



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

BIBIANA DA SILVA

**MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham):  
COMPOSTOS BIOATIVOS, POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E  
MARCADORES PROTEÔMICOS DE AUTENTICIDADE**

FLORIANÓPOLIS

2020

Bibiana da Silva

**MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham): COMPOSTOS  
BIOATIVOS, POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E MARCADORES  
PROTEÔMICOS DE AUTENTICIDADE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel.

Florianópolis

2020

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

Silva , Bibiana da  
Mel de melato de bracatinga (Mimosa scabrella Bentham)  
: compostos bioativos, potencial anti-inflamatório e  
marcadores proteômicos de autenticidade / Bibiana da Silva  
; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa,  
coorientador, Harshadrai M. Rawel, 2020.  
225 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Mel de melato de  
bracatinga. 3. Propriedades bioativas. 4. Análise  
proteômica. 5. Autenticidade . I. Costa, Ana Carolina de  
Oliveira. II. Rawel, Harshadrai M.. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Bibiana da Silva

**Mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham): compostos bioativos,  
potencial anti-inflamatório e marcadores proteômicos de autenticidade**

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

Profª Dra Eliana Badiale Furlong  
Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. Thiago Caon  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado  
adequado para obtenção do título de doutor em Ciências dos Alimentos.

---

Profª. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profª. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa  
Orientadora

Florianópolis, 2020.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico ao meu pai, Alzino,  
com todo amor e saudade  
que um coração pode sentir.

## AGRADECIMENTOS

Pai e mãe: muito obrigada! Eu que tenho orgulho de vocês e não o contrário. Se estou hoje escrevendo estas palavras neste documento é porque sempre ouvi de vocês que eu podia fazer o que eu quisesse, que eu deveria ir para onde eu quisesse e que deveria arriscar. Pai, obrigado por ter sido tão infinitamente orgulhoso a ponto de me fazer sentir especial. Você é a minha maior saudade.. Te amo para sempre!

Ao Neto, meu amado parceiro de vida e aventuras, obrigada por ser presente, por dar apoio, carinho, proteção e críticas. O caminho é mais leve porque ando com você! Esse momento é nosso!

À Ana, minha orientadora, eu agradeço primeiro por ser humana, por me acolher quando precisei e por acreditar em mim! Obrigada pela empatia, o mundo precisa de pessoas que enxerguem as outras! Obrigada por tanto contribuir com meu amadurecimento profissional e pela nossa parceria!

A todos os membros do Grupo de Pesquisa em Antioxidantes Naturais do LabQA, incluindo a Profa. Roseane e todos os colegas, obrigada pelo acolhimento e pelos momentos de descontração e parceria! Um agradecimento especial ao Luciano, por toda a ajuda, disponibilidade, confiança, sugestões e motivação! Obrigada!

Profe Eliana, obrigado mais uma vez e sempre! Por ter me ajudado não só no início da Pós-Graduação, mas até hoje, sempre com as palavras e conselhos certos. Obrigada por ser esse exemplo de professora! Estendo meus agradecimentos a FURG, universidade que me acolheu e onde fiz tantos amigos!

À Epagri pela parceria e por ceder amostras de mel para que este estudo pudesse ser realizado. Agradeço também aos apicultores da região Sul do Brasil, em especial de Santa Catarina pela colaboração em ceder amostras de mel e pelo importante trabalho que realizam.

Ao Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, do Departamento de Análises Clínicas da UFSC, e à sua aluna de doutorado Eduarda Talita Bramorski Mohr pela parceria e fundamental colaboração para os experimentos de potencial anti-inflamatório. Ao Prof. Thiago Caon, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC pela disponibilidade e por colaborar com os experimentos de potencial anti-inflamatório.

*To Professor Rawel and Instrumental Analysis for Nutritional Sciences group from the University of Potsdam: thanks for the welcome, for teaching me so much and for all the time we spent together! Professor Rawel, you are an example as a teacher, patient and welcoming; thanks for introducing me to proteomics. Sorel, thank you for all the support in the experiments.*

*Tess, Kristine (Evi, Felix, and Christian), Gustavo and Linn: thanks for all the support and good moments; my dear friends! Prof Susanne Balderman and colleagues from Leibniz Institute – IGZ: thank you for all the support. Thank you so much to all of you for supporting me in the most difficult moment of my life; I will never forget what you have done for me! I miss you and Germany! Vielen Dank!*

*To Claudia for all the support, for taking care of people and for teaching me a lot about German history and culture. Thank you for all the tips, advices, and tours! I could not have lived in a better place in Potsdam! Thanks for introducing me to my dear friends Jeanne and Soraya! We had great times in Potsdam and I could learn about Iran and Philippines! Danke!*

À Adriana, meu presente brasileiro na Alemanha, pelo apoio e por compartilhar risadas e passeios inesquecíveis e por ter se tornado uma amiga!

Aos meus amados amigos-família em Florianópolis, Roberta, André, Jane e Agnelo, obrigada pelo apoio, acolhimento e pelos momentos de alegrias que sempre vivemos juntos! A todos os meus amigos de SC, do MT e do RS, obrigada pelo carinho sempre!

Aos membros da banca: Profa. Eliana Badiale-Furlong, Prof. Maurício Sedrez, Prof. Thiago Caon, Profa. Renata Amboni, Profa. Isabela Toaldo e Heitor Daguer pela disponibilidade em participar deste momento e por todas as contribuições com este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos pela estrutura física e profissional. A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à CAPES/DAAD pela concessão da bolsa de estudos do doutorado sanduíche.

À todos os estudantes e professores que fazem pesquisa no Brasil, especialmente as mulheres: juntos somos mais fortes e mais sábios!

## EPÍGRAFE

*O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele.*

*Immanuel Kant, filósofo prussiano, século XVII*



## RESUMO

O mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) é produzido a partir de excreções da cochonilha *Stigmacoccus paranaensis* Foldi encontradas no caule desta árvore, que são coletadas pelas abelhas *Apis mellifera* como matéria-prima para produção de mel. O fenômeno ocorre na região Sul do Brasil e o mel de melato de bracatinga é atrativo para o mercado internacional devido à sua cor escura e sabor diferenciado, quando comparado aos méis de origem floral. Atualmente existe a demanda por estudos que avaliem o potencial benéfico do mel de melato de bracatinga à saúde humana, bem como estratégias que permitam determinar a autenticidade deste produto. Conseqüentemente, a cadeia produtiva do mel de melato de bracatinga tende a ser fortalecida e alcançar maior visibilidade, representando inúmeras vantagens para os apicultores e para a região Sul do Brasil. Frente ao exposto, os objetivos deste trabalho foram: (i) desenvolver métodos para a extração e separação simultânea de 18 compostos fenólicos em amostras de mel de melato de bracatinga; (ii) avaliar o potencial anti-inflamatório e estabelecer correlação com o perfil de compostos fenólicos; (iii) e determinar marcadores de autenticidade deste produto por meio da análise proteômica. Para estes fins, o planejamento de mistura Simplex-Centroide e o delineamento composto central rotacional foram empregados para otimização do método de separação de compostos fenólicos por HPLC-DAD, cuja resposta otimizada foi definida empregando a *desirability function* (função de desejabilidade). O método foi validado e aplicado para quantificação de amostras de mel de melato de bracatinga, e os resultados foram considerados satisfatórios de acordo com os critérios de validação analítica recomendados pela Eurachem. Paralelamente, o método QuEChERS (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi modificado a fim de promover uma extração eficiente de compostos fenólicos desta matriz, resultando em uma estratégia de preparo de amostras rápida, simples, de baixo custo e com menor geração de resíduos, aplicado pela primeira vez em amostras de mel de melato de bracatinga. Após a caracterização fenólica as amostras foram avaliadas com relação ao potencial anti-inflamatório *in vitro*. A inflamação de macrófagos RAW 264.7 foi induzida com lipopolissacarídeo (LPS) e, o mel de melato de bracatinga foi testado em diferentes concentrações como modulador da expressão de óxido nítrico e das citocinas pró e anti-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$  e IL-10. Catorze das dezesseis amostras avaliadas modularam a secreção dos mediadores inflamatórios, sendo que a composição e concentração de compostos fenólicos destas amostras se mostrou associada à distinção entre a atuação das mesmas. Finalmente, para a determinação de marcadores de

autenticidade do mel de melato de bracatinga, a análise proteômica não-direcionada realizada durante período de doutorado sanduíche na Universidade de Potsdam, Alemanha, apontou a presença de 6 proteínas distintas, pertencentes ao grupo das proteínas de geleia real (MRJP, do inglês *Major Royal Jelly Proteins*). A fim de detectar peptídeos identificadores e quantificadores das proteínas encontradas, um método SRM (monitoramento de reação selecionada, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) foi desenvolvido por LC-ESI-QqQ-MS/MS (cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas triplo quadrupolo) e validado, o que possibilitou a quantificação dos peptídeos de todas as MRJPs, previamente identificadas. O peptídeo QNIDVVAR da MRJP 4 foi considerado um marcador adequado para o mel de melato de bracatinga. A caracterização bioativa e o potencial anti-inflamatório demonstraram que o mel de melato de bracatinga apresenta efeitos benéficos para a saúde humana e a determinação de um marcador de autenticidade adequado contribui para a valorização comercial e cultural do produto.

**Palavras-chave:** Mel de melato. Compostos fenólicos. Otimização de método. Potencial anti-inflamatório. Análise proteômica. Peptídeos marcadores.

## ABSTRACT

Bracatinga honeydew honey (*Mimosa scabrella* Bentham) is produced from excretions of the cochineal *Stigmacoccus paranaensis* Foldi, found on the stem of this tree. The *Apis mellifera* bees collect the excretions as raw material for honeydew honey production. The phenomenon occurs in the southern region of Brazil, and bracatinga honeydew honey is attractive to the international market due to its dark colour and distinctive flavour when compared to floral honeys. Currently, there is a demand for studies that evaluate the biological effects of bracatinga honeydew honey on human health, as well as strategies to determine the authenticity of this product. Consequently, bracatinga honeydew honey production chain could be strengthened and achieve greater visibility, representing advantages for beekeepers and the southern region of Brazil as a whole. Given the above, the aims of this work were: (i) develop methods for the simultaneous extraction and separation of 18 phenolic compounds in bracatinga honeydew honey samples; (ii) evaluate the anti-inflammatory potential and establish a correlation with the phenolic compounds profile; and (iii) evaluate authenticity markers for this product through proteomic analysis. For these purposes, the Simplex-Centroid mixture design and the central rotational composite design were used to optimize the method separation for phenolic compounds by HPLC-DAD, whose optimized response was defined using the desirability function. The method was validated and applied to quantify bracatinga honeydew honey samples. The results were considered reliable according to the Eurachem guidelines. At the same time, the QuEChERS was modified to improve the extraction efficiency of phenolic compounds from bracatinga honeydew honey, resulting in a fast, simple, low cost and solvent saver, sample preparation strategy, applied for the first time bracatinga honeydew honey. After the phenolic characterization, the bracatinga honeydew honey samples were evaluated for their anti-inflammatory potential in vitro. For this purpose, RAW 263.7 macrophages were inflamed with lipopolysaccharide (LPS), and bracatinga honeydew honey was tested in different concentrations as a modulator of the nitric oxide, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$ , and IL-10 expression. Fourteen out of the 16 samples evaluated modulated the secretion of inflammatory mediators, and their phenolic composition was associated with the distinction between their performances. Finally, to determinate the authenticity markers for bracatinga honeydew honey, the untargeted proteomic analysis, performed during sandwich doctoral period at the Potsdam University, Germany, highlighted the presence of 6 distinct proteins, belonging to the major royal jelly proteins (MRJP) group. Identification and quantification of the peptides were made by an SRM method (selected reaction monitoring). It was developed

by LC-ESI-QqQ-MS/MS and validated, which made it possible to quantify the peptides of all MRJPs, previously identified. The peptide QNIDVVAR from MRJP 4 was considered an adequate marker for bracatinga honeydew honey. The bioactive characterization and the anti-inflammatory potential highlighted that the consumption of bracatinga honeydew honey in moderate amounts has beneficial effects on human health. The determination of an appropriate authenticity marker will contribute to the commercial and cultural valorization of the product.

