maneira, justifica-se a variabilidade significativa no teor de monocrotalina quantificada nas diferentes amostras, mesmo estas sendo oriundas do mesmo município.

4. CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a influência do tratamento térmico ($45^\circ\text{C}/48 \text{ h}$) nos teores de AP em méis silvestres oriundos de Urubici/SC. A partir dos resultados preliminares obtidos, foi considerado que os AP são estáveis ao aquecimento moderado, uma vez que estes não sofreram degradação significativa frente ao tratamento aplicado. Todas as amostras apresentaram teores de AP $< 50 \mu\text{g}$ de AP/kg e a variabilidade dos resultados foi relacionada diretamente com a origem botânica do mel. Os autores destacam que os resultados obtidos são considerados exploratórios e preliminares, uma vez que, até a presente data, não foram encontrados estudos publicados nessa ordem.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – Seção Laboratorial Avançada de São José/SC e aos apicultores colaboradores pela doação das amostras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bergamo, G., Seraglio, S.K.T., Gonzaga, L.V., Fett, R., Costa, A.C.O., 2019. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. *Food Res. Int.* 116, 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.007>
- Bodi, D., Ronczka, S., Gottschalk, C., Behr, N., Skibba, A., Wagner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Preiss-Weigert, A., These, A., 2014. Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 31, 1886–1895. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.964337>
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., de la Fuente, E., Pérez-Coello, M.S., 2008. Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of Citrus honey. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1999–2006. <https://doi.org/10.1021/jf072227k>
- Chen, L., Peijnenburg, A., de Haan, L., Rietjens, I.M.C.M., 2019. Prediction of in vivo genotoxicity of lasiocarpine and riddelliine in rat liver using a combined in vitro-physiologically based kinetic modelling-facilitated reverse dosimetry approach. *Arch. Toxicol.* 93, 2385–2395. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02515-5>
- Draiaia, R., Borin, A., Martinello, M., Gallina, A., Mutinelli, F., Chéfrour, A., 2019. Pyrrolizidine Alkaloids in Some Algerian's Honeys Radia. *World J. Environ. Biosci.* 8, 29–40.
- Dübecke, A., Beckh, G., Lüllmann, C., 2011. Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. *Food Addit. Contam. Part A* 28, 348–358. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.541594>
- Ebmeyer, J., Behrend, J., Lorenz, M., Günther, G., Reif, R., Hengstler, J.G., Braeuning, A., Lampen, A., Hessel-Pras, S., 2019. Pyrrolizidine alkaloid-induced alterations of prostanoid synthesis in human endothelial cells. *Chem. Biol. Interact.* 298, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.007>
- Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., Fito, P., 2009. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chem.* 112, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.068>
- European Commission, 2013. Final Report Summary - TOPHONEY (Enhancing the quality attributes of processed honey and avoiding its crystallisation by the application of a non-thermal treatment process).
- Jesus, M.C., Hungerford, N.L., Carter, S.J., Anuj, S.R., Blanchfield, J.T., De Voss, J.J., Fletcher, M.T., 2019. Pyrrolizidine Alkaloids of Blue Heliotrope (*Heliotropium amplexicaule*) and Their Presence in Australian Honey. *J. Agric. Food Chem.* 67, 7995–8006. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02136>
- Kaltner, F., Rychlik, M., Gareis, M., Gottschalk, C., 2018. Influence of Storage on the Stability of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Peppermint Tea, Hay, and Honey. *J. Agric. Food Chem.* 66, 5221–5228. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06036>
- Louisse, J., Rijkers, D., Stoopen, G., Holleboom, W.J., Delagrangé, M., Molthof, E., Mulder, P.P.J., Hoogenboom, R.L.A.P., Audebert, M., Peijnenburg, A.A.C.M., 2019. Determination of

27 A 29 DE MAIO DE 2020
BENTO GONÇALVES • RS



**7º Simpósio de
Segurança Alimentar**

INOVAÇÃO COM SUSTENTABILIDADE

- genotoxic potencies of pyrrolizidine alkaloids in HepaRG cells using the γ H2AX assay. Food Chem. Toxicol. 131, 110532. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.040>
- Moreira, R., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., 2018. Pyrrolizidine alkaloids: Chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. Int. J. Mol. Sci. 19, 14–22. <https://doi.org/10.3390/ijms19061668>
- Moreira, R.F.A., De Maria, C.A.B., Pietroluongo, M., Trugo, L.C., 2007. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. Food Chem. 104, 1236–1241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.055>
- Nedelcheva, A., Kostova, N., Sidjimov, A., 2015. Pyrrolizidine alkaloids in Tussilago farfara from Bulgaria. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 29, 1–7. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1047149>
- Picron, J.F., Herman, M., Van Hoeck, E., Goscinny, S., 2019. Monitoring of pyrrolizidine alkaloids in beehive products and derivatives on the Belgian market. Environ. Sci. Pollut. Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04499-2>
- Valese, A.C., Molognoni, L., Ploêncio, L.A. de S., De Lima, F.G., Gonzaga, L., Górnaiak, S.L., Daguer, H., Barreto, F., Carolina, A., Costa, O., 2016. A fast and simple LC-ESI-MS / MS method for detecting pyrrolizidine alkaloids in honey with full validation and measurement uncertainty. Food Control 67, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.050>
- Vizzotto, Krolow e Weber. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>>