**Keywords:** Honeydew honey. Phenolic compounds. Method optimization. Anti-inflammatory potential. Proteomic analysis. Marker peptides.

## PREFÁCIO

Um fenômeno natural e muito interessante observado na região sul do Brasil – em regiões com altitudes acima de 700 m, principalmente em locais com relevo planáltico – envolve a associação entre uma espécie de árvore nativa da Mata das Araucárias, a bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth); insetos homópteros, mais conhecidos como cochonilhas, que ao se alimentarem da seiva desta árvore excretam o melato, um líquido rico em açúcares; e as abelhas (*Apis mellifera*), que atraídas por essa solução açucarada, a recolhem como se fosse néctar e elaboram um produto único, o mel de melato de bracatinga, cujas características aparentemente são determinadas pela posição geográfica. Este mel de coloração escura, conferida pelo alto teor de sais minerais; gosto menos doce e ligeiramente mais amargo que os de origem floral; além de possuir propriedades bioativas comprovadas, alcançou ampla notoriedade e valorização no mercado internacional, principalmente em território europeu, responsável pela importação de quase que a totalidade dessa produção apícola, que tem safra bianual, relacionado ao ciclo de vida da cochonilha.

O mel de melato de bracatinga também vem ganhando espaço no território nacional, em regiões que ultrapassam os locais de produção, principalmente como resultado dos esforços em conjunto da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) e da Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina (FAASC) junto ao setor apícola, e, nos últimos anos da parceria dessas instituições com o Grupo de Pesquisa em Antioxidantes Naturais da UFSC (GPAN-UFSC), que desenvolve estudos pioneiros com o mel de melato de bracatinga, ampliando os conhecimentos relacionados a esse importante produto de qualidade diferenciada. Os diversos trabalhos publicados pelo GPAN-UFSC fornecem suporte técnico-científico ao setor apícola, e informações importantes a respeito de sua característica singular, decorrente dos recursos naturais disponíveis e inerentes ao local de produção, tais como solo, vegetação e clima. Nos últimos dois anos, as parcerias foram ampliadas, e a busca pela Indicação Geográfica (modalidade Denominação de Origem) do mel de melato de bracatinga teve início com a importante participação do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), além da FAASC, apicultores, Epagri e UFSC. A indicação geográfica pode trazer diversas vantagens como melhor rastreabilidade, desenvolvimento da região produtora, valorização da cultura regional, agregação de valor ao produto, abertura de novos mercados, além da preservação do meio ambiente.

Frente ao exposto, esse estudo tem como proposta, além de ampliar o conhecimento científico relacionado ao mel de melato de bracatinga, atender à demanda por métodos de

extração e determinação de compostos bioativos e de propriedades funcionais relacionadas a estas substâncias. Para isto, os experimentos para avaliação do potencial anti-inflamatório desse mel só foram possíveis a partir da parceria com o Prof. Eduardo Dalmarco do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e apoio do Prof. Thiago Caon do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC e da aluna de doutorado Eduarda Talita Bramorski Mohr. Pela primeira vez esta propriedade foi avaliada para o mel de melato de bracatinga e os resultados indicaram que seu consumo em baixas concentrações é recomendado por ser capaz de prevenir processos inflamatórios. As características que comprovam a funcionalidade do mel de melato de bracatinga associadas ao alto valor agregado deste produto estão entre os principais fatores que contribuem para o aumento da probabilidade de fraude por adulteração desse produto. Nesse contexto, surgiu a demanda por estratégias que demonstrassem a autenticidade do mel de melato de bracatinga produzido na região Sul do Brasil com vistas a estabelecer marcadores de origem botânica e/ou geográfica. Para este propósito, este trabalho apresenta uma estratégia baseada na análise proteômica, inédita para méis de melato, com vistas a identificar peptídeos específicos de proteínas do mel de melato de bracatinga. Este estudo surgiu a partir de um projeto submetido para pleiteio a uma bolsa de doutorado sanduíche pelo Edital CAPES/DAAD nº 22/2018, sendo esta a única bolsa concedida para a área de Ciência de Alimentos neste edital. Os estudos foram conduzidos junto ao Grupo de Análise Instrumental em Ciências Nutricionais, na Universidade de Potsdam, Alemanha, sob orientação do professor Harshadrai Rawel, coorientador desta tese de doutorado. A definição destes marcadores representa uma contribuição de forte relevância para auxiliar na obtenção do selo de denominação de origem do mel de melato de bracatinga, sendo que, além de dificultar a falsificação, este mel passará a possuir uma identidade própria e que o distinguirá dos demais produtos de igual natureza.

## DIAGRAMA CONCEITUAL

### Qual a importância do estudo do mel de melato de bracatinga?

- Produto único da região Sul do Brasil
- Possibilidade de aumento do consumo interno
- Méis de melato são pouco estudados
- Composição diferenciada
- Grupo de pesquisa pioneiro no estudo deste produto

### O que já se sabe sobre o mel de melato de bracatinga?

- Caracterização físico-química
- Perfil de compostos fenólicos
- Bioacessibilidade de compostos bioativos
- Perfil de ácidos orgânicos
- Perfil de aminoácidos
- Perfil de minerais majoritários
- Perfil eletroforético de proteínas

### Quais as lacunas?

- Método efetivo e de baixo custo para extração de compostos fenólicos
- Método rápido por LC-DAD para determinação de compostos fenólicos
- Determinação do potencial anti-inflamatório
- Relação entre o perfil de compostos fenólicos e o potencial anti-inflamatório
- Definição de marcadores de autenticidade
- Definição de marcadores para indicação geográfica

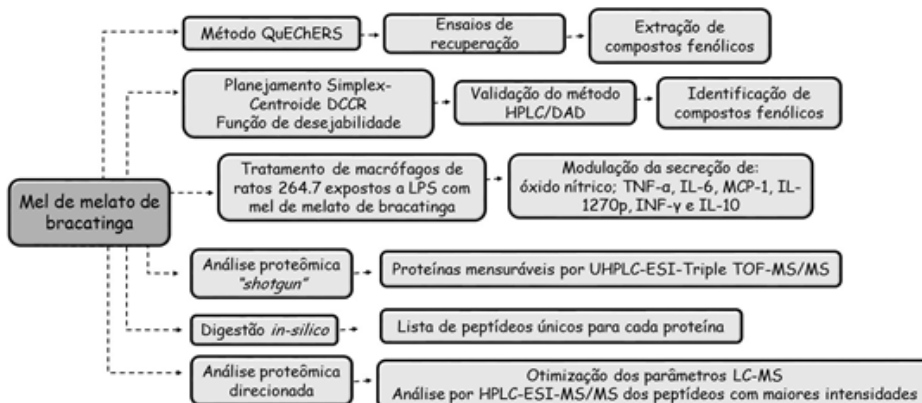
### Quais as perguntas de pesquisa?

- É possível utilizar o método de extração QuEChERS para extração dos compostos fenólicos?
- O mel de melato de bracatinga possui atividade anti-inflamatória?
- Existe relação entre o perfil de compostos fenólicos e a atividade anti-inflamatória?
- Existe algum marcador de autenticidade que possa diferenciar o mel de melato de bracatinga ou vinculá-lo a sua região de origem?

### Quais as respostas?

- Desenvolver e validar métodos de extração (QuEChERS) e identificação (HPLC/DAD) de compostos fenólicos
- Avaliar o potencial anti-inflamatório do mel de melato de bracatinga frente e mediadores liberados por macrófagos de ratos
- Definir peptídeos marcadores de mel de melato de bracatinga por meio de análise proteômica

### Resumo gráfico



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Mapa de ocorrência de <i>Mimosa scabrella</i> Bentham. ....	33
Figura 2. Representação da interação entre (a) bracatinga (b) cochonilha e (c) abelha. ....	34
Figura 3. Representação esquemática da produção de mel de melato a partir de bracatinga. .	36
Figura 4. Representação esquemática da classificação dos macrófagos. ....	39
Figura 5. Representação da rota de biossíntese de algumas classes de compostos fenólicos. .	41
Figura 6. Estrutura química comum aos ácidos fenólicos derivados (a) do ácido cinâmico e (b) do ácido benzóico. ....	42
Figura 7. Estrutura química comum aos flavonoides. ....	43
Figura 8. Representação esquemática do método de QuEChERS. ....	50
Figura 9. Fluxogramas dos métodos QuEChERS recomendados por órgãos reguladores na análise de pesticidas. ....	53
Figura 10. Pontos internos do planejamento Simplex-Centroide. ....	57
Figura 11. Fluxo de execução comum em uma análise proteômica. ....	62

### CAPÍTULO II

Figura 1. Cromatograma de eluição de compostos fenólicos obtido por HPLC-DAD (260, 300 e 325 nm) usando MeOH como modificador orgânico. ....	80
Figura 2. Nomograma de força de solventes para HPLC. ....	81
Figura 3. Cromatograma de eluição de compostos fenólicos obtido por HPLC-DAD (260, 300 e 325 nm) usando ACN como modificador orgânico. ....	82
Figura 4. Cromatograma de separação de compostos fenólicos com fase móvel otimizada pelo planejamento Simplex-Centróide. ....	91
Figura 5. Superfície de resposta da otimização das condições de fluxo e temperatura do método cromatográfico de separação de compostos fenólicos. ....	100
Figura 6. Cromatograma da separação de 18 compostos fenólicos. ....	103

### CAPÍTULO III

Figura 1. Efeito da alíquota de solvente extrator na recuperação dos compostos fenólicos em uma amostra de mel de melato de bracatinga fortificada. ....	125
Figura 2. Efeito da acidificação do solvente extrator na recuperação dos compostos fenólicos em uma amostra de mel de melato de bracatinga fortificada. ....	126
Figura 3. Efeito da adição de NaCl na recuperação de compostos fenólicos em amostra de mel de melato de bracatinga extraídos pelo método de QuEChERS. ....	129
Figura 4. Efeito da adição de sais de limpeza na recuperação de compostos fenólicos em amostra de mel de melato de bracatinga extraídos pelo método de QuEChERS. ....	130
Figura 5. Cromatogramas da amostra de mel de melato fortificado com os padrões de ácido <i>p</i> -cumárico e coniferaldeído extraídos pelo método QuEChERS com dois tipos de sais na etapa de <i>clean-up</i> . ....	131
Figura 6. Recuperação dos compostos fenólicos em amostra de mel de melato de bracatinga fortificada e extraída pelo método QuEChERS. ....	132
Figura 7. Gráficos de dispersão de PCA para (a) amostras de mel de melato de bracatinga relacionados à (b) composição de compostos fenólicos. ....	138



## CAPÍTULO IV

Figura 1. Viabilidade de macrófagos RAW 246.7 após tratamento com MMB (1 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Resultados expressos como média $\pm$ EPM (continua). 151	151
Figura 2. Efeitos do MMB nos níveis de (a) TNF- $\alpha$ e (b) IL-6 em macrófagos tratados com LPS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 3/\text{grupo}$ . *** $p < 0,001$ , ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle negativo (LPS), intervalo de confiança de 95%. 156	156
Figura 3. Efeitos do MMB nos níveis de (a) MCP-1e (b) IL-12p70 e (c) INF- $\gamma$ em macrófagos tratados com LPS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 3/\text{grupo}$ . *** $p < 0,001$ , ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle negativo (LPS), intervalo de confiança de 95%. 158	158
Figura 4. Efeitos do MMB nos níveis de IL-10 em macrófagos tratados com LPS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 3/\text{grupo}$ . *** $p < 0,001$ , ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle negativo (LPS), intervalo de confiança de 95%. 160	160

## CAPÍTULO V

Figura 1. Fluxo de trabalho de análise proteômica de MMB. 169	169
Figura 2. SDS-PAGE de (a) MMBp (b) MMBc e (c) MF. Padrão PageRulerTM Prestained Protein Ladder. 175	175
Figura 3. Gráficos de comparação entre (a) abundância da proteína majoritária por SDS-PAGE e o (b) conteúdo de proteínas para os diferentes grupos de amostras de mel. MMBp, mel de melato de bracinga puro, MMBc, mel de melato de bracinga comercial, MF, mel floral. *** $p < 0,0001$ , ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ , pelo teste de Tukey, intervalo de confiança de 95%. 177	177
Figura 4. Alinhamento dos dados disponíveis para MRJPs na base de dados UniProt (acesso em 20-05-2019). 179	179
Figura 5. Intensidades dos peptídeos para identificação (QAAIQSGEYDR e NEYLLALS DR) e quantificação (QNIDVVAR) da MRJP 4, em amostras de (a) MMBp, (b) MMBc e (c) MF. Resultados expressos como média e coeficiente de variação ( $n = 3$ ) para cada amostra de mel. 183	183
Figura 6. Linearidade determinada para (a, b) o padrão interno na matriz, em branco e na amostra MMBp 3. 184	184
Figura 7. Curvas de linearidade para os peptídeos de quantificação das MRJPs em amostras de mel. 185	185
Figura 8. Gráficos de (a) quantidades testadas para recuperação e (b) recuperação e repetibilidade do PI (LLGFGINADENQR) nos diferentes tipos de amostras de mel. Resultados expressos como média e coeficiente de variação ( $n = 18$ ) para cada amostra de mel. 187	187
Figura 9. Quantificação de peptídeos de MRJP (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5 e (f) 7 em amostras de mel e comparação entre os diferentes grupos de mel. MMBp, mel de melato de bracinga puro, MMBc, mel de melato de bracinga comercial, MF, mel floral. *** $p < 0,0001$ , ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ , pelo teste de Tukey, intervalo de confiança de 95%. 188	188

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Compostos fenólicos encontrados em méis florais e de melato de diversas origens. ....	44
Tabela 2. Estudos sobre técnicas de preparo de amostras de mel de melato para determinação de compostos fenólicos. ....	48

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Origem geográfica e data de coleta das amostras de mel de melato de bracatinga. 69	
Tabela 2. Matriz do planejamento Simplex-Centroide para otimização de fase móvel. ....	71
Tabela 3. Matriz do DCCR para otimização de fluxo de fase móvel e temperatura da coluna. ....	72
Tabela 4. Parâmetros analíticos e suas variações aplicadas para avaliação da robustez do método cromatográfico. ....	77
Tabela 5. Delineamento experimental dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden. ....	78
Tabela 6. Série eluotrópica das propriedades de solventes utilizados em HPLC de fase reversa. ....	83
Tabela 7. Ordem de eluição de compostos fenólicos entre os dez sistemas do planejamento Simplex-Centroide. ....	85
Tabela 8. Resoluções de cada par de picos de compostos fenólicos para o planejamento Simplex-Centroide. ....	87
Tabela 9. Coeficientes significativos do modelo e resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão no planejamento Simplex-Centroide. ....	89
Tabela 10. Ordem de eluição de compostos fenólicos entre os dez sistemas do DCCR. ....	93
Tabela 11. Resoluções de cada par de picos de compostos fenólicos para o delineamento composto central rotacional. ....	95
Tabela 12. Coeficientes significativos do modelo e resumo da ANOVA, considerando a significância estatística da regressão e da falta de ajuste do delineamento composto central rotacional. ....	97
Tabela 13. Critérios da <i>desirability function</i> , variáveis e respostas ótimas preditas, e respostas observadas experimentalmente para as variáveis previstas. ....	101
Tabela 14. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico. ....	104
Tabela 15. Avaliação dos limites de detecção e quantificação, seletividade, efeito de matriz e precisão do método cromatográfico. ....	105
Tabela 16. Parâmetros da curva de calibração de cada composto fenólico. ....	108
Tabela 17. Valores médios de recuperação aparente de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga. ....	109
Tabela 18. Efeitos dos parâmetros analíticos na resolução entre os picos do método para quantificação de compostos fenólicos. ....	110
Tabela 19. Efeitos dos parâmetros analíticos na área dos picos do método para quantificação de compostos fenólicos. ....	111
Tabela 20. Efeitos dos parâmetros analíticos no fator de retenção dos picos do método para quantificação de compostos fenólicos. ....	112
Tabela 21. Compostos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de mel de melato de bracatinga. ....	114

### **CAPÍTULO III**

Tabela 1. Origem geográfica e data de coleta das amostras de mel de melato de bracatinga.	122
Tabela 2. Variáveis estudadas no método QuEChERS para extração dos compostos fenólicos. .....	123
Tabela 3. Valores de pH aparente dos sistemas avaliados para acidificação do solvente extrator usado na recuperação dos compostos fenólicos em uma amostra de mel de melato de bracatinga fortificada e valores de pKa dos analitos adicionados à amostra. ....	127
Tabela 4. Compostos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) presentes em amostras de mel de melato de bracatinga da região sul do Brasil. ....	135

### **CAPÍTULO IV**

Tabela 1. Origem geográfica e data de coleta das amostras de mel de melato de bracatinga.	146
Tabela 2. Compostos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de MMB. ....	149
Tabela 3. Efeito do MMB na redução dos níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. ....	154

### **CAPÍTULO V**

Tabela 1. Origem geográfica e botânica e data de coleta das amostras de mel estudadas. ....	169
Tabela 2. MRJPs encontradas em busca na base de dados <i>UniProt</i> . ....	176
Tabela 3. Identificação de proteínas em mel por LC-MS/MS não-direcionada e número correspondente de peptídeos. ....	178
Tabela 4. Peptídeos selecionados como marcadores de MMB e seus respectivas transições, tempos de retenção e energia de colisão otimizados. ....	181
Tabela 5. Avaliação da especificidade e dos limites de detecção e quantificação dos peptídeos de quantificação para as MRJPs. ....	186

## LISTA DE EQUAÇÕES

### CAPÍTULO I

Equação 1	$d_i = 0$ se $Y_i < Y_{i-inf}$ .....	58
Equação 2	$d_i = \frac{Y_i - Y_{i-inf}}{Y_{i-max} - Y_{i-inf}}$ se $Y_{i-inf} < Y_i < Y_{i-max}$ .....	58
Equação 3	$d_i = 1$ se $Y_i > Y_{i-inf}$ .....	58

### CAPÍTULO II

Equação 4	$R_S = \frac{2(Tr_2 - Tr_1)}{L_2 + L_1}$ .....	71
Equação 5	$d_i = 0$ se $R_i < R_{min}$ .....	73
Equação 6	$d_i = \frac{R_i - R_{min}}{R_{alvo} - R_{min}}$ se $R_{min} < R_i < R_{alvo}$ .....	73
Equação 7	$d_i = 1$ se $R_i > R_{alvo}$ .....	73
Equação 8	$d_i = 1$ se $t_i < t_{alvo}$ .....	73
Equação 9	$d_i = \frac{t_i - t_{max}}{t_{alvo} - t_{max}}$ se $t_{max} < t_i < t_{alvo}$ .....	73
Equação 10	$d_i = 0$ se $t_i > t_{max}$ .....	73
Equação 11	$k = \frac{Tr_c - Tr_s}{Tr_c}$ .....	74
Equação 12	$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$ .....	74
Equação 13	$FC = \frac{10^3 \times \left\{ \sum x \times y - \left( \frac{\sum x \times \sum y}{n} \right)^2 \right\}}{\left\{ \sum x^2 - \left( \frac{\sum x \times \sum x}{n} \right) \right\} \times \left\{ \sum y^2 - \left( \frac{\sum y \times \sum y}{n} \right) \right\}}$ .....	76
Equação 14	$\% Rec = \frac{c_1 - c_2}{c_3} \cdot 100$ .....	77
Equação 15	$P/p = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4}$ .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$	Fator de separação
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analistas
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local, do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
CCD	Delineamento composto central, do inglês <i>central composite design</i>
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos, do inglês <i>diode array detector</i>
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DDA	Aquisição dependente de dados, do inglês <i>Data Dependent Acquisition</i> .
DMEM	Meio de cultura, do inglês <i>Dulbecco modification of Minimum Essential Media</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid-phase extraction</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por electrospray, o inglês <i>electrospray ionization</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	Organização Internacional de Padronização
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K	Fator de retenção
LOD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>
LOQ	Limite de quantificação
LPS	Lipopolissacarídeo
MeOH	Metanol
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MRJP	Proteínas majoritárias de geleia real, do inglês <i>Major Royal Jelly Protein</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal Components Analysis</i>
pI	Ponto isoelétrico
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
Rs	Resolução
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poli(acrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPE	Extração em fase-sólida, do inglês <i>solid-phase extraction</i>

SRM Monitoramento de reação selecionada, do inglês *Selected Reaction Monitoring*

THF tetraidrofurano, do inglês *tetrahydrofurane*

TOF Tempo de voo, do inglês *time of flight*

UV-Vis Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
Objetivo geral .....	30
Objetivos específicos .....	30
<b>CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	31
1. Mel .....	32
2. <i>Mimosa scabrella</i> Bentham .....	33
3. Mel de melato .....	35
4. Propriedades bioativas dos méis .....	38
5. Compostos fenólicos .....	41
5.1 Compostos fenólicos em méis .....	44
5.2 Determinação de compostos fenólicos em mel .....	46
5.2.1 Método QuEChERS .....	50
6. Aplicação de ferramentas quimiométricas na ciência de alimentos .....	55
7. Autenticidade de mel .....	59
<b>CAPÍTULO II - 64QUIMIOMETRIA APLICADA À SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) POR HPLC-DAD</b> .....	64
<b>RESUMO</b> .....	65
<b>ABSTRACT</b> .....	66
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	67
2. <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	68
2.1 Reagentes e padrões .....	68
2.2 Preparo de soluções .....	69
2.3 Amostras .....	69
2.4 Instrumento e condições cromatográficas .....	70
2.5 Planejamento experimental Simplex-Centroide .....	70
2.6 Delineamento composto central rotacional (DCCR) .....	72
2.7 Otimização simultânea de múltiplas respostas .....	72
2.8 Extração de compostos fenólicos .....	74
2.9 Validação analítica .....	74
2.9.1 Conformidade do sistema .....	74
2.9.2 Limites de detecção e quantificação .....	75
2.9.3 Linearidade .....	75
2.9.4 Efeito de matriz .....	75
2.9.5 Seletividade .....	76

2.9.6 Precisão .....	76
2.9.7 Exatidão .....	76
2.9.8 Robustez.....	77
2.10 Análise estatística.....	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	79
3.1 Experimentos antecedentes ao planejamento experimental.....	79
3.2 Planejamento Simplex-Centroide .....	83
3.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) .....	92
3.4 Otimização de múltiplas respostas .....	99
3.5 Validação do método .....	104
3.6 Aplicação do método .....	113
4. CONCLUSÃO .....	116
<b>CAPÍTULO III - 117 QuEChERS APLICADO À EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM MÊIS DE MELATO DE BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)</b>	
.....	117
RESUMO .....	118
ABSTRACT .....	119
1. INTRODUÇÃO .....	120
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	121
2.1 Reagentes .....	121
2.2 Amostras .....	121
2.3 Método QuEChERS.....	122
2.4 Avaliação da eficácia do método proposto .....	123
2.5 Condições cromatográficas .....	124
2.6 Análise estatística.....	124
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	124
3.1 Extração de compostos fenólicos pelo método de QuEChERS .....	125
3.2 Etapa de <i>clean-up</i> dos extratos contendo compostos fenólicos .....	129
3.3 Aplicação do método de QuEChERS para extração de compostos fenólicos .....	134
4. CONCLUSÃO .....	139
<b>CAPÍTULO IV 141 - POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) FRENTE A MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR LPS</b>	
.....	141
RESUMO .....	142
ABSTRACT .....	143
1. INTRODUÇÃO .....	144
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	145
2.1 Reagentes .....	145



2.2 Amostras .....	145
2.3 Determinação de compostos fenólicos nas amostras de mel .....	146
2.4 Ensaio de viabilidade celular .....	146
2.5 Indução da inflamação em macrófagos por LPS .....	147
2.6 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos .....	147
2.7 Quantificação de citocinas em macrófagos .....	148
2.8 Análise estatística .....	148
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	148
3.1 Compostos fenólicos nas amostras de MMB .....	148
3.2 Efeito do MMB na viabilidade celular de macrófagos .....	150
3.3 Efeito do MMB nos níveis de óxido nítrico (NO) .....	153
3.4 Efeito do MMB nos níveis das citocinas .....	155
4. CONCLUSÃO .....	162
<b>CAPÍTULO V - 163 ANÁLISE PROTEÔMICA DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) USANDO PEPTÍDEOS MARCADORES E ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO .....</b>	<b>163</b>
RESUMO .....	164
ABSTRACT .....	165
1. INTRODUÇÃO .....	166
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	167
2.1 Reagentes e soluções padrão .....	167
2.2 Amostras .....	168
2.3 Estratégia de análise proteômica .....	169
2.4 Análise proteômica não-direcionada – identificação de proteínas .....	170
2.4.1 Eletroforese em gel .....	170
2.4.1.1 Extração de proteínas .....	170
2.4.1.2 SDS-PAGE .....	170
2.4.2 Análise não-direcionada de proteínas por espectrometria de massas .....	171
2.4.2.1 Extração e digestão de proteínas .....	171
2.4.2.2 Identificação de proteínas por LC-MS/MS .....	172
2.4.3 Seleção de peptídeos teóricos – digestão <i>in silico</i> .....	172
2.5 Análise proteômica direcionada – quantificação de proteínas .....	173
2.5.1 Quantificação dos peptídeos selecionados .....	173
2.5.2 Validação do método .....	174
2.6 Análise estatística .....	175
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	175
3.1 Identificação e seleção de proteínas e peptídeos .....	175
3.2 Otimização do método de quantificação de peptídeos .....	180

3.3 Validação do método .....	184
3.4 Quantificação relativa de peptídeos em mel .....	187
4. CONCLUSÃO .....	190
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	191
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	193
APÊNDICE A – Nomes, estruturas, classes químicas e pKa dos compostos fenólicos encontrados em mel de melato de bracatinga. ....	214
APÊNDICE B - Gráficos dos resíduos das respostas do delineamento composto central rotacional.....	216
APÊNDICE C – Parâmetros cromatográficos do método de separação de compostos fenólicos. ....	217
APÊNDICE D – Verificação da pureza espectral dos picos dos ácidos (a) clorogênico (DAD 325 nm), (a) <i>p</i> -cumárico (DAD 300 nm) e (a) benzóico (DAD 240 nm) em amostra de mel de melato de bracatinga. ....	218
APÊNDICE E - Resultados de normalidade, homocedasticidade e independência dos dados para a curva de calibração da solução padrão dos analitos. ....	219
APÊNDICE F - Proteínas totais em amostras de mel determinados pelo método de Lowry. ....	220
APÊNDICE G - Resultados <i>BLAST</i> e alinhamento para os peptídeos EALPHVPIFDR, TFVTIER e QNIDVVAR, candidatos a marcadores de quantificação das proteínas MRJP 1, 3 e 4, respectivamente, sendo específicos e presentes apenas nestas proteínas (acesso em: 24-07-2019). ....	221
ANEXO A – Publicações geradas a partir desta tese.....	224

## INTRODUÇÃO

A legislação brasileira reconhece duas classes de mel - o mel floral, produzido a partir do néctar de flores; e o mel de melato, produzido a partir de secreções de plantas ou excreções de insetos sugadores que ficam sobre as plantas (BRASIL, 2000). Em intervalos de dois anos, um fenômeno peculiar é percebido predominantemente em regiões de elevada altitude no Sul do Brasil. Esse fenômeno envolve a cochonilha (*Stigmacoccus paranaensis* Foldi), um inseto sugador de plantas que se alimenta do floema de árvores e libera um produto açucarado conhecido como melato. A bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) é uma das plantas utilizadas pelo inseto e o intervalo de dois anos corresponde ao ciclo de vida da cochonilha (MAZUCHOWSKI et al., 2014). Entre os meses de janeiro a junho, essas excreções são recolhidas pelas abelhas *Apis mellifera* e usadas como matéria-prima para produzir o mel de melato de bracatinga, um mel de cor escura e características sensoriais únicas quando comparado ao mel floral, exportado em quase sua totalidade de produção para o mercado europeu, mas com crescimento de sua valorização no mercado interno (MARENDA et al., 2011; MAZUCHOWSKI et al., 2014).

Méis têm sido reportados por diversas atividades biológicas benéficas, como antioxidante (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; SERAGLIO et al., 2017), antibacteriana (MAJTAN et al., 2011; OSÉS et al., 2016) e principalmente anti-inflamatória (KASSIM et al., 2010a; MAJTAN et al., 2013a; MAYER et al., 2014; NOOH; NOUR-ELDIEN, 2016). Os compostos fenólicos são amplamente investigados como as substâncias responsáveis pelos efeitos benéficos (FINIMUNDY et al., 2018; PETROPOULOS et al., 2018; PIRES et al., 2018a; RACHED et al., 2018; SOBRAL et al., 2017; SVOBODOVA et al., 2017; VILLAVICENCIO et al., 2018) atribuídos ao mel. Os méis florais são os mais estudados (CAN et al., 2015; ESCRICHE et al., 2014), mas ainda são poucos os trabalhos que consideraram méis de melato (SERAGLIO et al., 2016), e essa carência demonstra a necessidade de investigação destes compostos e seus benefícios nestas matrizes.

Dentre as atividades biológicas, a atuação dos compostos fenólicos é sugerida como estratégia para mitigação de doenças inflamatórias crônicas (COSCO et al., 2016; HAM et al., 2016; KHAJEVAND-KHAZAEI et al., 2018), cuja incidência tem aumentado de forma relevante, se tornando um desafio nos dias atuais. Estudos abordando o potencial anti-inflamatório em méis de melato são escassos (MAYER et al., 2014; VLCEKOVA et al., 2012) e em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) apenas o potencial antioxidante já foi estudado (SERAGLIO et al., 2016, 2017).

O Grupo de Pesquisa em Antioxidantes Naturais do Laboratório de Química de Alimentos da UFSC é pioneiro no desenvolvimento de estudos relacionados ao mel de melato de bracinga, incluindo sua caracterização físico-química (BERGAMO et al., 2018b), atividade antioxidante e bioacessibilidade de compostos bioativos (SERAGLIO et al., 2017), perfil de ácidos orgânicos (BRUGNEROTTO et al., 2019), perfil de compostos fenólicos (SERAGLIO et al., 2016; SILVA et al., 2019a, 2019b) e aminoácidos (AZEVEDO et al., 2017a). Alguns estudos iniciais buscando a autenticidade do mel de melato de bracinga também já foram conduzidos, como a diferenciação com relação a méis florais por seu perfil de minerais (BERGAMO et al., 2018a), parâmetros de cor (BERGAMO et al., 2019), e a discriminação geográfica usando o perfil eletroforético de proteínas (AZEVEDO et al., 2017b). Estes estudos ainda necessitam continuidade e além da inexistência de estudos relacionados ao potencial anti-inflamatório deste mel, a continuação dos estudos sobre marcadores de autenticidade é essencial e pode propiciar o aprofundamento do conhecimento a respeito do mel de melato de bracinga.

A adulteração de méis é uma prática comum, mas para méis de melato pode representar um problema ainda maior considerando o preço mais elevado em comparação aos méis florais (BERGAMO et al., 2018a; VASIĆ et al., 2019). Diversas estratégias tem sido frequentemente utilizadas para determinar a origem botânica de méis, como a identificação de alguns compostos como minerais e fenólicos, a determinação de parâmetros físico-químicos, além do uso de espectroscopia (ALIAÑO-GONZÁLEZ et al., 2019; BERGAMO et al., 2018a; KARABAGIAS et al., 2014; KASPRZYK et al., 2018; LATORRE et al., 2013; ZUCCATO et al., 2017), entretanto, abordagens de identificação de peptídeos marcadores, por exemplo, são importantes, tendo em vista a ausência de dados proteômicos para méis.

O desenvolvimento de estratégias ou métodos de avaliação da autenticidade do mel de melato de bracinga é uma necessidade latente para a determinação de marcadores específicos de origem botânica para este produto. Isto pode proporcionar uma melhor colocação do produto no mercado interno e externo, além de garantir sua qualidade para o consumo. Ainda, a determinação de compostos relevantes para confirmar a autenticidade do mel de melato de bracinga pode futuramente impulsionar pesquisas que revelem relações interessantes entre o seu consumo e possíveis efeitos benéficos *in vivo* e *in vitro* (CASTRO-PUYANA; HERRERO, 2013) com a descoberta de compostos bioativos antes não conhecidos. Finalmente, a publicação de resultados das pesquisas em diferentes seguimentos envolvendo o mel de melato de bracinga – e outros méis de melato – contribui com a maior valorização comercial, cultural e

científica do produto, o que auxilia no estabelecimento de legislações nacionais e internacionais para méis de melato.

Neste contexto, esta tese está estruturada nos seguintes capítulos:

*Capítulo I:* apresenta uma revisão bibliográfica sobre os principais tópicos abordados neste trabalho;

*Capítulo II:* aborda o desenvolvimento e validação de um método para determinação de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga por cromatografia líquida de alta eficiência;

*Capítulo III:* contempla o desenvolvimento de um método de preparo de amostras para determinação de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga;

*Capítulo IV:* trata da avaliação da atividade anti-inflamatória de mel de melato de bracatinga frente a mediadores produzidos por células RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS);

*Capítulo V:* apresenta o desenvolvimento de uma abordagem de análise proteômica para caracterização de peptídeos marcadores de autenticidade de mel de melato de bracatinga.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Caracterizar méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) quanto ao teor fenólico, por meio da otimização e validação de métodos de identificação; potencial anti-inflamatório; e autenticidade, por meio da determinação de marcadores proteômicos.

### Objetivos específicos

- Otimizar um método por HPLC-DAD empregando planejamento Simplex-centroide, seguido de delineamento composto central rotacional com a *desirability function* (função de desejabilidade) para a separação simultânea de dezoito compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga;

- Validar o método cromatográfico quanto aos parâmetros de conformidade do sistema, linearidade, limites de detecção e quantificação, seletividade, efeito de matriz, precisão, exatidão e robustez, de acordo com critérios de validação recomendados pela Eurachem;

- Desenvolver um procedimento de extração baseado no método QuEChERS aplicado a compostos fenólicos presentes em amostras de mel de melato de bracatinga;

- Avaliar o potencial do mel de melato de bracatinga frente à modulação dos mediadores inflamatórios óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$  e IL-10 em células RAW 264.7 estimuladas por LPS e sua relação com a composição fenólica;

- Identificar o perfil de proteínas presentes em amostras de mel de melato de bracatinga por LC-ESI-Triple-TOF-MS/MS;

- Desenvolver um método utilizando o modo SRM (*selected reaction monitoring*) para quantificação relativa direcionada de peptídeos marcadores de mel de melato de bracatinga por LC-ESI-QqQ-MS/MS.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Parte das informações deste capítulo foram publicadas em:

SERAGLIO, S. K. T.; SILVA, B.; BERGAMO, G.; BRUGNEROTTO, P.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. **Food Research International**, v. 119, p. 44–66, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.028>

BRUGNEROTTO, P.; SERAGLIO, S. K. T.; SILVA, B.; SCHULZ, M.; BERGAMO, G.; BILUCA, F. C.; SANTOS, A. C.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Características físico-químicas e composição química de mel de melato de bracatinga: uma revisão. In: Oliveira Júnior, J. M. B.; Calvão, L. B. **A Arte de criar Abelhas**. 1ª ed.: Atena Editora, 2019, v p. 25-35.

## 1. Mel

O mel é considerado uma mistura complexa, constituída por açúcares, majoritariamente glicose e frutose e outros componentes minoritários como água, proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, compostos voláteis (BERGAMO et al., 2018a, 2018b; FECHNER et al., 2016; KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2020) e compostos fenólicos (NASCIMENTO et al., 2018; OROIAN; ROPCIUC, 2017). Durante a elaboração do mel, além da influência da origem botânica, fatores abióticos como clima, floração, solo, presença de insetos sugadores, práticas apícolas (PITA-CALVO; VÁZQUEZ, 2017), outros fatores podem interferir em sua composição.

A ação das abelhas e de outros insetos sugadores de seiva tem grande importância nas características do mel. A procura por alimento é a principal motivação desses insetos e, portanto, o tipo de flora presente próxima ao apiário pode ser fator decisivo na alimentação das abelhas e conseqüentemente na elaboração do produto final (CAMPOS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2016). As abelhas são responsáveis pela polinização, atividade de grande importância na reprodução das plantas. Com a escassez de insetos polinizadores, justificada principalmente pela intensificação da produção agrícola e uso de pesticidas (OLIVEIRA et al., 2016), a *Apis mellifera* passou a ser o principal agente polinizador tanto de espécies florais quanto arbóreas devido principalmente à sua ampla dispersão geográfica (SEZERINO; ORTH, 2015) e frequente busca por alimento, utilizando o néctar ou o exsudato de insetos sugadores de seiva de plantas (CAMPOS et al., 2003).

Uma mesma planta pode ter potencial apícola diferente em função da região de cultivo (SALOMÉ, 2014). Em períodos de escassez de néctar, as abelhas podem se alimentar de outras substâncias adocicadas, como as provenientes de alimentação artificial, a secreção de cana de açúcar ou excreção de insetos (MAZUCHOWSKI et al., 2014). Alguns exemplos de plantas que ofertam recursos melíferos a partir de estruturas extraflorais são o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), ingá (*Inga* spp.), entre outras (SANTOS; GONÇALVES; CEREDA, 2015).

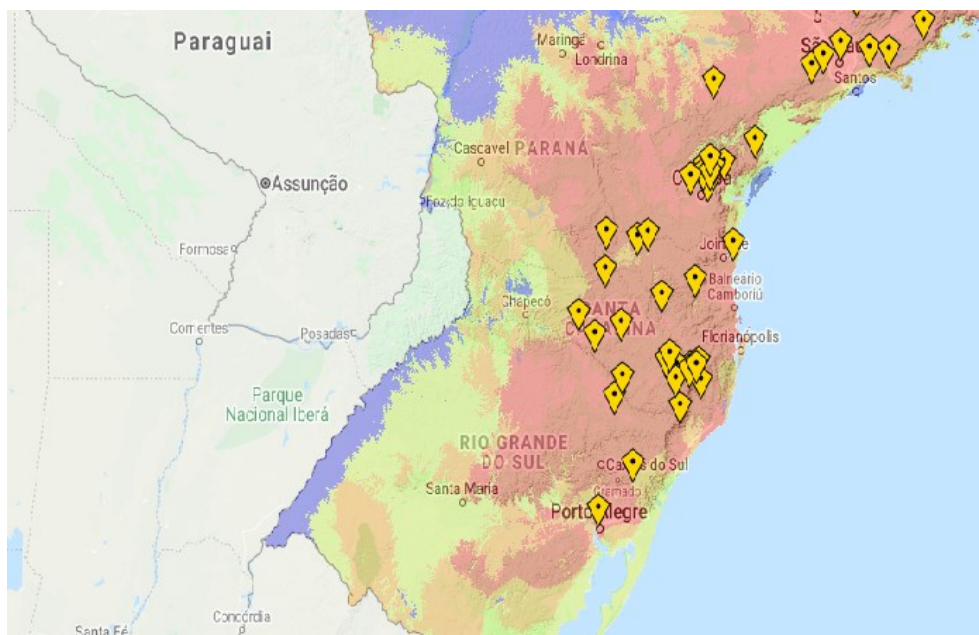
Um número reduzido de espécies em floração, principalmente no outono, não representa necessariamente escassez de alimentos para as abelhas. Exemplo disso é a excreção de melato no caule da *Mimosa scabrella* Bentham, em anos pares, em alguns municípios da região Sul do Brasil (MAZUCHOWSKI et al., 2014). A *Mimosa scabrella* Bentham foi incluída no calendário floral, devido à excreção de melato ao longo dos troncos e galhos que também é recolhido por *Apis mellifera* além do néctar e pólen das suas flores (SALOMÉ, 2014).



## 2. *Mimosa scabrella* Bentham

Popularmente conhecida como bracatinga (MAZUCHOWSKI; (RECH; TORESAN, 2014), a *Mimosa scabrella* Benth. é uma árvore leguminosa de crescimento rápido (PRIMIERY et al., 2016) pertencente à família Fabaceae (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014), subfamília Mimosoideae (CARON et al., 2013) comum em submatas de pinhais na região Sul do Brasil, ocorrendo principalmente do norte do Rio Grande do Sul até o sul do Paraná, em altitudes de 700 a 2000 metros (SOMARRIBA; KASS, 2001) conforme apresentado na Figura 1, onde forma densos povoamentos, conhecidos como bracatingais (SILVA et al., 2016a).

**Figura 1.** Mapa de ocorrência de *Mimosa scabrella* Bentham.



Fonte: Lima (2014).

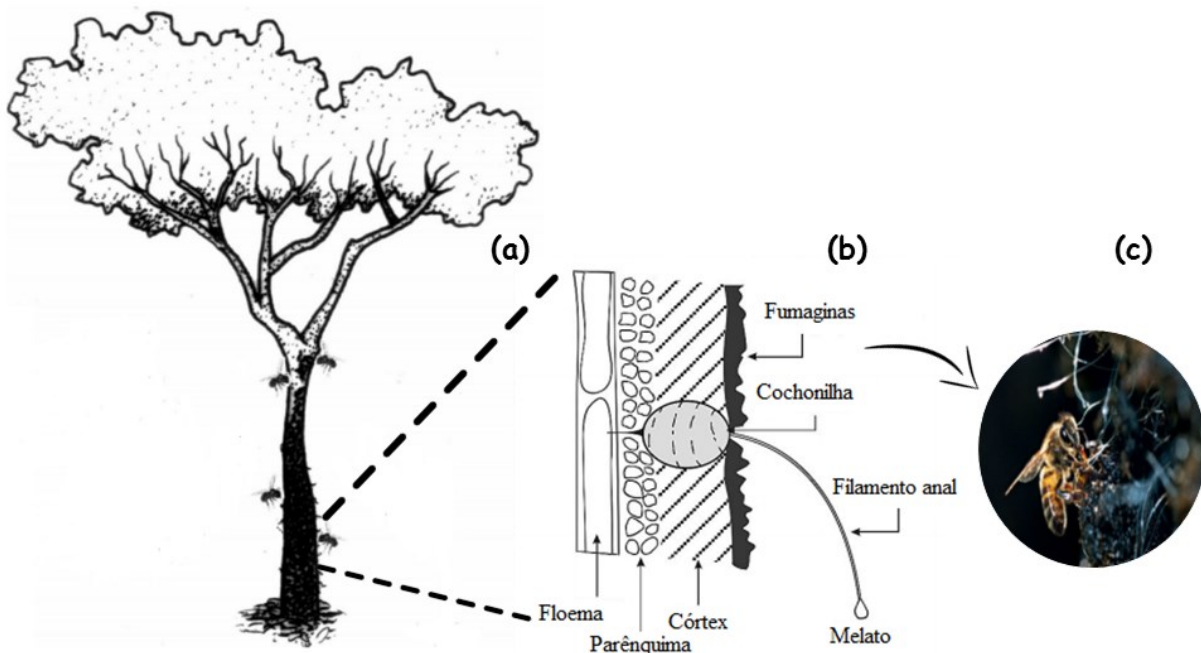
A maior área de ocorrência natural dessa espécie se dá sob clima temperado, entretanto, também ocorre em clima subtropical úmido e subtropical de altitude, ocorrendo de forma natural também nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, e São Paulo, compreendendo latitude de 23° S (Minas Gerais) a 29° S (Rio Grande do Sul); embora a produção de mel de melato seja restrita a região Sul (MAZUCHOWSKI et al., 2014). A bracatinga não suporta períodos de seca prolongados e se desenvolve bem em temperaturas amenas (13 a 21 °C) (MAZUCHOWSKI et al., 2014; SOMARRIBA; KASS, 2001).

Na região Sul, poucas espécies florescem no inverno, portanto a presença da bracatinga contribui com a alimentação das colônias de abelha, fornecendo néctar e pólen neste

período. Em Santa Catarina, o florescimento ocorre de julho a setembro (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014) quando as abelhas produzem mel a partir do néctar de bracatinga. Este apresenta sabor forte e é pouco apreciado pelos consumidores. Além dos recursos florais, a bracatinga apresenta tronco e galhos associados a insetos excretadores de melato. Aparentemente a associação entre abelhas e a bracatinga também é fruto da ação destes insetos sugadores de seiva, como a cochonilha, que excreta um líquido açucarado atraindo as abelhas (SALOMÉ, 2014).

A Figura 2, apresenta uma ilustração que demonstra a interação entre cochonilha, bracatinga e abelha.

**Figura 2.** Representação da interação entre (a) bracatinga (b) cochonilha e (c) abelha.



Fonte: Adaptado de Chamorro; Nates-Parra; Kondo, 2013 e Reis; Três; Siminski, 2006.

A cochonilha é um inseto pertencente ao gênero *Stigmacoccus* spp. da família Stigmacoccidae (WOLFF; WITTER; LISBOA, 2015), que ocorre em ciclo bianual (MAZUCHOWSKI et al., 2014). Estes insetos se alimentam da bracatinga e também de outras árvores, como o ingá, sugando a seiva elaborada do floema, excretando o líquido açucarado que se deposita sobre o tronco, galhos e folhas, o qual é coletado por abelhas *Apis mellifera* (MAZUCHOWSKI et al., 2014; WOLFF; WITTER; LISBOA, 2015); embora nem todas as árvores forneçam quantidade suficiente de seiva para a produção de mel de melato (WOLFF; WITTER; LISBOA, 2015).

A maior ocorrência de infestação de cochonilhas nas árvores, além de ser percebida em ciclos bianuais, ocorre normalmente entre os meses de janeiro e maio (MAZUCHOWSKI et al., 2014). As cochonilhas em fase adulta são sedentárias, possuindo carapaças de cera enegrecida que são fixas sobre o caule da bracatinga (Figura 2b) (WOLFF; WITTER; LISBOA, 2015). O escurecimento do caule da bracatinga e conseqüentemente da carapaça da cochonilha se dá devido à presença de fumagina, uma doença associada ao crescimento de fungos do gênero *Cladosporium* que utilizam o melato para obtenção de nutrientes, o que possivelmente deve ser o principal indicativo da presença de alimento para os insetos visitantes (CHAMORRO; NATES-PARRA; KONDO, 2013; REIS; TRÊS; SIMINSKI, 2006).

A presença isolada das secreções de *Stigmacoccus paranaensis* F. propicia para as abelhas a capacidade de armazenar grandes quantidades de mel a partir de uma única planta e fora do período dos picos de floração, favorecendo a produção de mel de melato (MAZUCHOWSKI et al., 2014; SALOMÉ, 2014).

### **3. Mel de melato**

Em Santa Catarina, os bracatingais localizados em regiões do Planalto Sul e Vale do Itajaí são os responsáveis pela maior parte da produção de mel de melato, que, mesmo restrito a safras bianuais, apresenta maior produtividade comparado ao mel floral (MAZUCHOWSKI et al., 2014). Embora o mel de melato ainda não possua um mercado atrativo no Brasil, devido às suas características sensoriais, principalmente a cor mais escura, o mesmo é bem aceito em países europeus (MARENDA et al., 2011; MAZUCHOWSKI et al., 2014). O melato sofre ação enzimática pelas cochonilhas e pelas abelhas, o que proporciona características notavelmente diferentes em relação ao mel de origem floral (MAZUCHOWSKI et al., 2014). A Figura 3 apresenta um esquema que sintetiza a produção do mel de melato a partir da bracatinga.

**Figura 3.** Representação esquemática da produção de mel de melato a partir de bracatinga.



Fonte: o próprio autor (2019).

O mel de melato de bracatinga possui menor teor de glicose e frutose (BERGAMO et al., 2018b) e maior concentração de elementos minerais e compostos fenólicos (BERGAMO et al., 2018a; SILVA et al., 2019a) quando comparado aos méis florais. Açúcares são os constituintes majoritários, e as menores concentrações de frutose e glicose no mel de melato de bracatinga impedem sua cristalização (SERAGLIO et al., 2019). Em estudo publicado por Bergamo et al. (2018b) foi encontrada concentração média de  $60 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  para a soma dos monossacarídeos glicose e frutose em amostras de mel de melato de bracatinga, e de  $71 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  para as amostras de méis florais avaliadas. Escuredo et al. (2013) encontraram maior teor de melezitose em mel de melato de carvalho em comparação com méis florais de diferentes fontes, e Manzanares et al. (2011) reportaram o oposto para méis de melato e florais de origens desconhecidas. Além disso, estes autores também relataram a presença de isomaltose e trealose em maiores quantidades para os méis de melato avaliados. Hijaz; Lu; Killiny (2016) avaliaram o de mel de melato de abacaxizeiro e encontraram na composição de açúcares aproximadamente 15% de monossacarídeos, com predominância para glicose e frutose (99%), 78% dissacarídeos (dos quais, 56% sacarose) e 0,5% de trissacarídeos. Conforme comumente observado, em amostras de mel floral avaliadas por Anjos et al. (2015), foi reportada a presença de 18 a 31% de glicose

e 26 a 45% de frutose, teores superiores aos encontrados em méis de melato. É importante salientar que a composição de carboidratos varia em função da origem geográfica e botânica dos méis de melato (BERGAMO et al., 2018b).

Dentre os constituintes minoritários presentes em méis de melato, destacam-se os minerais, que representam aproximadamente 0,2% da composição total de méis escuros como o de melato (BERGAMO et al., 2018a), sendo que o mel de melato de bracinga contém elevadas concentrações de potássio, cálcio, sódio, manganês e magnésio quando comparados a méis florais (BERGAMO et al., 2018a). As proteínas foram encontradas na faixa de 0,2 a 1,6% (WON et al., 2008) e Escuredo et al. (2013) encontraram aproximadamente 1 % de proteína em mel de melato (de origem desconhecida). Alguns aminoácidos, representam aproximadamente 1% de sua composição (AZEVEDO et al., 2017a) juntamente com as enzimas (MENDES et al., 2009). Estas estão presentes nas plantas e nos insetos, tais como invertase, diastase, glicose oxidase, catalase e fosfatase (SILVA et al., 2016b) e desempenham papel fundamental na produção do mel, promovendo a conversão do melato no produto final, com destaque para a invertase, presente nas glândulas hipofaríngeas das abelhas, enzima que converte a sacarose (SAJID et al., 2020) e a diastase, que hidrolisa o amido (SAK-BOSNAR; SAKAČ, 2012). A última é utilizada como parâmetro para avaliar a qualidade do mel, uma vez que sua ausência pode indicar tratamento térmico em temperaturas elevadas ou condições de armazenamento inadequadas ou mesmo por longos períodos (PASIAS; KIRIAKOU; PROESTOS, 2017). Os ácidos orgânicos presentes em méis, mesmo que em baixas concentrações, são responsáveis por sua acidez livre, e estão fortemente relacionados à origem botânica (AN et al., 2020). O ácido glucônico é predominante, tanto em méis florais quanto de melato (BRUGNEROTTO et al., 2019). Este ácido é proveniente da ação da enzima glicose oxidase, no entanto, os ácidos acético, benzóico, cítrico, láctico, succínico, entre outros também foram encontrados em maiores concentrações em mel de melato de bracinga quando comparados aos méis florais (BRUGNEROTTO et al., 2019). Ainda em relação aos compostos minoritários, os méis, especialmente de melato contém vitaminas do complexo B, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido pantotênico, biotina, ácido fólico e niacina (BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2013; CEBRERO et al., 2020; CIULU et al., 2011) além de vitaminas A e C, já encontradas por exemplo em méis de melato de melão e de azinheira (KARABAGIAS et al., 2020; LAUR; TIAN, 2011). Outros compostos minoritários relevantes são os voláteis, sendo que substâncias pertencentes à classe de terpenos foram encontradas em méis de melato (GERHARDT et al., 2018; JÁNOŠKOVÁ; VYVIURSKA; ŠPÁNIK, 2014). Embora os compostos fenólicos façam parte dos constituintes minoritários, ainda assim são a classe de substâncias mais estudada em

méis, principalmente devido às suas propriedades bioativas e por serem considerados marcadores florais (DIAS et al., 2016; SILVA et al., 2019a). Os compostos fenólicos já foram destacados por sua presença em maior concentração nos méis de melato, quando comparados aos méis florais (CAN et al., 2015; ESCRICHE et al., 2014; HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016), no entanto, poucos estudos contemplam a avaliação do perfil dessas substâncias em méis de melato (FLORES; ESCUREDO; SEIJO, 2015; VASIĆ et al., 2019), principalmente no mel de bracinga (SERAGLIO et al., 2016; SILVA et al., 2019b) com foco em sua potencial bioatividade.

Compostos fenólicos já encontrados em méis de diferentes origens botânicas são amplamente investigados por suas propriedades benéficas a saúde humana, incluindo antioxidante e antibacteriana (FINIMUNDY et al., 2018; RACHED et al., 2018). A ação de compostos fenólicos como agentes anti-inflamatórios é bem conhecida (DUARTE et al., 2017; FAN et al., 2017; KHAJEVAND-KHAZAEI et al., 2018), e sua vasta ocorrência em matrizes alimentares, evidenciando neste trabalho os méis de melato, justifica o interesse no estudo de suas propriedades bioativas.

#### **4. Propriedades bioativas dos méis**

Diversos estudos publicados demonstraram que méis de melato apresentam potencial bioativo superior quando comparados aos méis florais (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; BUENO-COSTA et al., 2016; NI et al., 2016; SIMOVA et al., 2012), e isso se deve principalmente pela determinação da bioatividade – comprovada por ensaios de atividades antioxidante e antimicrobiana – avaliada em ambos os méis (CAN et al., 2015; ESCRICHE et al., 2014; NOOH; NOUR-ELDIEN, 2016; OSÉS et al., 2016).

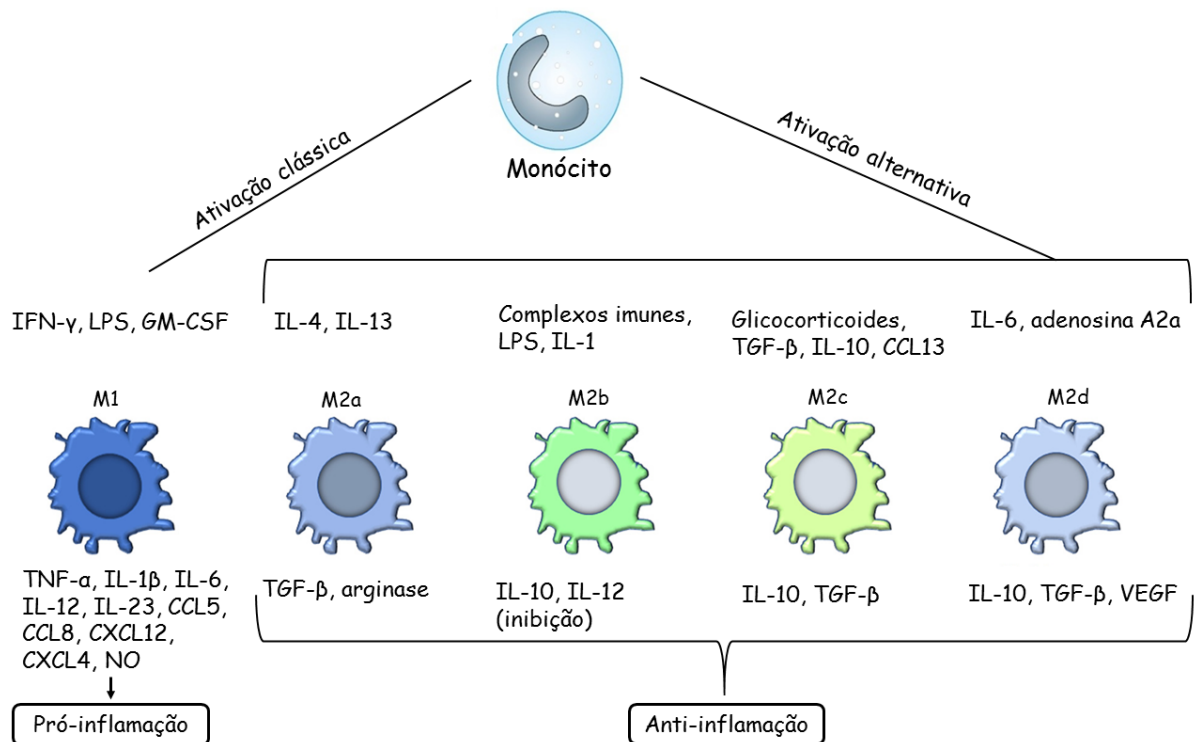
Dentre as atividades biológicas atribuídas aos méis, a atividade anti-inflamatória também é bem explorada (AFRIN et al., 2018; GASPARRINI et al., 2018; JULL et al., 2015; MAJTAN et al., 2013b; MAYER et al., 2014). A inflamação é definida como a resposta do tecido a um agente agressor, podendo ser este um trauma ou agentes patogênicos, resultando na eliminação de estímulos prejudiciais, tais como micro-organismos e células danificadas; e na reparação do tecido (FROST-MEYER; LOGOMARSINO, 2012; HADAGALI; CHUA, 2014).

A inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica, sendo que a inflamação aguda é a resposta inicial do corpo aos estímulos nocivos, e seus sintomas são dor, calor, vermelhidão, inchaço e alteração das funções de algum órgão ou tecido. Quando não tratada, se prolonga por dias, condição que a torna uma inflamação crônica, o que provoca uma mudança progressiva

no tipo de células presentes na área de inflamação e é reconhecida pela destruição simultânea e cicatrização do tecido a partir do processo inflamatório. A inflamação crônica pode desencadear outras respostas do organismo, como febre, e até mesmo ocasionar determinadas doenças, como aterosclerose, artrite reumatoide; e, em alguns casos extremos, o surgimento de células cancerígenas, visto que a destruição contínua do tecido compromete a sobrevivência do órgão (HADAGALI; CHUA, 2014; MENKE et al., 2007; NETEA et al., 2017).

Em nível celular, os compostos fenólicos têm sido frequentemente associados à modulação da inflamação em macrófagos (REBOLLO-HERNANZ et al., 2019; WANG et al., 2019c). Os macrófagos são células do sistema imunológico, cujos precursores são os monócitos, envolvidos em diversas funções que lhes permitem gerar respostas inatas e adaptativas. A Figura 4 representa um esquema com os principais ativadores de cada grupo de macrófagos e as principais respostas (mediadores pró ou anti-inflamatórios) produzidas.

**Figura 4.** Representação esquemática da classificação dos macrófagos.



INF- $\gamma$ , interferon gama; LPS, lipopolissacarídeo; GM-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; IL, interleucina; TGF- $\beta$ , fator transformante de colônias beta; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; CCL, quimiocina CC; CXCL, quimiocina CXC; NO, óxido nítrico; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular.

Fonte: adaptado de Di Benedetto et al. (2019).

Essas células possuem capacidade fagocítica, estando envolvidos na eliminação de organismos e partículas estranhas ao organismo. Além disso, outra função dos macrófagos é a imunomodulação devido a liberação de citocinas (pequenas proteínas que promovem a comunicação celular) e fatores de crescimento (CHAN; VISWANATHAN, 2019). Os macrófagos podem ser classificados em dois grupos principais: macrófagos ativados por via clássica (M1), que geram respostas pró-inflamatórias, e macrófagos ativados por via alternativa (M2), que controlam a regulação imune e a remodelação tecidual, ou seja, geram resposta anti-inflamatória (DI BENEDETTO et al., 2019).

Algumas das citocinas representadas neste esquema serão abordadas neste estudo, usando macrófagos estimulados pela endotoxina LPS (lipopolissacarídeo). O LPS está presente na parede celular de bactérias gram-negativas e é considerado um dos mais potentes iniciadores da inflamação (ZHANG; TSAO, 2016), induzindo a liberação de um grande número de citocinas inflamatórias pela célula, que desempenham um papel importante no processo metabólico. Contudo a produção e secreção excessiva destas citocinas pelos macrófagos pode ter consequências negativas como danos graves nos tecidos e disfunção de múltiplos órgãos (GASPARRINI et al., 2017)

A ação de extratos aquosos de mel de melato na regulação da inflamação foi avaliada *in vitro* por Majtan, Bohova, Garcia-Villalba, et al. (2013), usando queratinócitos humanos. O mel de melato atenuou a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) nas células e o efeito principal foi atribuído aos flavonoides campferol (775  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e apigenina (167  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). A avaliação do potencial anti-inflamatório em macrófagos ainda não foi relatada para méis de melato, mas estudos desta ordem foram conduzidos por Gasparrini et al. (2018) e Afrin et al. (2018), que avaliaram o potencial anti-inflamatório do mel de Manuka frente a mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos estimulados por LPS.

Como explorado anteriormente, os compostos fenólicos estão fortemente associados à modulação de processos inflamatórios, e estão presentes no mel de melato de bracatinga (SERAGLIO et al., 2016; SILVA et al., 2019a). Além disso, as propriedades bioativas apresentadas pelo mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) (SERAGLIO et al., 2017), expõem a necessidade de estudos aprofundados a fim de avaliar as propriedades anti-inflamatórias deste mel, até o presente momento não exploradas. O acompanhamento do perfil de compostos fenólicos ao longo de diferentes safras, a fim de criar um banco de dados científicos relacionados ao mel de melato de bracatinga ao longo dos anos, amplia as informações de bioatividade desse produto.

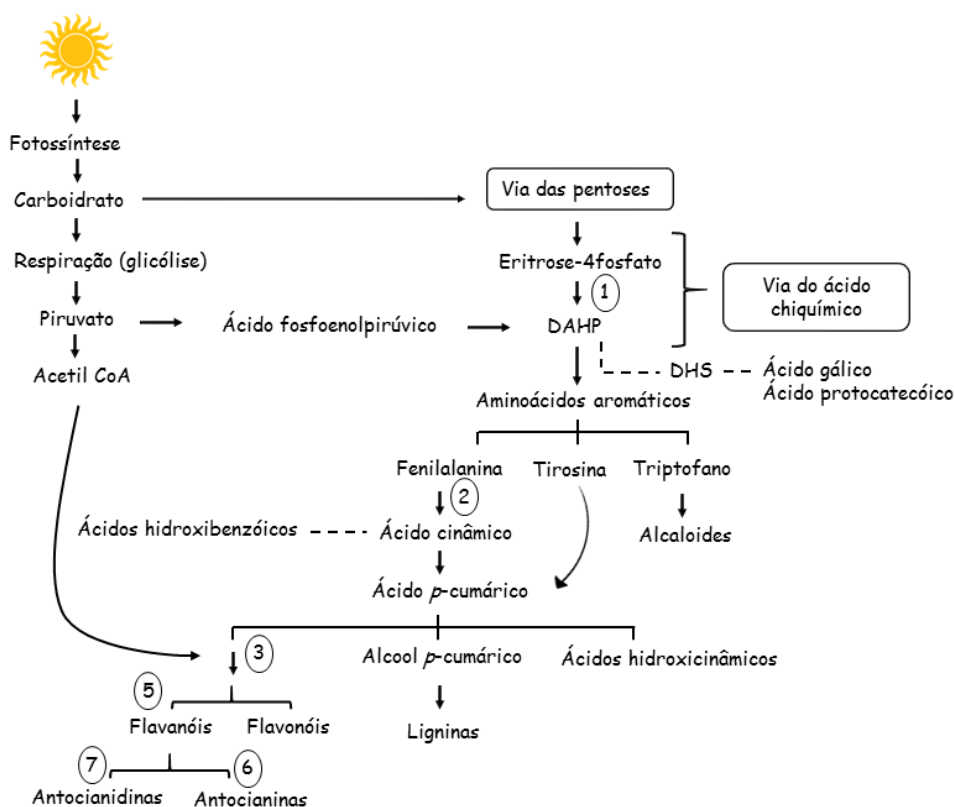


## 5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, de ocorrência natural em plantas, usualmente produzidos como mecanismo de defesa das plantas ou em resposta ao estresse proporcionado pelo meio ambiente (QUIDEAU et al., 2011). Estes compostos não estão diretamente relacionados com as funções de crescimento e desenvolvimento da planta, e são comumente encontrados em determinados tecidos e órgãos e em fases de diferenciação (DIAS et al., 2016). Os compostos fenólicos possuem um caráter heterogêneo e quimicamente são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, variando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou complexadas a açúcares ou proteínas e são reconhecidos pela atividade biológica, objeto de diversos estudos publicados na literatura (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014; YEO; SHAHIDI, 2017).

A seguir, na Figura 5 é apresentada de forma esquemática a via de biossíntese dos compostos fenólicos.

**Figura 5.** Representação da rota de biossíntese de algumas classes de compostos fenólicos.



Legenda - DAHP; 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato; DHS; 3-desidroquinato.

Enzimas envolvidas na biossíntese: 1, DAHP sintase; 2, PAL (fenilalanina amônia liase); 3, Chalcona sintase, chalcona isomerase e flavanona 3-hidroxilase; 4, flavonol sintase; 5, leucoantocianidina redutase; 6, leucoantocianidina dioxigenase; 7, antocianidina sintase.

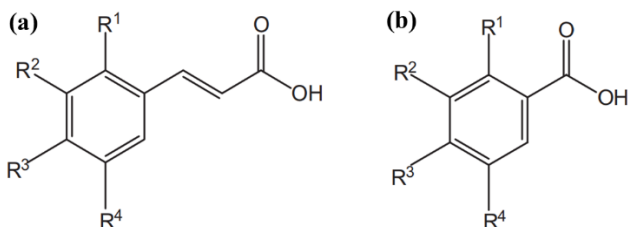
Fonte: adaptado de Dias et al. (2016) e Heleno et al. (2015).

A via do ácido chiquímico compreende a combinação de uma molécula de ácido fosfoenolpirúvico derivada da glicólise e uma molécula de eritrose-4-fosfato derivada da via das pentoses, com a formação de um açúcar de sete carbonos que é ciclizado e reduzido para formar chiquimato (DIAS et al., 2016). A partir da estrutura fenólica mais simples são sintetizados os ácidos fenólicos, que possuem um grupo carboxílico em uma posição do anel aromático e que servem como precursores de outros fenóis mais complexos (CHEN et al., 2015). Embora pouco solúveis ou biodisponíveis, estes compostos podem apresentar efeitos benéficos à saúde a longo prazo, quando consumidos regularmente (KUMAR; GOEL, 2019).

Dentre as principais classes de compostos fenólicos estão os flavonoides e os ácidos fenólicos e seus derivados. Estes estão incluídos entre os antioxidantes fenólicos de fonte natural mais encontrados e frequentemente é observada a presença destes em méis, sendo que um dos seus potenciais efeitos benéficos se dá pela sua capacidade de sequestrar radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio (KUMAR; GOEL, 2019), o que demonstra sua capacidade antioxidante.

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais: (i) ácidos hidroxibenzóicos; e (ii) ácidos hidroxicinâmicos – conforme demonstrado na Figura 6 - os quais são derivados de moléculas de ácidos benzoico e cinâmico, respectivamente.

**Figura 6.** Estrutura química comum aos ácidos fenólicos derivados (a) do ácido cinâmico e (b) do ácido benzóico.



Fonte: adaptado de Heleno et al. (2015).

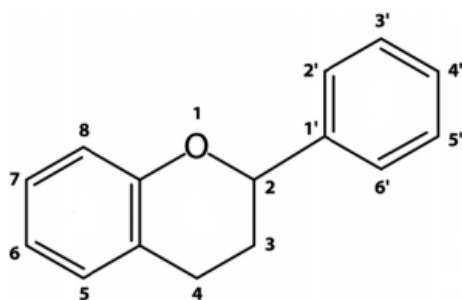
Quimicamente, estes compostos têm pelo menos um anel aromático, em que pelo menos um hidrogênio está substituído por uma hidroxila (HELENO et al., 2015). Além disso, podem

estar nas formas solúveis livres, solúveis conjugados e insolúveis. As formas livres se encontram presentes dentro dos vacúolos de células vegetais, enquanto as conjugadas são ligadas a açúcares ou outro componente de baixa massa molar; e as formas insolúveis são ligadas de forma covalente a componentes estruturais de parede celular, tais como celulose, hemicelulose, lignina e pectina (WANG et al., 2015).

A classificação dos flavonoides é complexa, uma vez que compostos como chalconas, flavanonas, entre outros, participam de etapas intermediárias na rota de síntese e também estão presentes entre os produtos finais da mesma. Os flavonoides são formados a partir das chalconas, e dependendo das modificações no carbono aromático, podem ser separados em flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, antocianinas, e proantocianidinas (PANDEY et al., 2016; SELEEM; PARDI; MURATA, 2017). A glicosilação desses compostos determina a complexidade química e promove alterações estruturais e biológicas na molécula (PANDEY et al., 2016).

A partir de uma molécula de ATP e uma molécula de coenzima A (CoA), a enzima 4-coumaroil-CoA-ligase converte o ácido *p*-cumárico em cumariol-CoA (Figura 5, um dos precursores do esqueleto C6-C3-C6 de flavonoides de diferentes classes, apresentado na Figura 7. Outro precursor é o malonil-CoA, produzido principalmente a partir do acetil-CoA (Figura 5) pela ação irreversível da enzima acetil-CoA carboxilase (NABAVI et al., 2020).

**Figura 7.** Estrutura química comum aos flavonoides.



Fonte: adaptado de Chanput; Krueyos; Ritthiruangdej (2016).

O perfil de compostos fenólicos em plantas está fortemente relacionado a fatores como genótipo e condições climáticas e de cultivo, o que implica no fato de que méis de diferentes regiões podem apresentar perfis fenólicos variados, em função da origem botânica (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016; OROIAN; ROPCIUC, 2019).

## 5.1 Compostos fenólicos em méis

A Tabela 1 compreende os compostos fenólicos encontrados em méis florais e de melato de diversas origens, a partir de estudos científicos publicados nos últimos 10 anos.

**Tabela 1.** Compostos fenólicos encontrados em méis florais e de melato de diversas origens.

Composto	Mel floral	Mel de melato	Composto	Mel floral	Mel de melato
<i>Ácidos fenólicos</i>			<i>Flavonoides</i>		
Abscísico	✓		Acacetina		✓
Benzóico		✓	Apigenina	✓	✓
Caféico	✓	✓	Campferol	✓	✓
Cinâmico	✓	✓	Catequina		✓
Clorogênico	✓	✓	Crisina	✓	✓
<i>p</i> -Cumárico	✓	✓	Epicatequina		✓
Elágico	✓	✓	Galangina	✓	✓
Ferúlico	✓	✓	Genisteína	✓	
Gálico	✓	✓	Hesperidina		✓
Gentísico		✓	Hesperetina	✓	
<i>p</i> -Hidroxibenzóico	✓		Isoramentina	✓	✓
3,4-dihidroxibenzóico	✓	✓	Luteolina	✓	✓
Rosmarínico	✓		Metoxicampferol	✓	
Salicílico		✓	Miricetina	✓	✓
Sinápico	✓	✓	Naringenina	✓	✓
Siringíco	✓	✓	Naringina		✓
Succínico	✓		Pinobanksina	✓	✓
Vanílico	✓	✓	Pinocembrina	✓	✓
<i>Aldeídos fenólicos</i>			Quercetina	✓	✓
Coniferaldeído		✓	Ramnetina		✓
Metil siringato	✓	✓	Rutina	✓	✓
Seringaldeído	✓	✓	Taxifolina		✓

Fonte: Alvarez-Suarez et al. (2012); Campone et al. (2014); Can et al. (2015); Escriche et al. (2014); Gašić et al. (2014); Halouzka; Tarkowski; Zeljković (2016); Haroun et al. (2012); Jerkovic; Marijanovic (2010); Kassim et al. (2010b); Nayik; Nanda (2016); Ramanauskiene et al. (2012); Seraglio et al. (2016); Sergiel; Pohl; Biesaga (2014); Silici; Sarioglu; Karaman (2013); Socha et al. (2011); Zhu et al. (2019).

Mais de 40 compostos fenólicos já foram identificados em méis de melato, conforme apresentado na Tabela 1 e também sumarizado por Seraglio et al. (2019). Embora estudos sobre a composição fenólica de méis florais sejam mais recorrentes, a literatura a respeito de méis de melato demonstra, além de maiores concentrações, conforme já mencionado, a ampla variedade da composição fenólica. Alguns compostos como os ácidos benzoico, gentísico e salicílico; os flavonoides acacetina, catequina, epicatequina, hesperidina, naringina, ramnetina e taxifolina;

e o aldeído fenólico coniferaldeído foram reportados apenas em méis de melato (CAN et al., 2015; HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016; HAROUN et al., 2012; SERAGLIO et al., 2016; SILICI, 2011).

O uso do mel para fins terapêuticos gerou, ao longo das últimas décadas, a necessidade de comprovação científica, motivando estudos relacionados às suas propriedades e quais os compostos responsáveis por esses efeitos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012). Seguindo essa perspectiva, alguns pesquisadores avaliaram o perfil de compostos fenólicos em diferentes tipos de mel, a fim de promover o conhecimento da atividade biológica dessas substâncias, bem como para identificação de marcadores de origem ou de autenticidade (CAMPONE et al., 2014; OROIAN; ROPCIUC, 2017; OUCHEMOUKH et al., 2017), visto que os compostos fenólicos compreendem inúmeras substâncias e sua presença em méis pode revelar tais marcadores.

Em mel de melato (de origem desconhecida), Escriche et al. (2014) identificaram que os compostos fenólicos miricetina ( $26 \mu\text{g g}^{-1}$ ), quercetina ( $9 \mu\text{g g}^{-1}$ ), galangina ( $14 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e em particular o ácido *p*-cumárico ( $314 \mu\text{g g}^{-1}$ ) foram considerados essenciais na diferenciação em relação aos méis florais. Can et al. (2015) estudaram a composição fenólica de méis de melato de carvalho e de pinho, e constataram que o primeiro possui maiores teores dos ácidos benzoico ( $50 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e gálico ( $83 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e epicatequina ( $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ); enquanto que o mel de pinho possui maiores concentrações de ácido 3,4-dihidroxibenzóico ( $81 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e quercetina ( $12 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Segundo os autores, o ácido gálico pode ser empregado como marcador de diferenciação entre os dois méis de melato estudados. Seraglio et al. (2016) observaram que em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth), vinte compostos foram identificados (soma variando entre 5,8 e  $18,5 \mu\text{g g}^{-1}$ , a depender da amostra analisada), sendo os mais abundantes os ácidos benzoico ( $11 \mu\text{g g}^{-1}$ ), 3,4-dihidroxibenzóico ( $1,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e salicílico ( $2 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Além disso, alguns compostos como ácido *p*-aminobenzóico, luteolina, hesperidina, isoramnetina, pinobanksina e coniferaldeído foram identificados e quantificados pela primeira vez em uma amostra de mel de melato (SERAGLIO et al., 2016).

É importante salientar que a determinação de compostos fenólicos em méis é um desafio visto que são componentes minoritários e o mel possui alta concentração de açúcares, que podem interferir na análise. O preparo de amostra geralmente é feito por extração em fase sólida (BERTONCELJ et al., 2011; ESCRICHE et al., 2014; VASIĆ et al., 2019) ou extração líquido-líquido (CAN et al., 2015; SERAGLIO et al., 2016), contudo, estes métodos apresentam algumas desvantagens como longos tempos de extração, alto custo e elevado uso de solventes orgânicos.

## 5.2 Determinação de compostos fenólicos em mel

A identificação de compostos fenólicos em méis, é realizada predominantemente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (CAMPONE et al., 2014), acoplada a detectores do tipo UV-Visível (CAN et al., 2015; RAMANAUSKIENE et al., 2012); com arranjo de diodos (ESCRICHE et al., 2014; HAROUN et al., 2012; NAYIK; NANDA, 2016; SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2013); e de espectrometria de massas (GAŠIĆ et al., 2014; HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016; KASSIM et al., 2010; SERAGLIO et al., 2016), embora a cromatografia a gás, a cromatografia em camada delgada e a eletroforese capilar também possam ser utilizadas (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

O alto custo dos equipamentos hifenados a espectrômetros de massas explica o amplo uso do detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*), uma vez que os compostos fenólicos apresentam diferentes perfis de espectros eletrônicos e consequentemente comprimentos de onda de absorção máxima variados. Sendo assim, a utilização de detectores de múltiplos comprimentos de onda, como o DAD apresenta melhor relação custo-benefício. Com este detector, o espectro de absorção de uma determinada substância, combinado com o seu respectivo tempo de retenção, contribui para sua identificação (ALCÂNTARA et al., 2019). Entretanto, devido à complexidade da composição do mel e à presença de compostos fenólicos em concentrações reduzidas nessa matriz, o emprego do detector DAD pode prejudicar os resultados, principalmente por consequência da baixa detectabilidade dos analitos de interesse, uma vez que as substâncias interferentes, normalmente presentes em maiores concentrações, são co-extraídas e posteriormente co-eluídas com os compostos alvo (BIESAGA; PYRZYŃSKA, 2013; SERGIEL; POHL; BIESAGA, 2014). Frente ao exposto, uma atenção especial deve ser direcionada à etapa de preparo de amostra, sendo necessária muitas vezes a adoção de um procedimento multi-etapas para a extração dos compostos fenólicos.

Uma importante etapa no preparo de amostras é a purificação dos extratos, também conhecida como etapa de *clean-up*, cujo principal objetivo é o de eliminar ou minimizar a presença de interferentes na matriz, proporcionando uma melhora na exatidão e precisão dos resultados (BIESAGA; PYRZYŃSKA, 2013; CAMPONE et al., 2014). Diferentes técnicas de purificação de amostras podem ser aplicadas, dentre as quais a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) e a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid Liquid Extraction*) são amplamente empregadas na extração de compostos fenólicos em méis. As duas técnicas de extração são consideradas importantes, uma vez que também podem atuar no

sentido de concentrar os analitos de interesse. A Tabela 2 apresenta uma coletânea de estudos que contemplam esses dois métodos de extração no preparo de amostras de méis de melato de diferentes origens botânicas para posterior determinação dos compostos fenólicos.

**Tabela 2.** Estudos sobre técnicas de preparo de amostras de mel de melato para determinação de compostos fenólicos.

<b>Origem botânica do mel de melato</b>	<b>Compostos avaliados</b>	<b>Preparo de amostra/ Técnica analítica</b>	<b>Referência</b>
Silvestre (árvores coníferas e latifoliadas); abeto branco ( <i>Abies alba</i> ), abeto falso ( <i>Picea abies</i> )	Flavonoides	SPE/HPLC-DAD-ESI/MS	Bertoncelj et al. (2011)
Lima ( <i>Tilia platyphyllos</i> ), carvalho ( <i>Quercus</i> sp. L.)	Ácidos fenólicos e flavonoides	LLE/HPLC-UV-Vis	Can et al. (2015)
Silvestre	Ácidos fenólicos e flavonoides	SPE/HPLC-DAD	Escriche et al. (2014)
Pinheiro ( <i>Pinus</i> sp.), Carvalho ( <i>Quercus</i> sp.)	Ácidos fenólicos e flavonoides	SPE/HPLC-DAD	Haroun et al. (2012)
n.i.	Ácidos fenólicos e flavonoides	SPE/ HPLC-DAD	Lachman et al. (2010)
Bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	Ácidos fenólicos e flavonoides	LLE/HPLC-ESI-MS/MS	Seraglio et al. (2016)
Abeto branco ( <i>Abies alba</i> ), abeto falso ( <i>Picea abies</i> ), pinheiro ( <i>Pinus</i> sp.),	Ácidos fenólicos e flavonoides	SPE/HPLC-DAD	Silici; Sarioglu; Karaman (2013)
n.i.	Ácidos fenólicos	SPE/HPLC-UV-Vis	Socha et al. (2011)
Abeto prateado ( <i>Abies alba</i> Mill.), carvalho ( <i>Quercus ilix</i> L.), carvalho húngaro ( <i>Quercus frainetto</i> Ten.), bordo de Montpellier ( <i>Acer monspessulanum</i> L.), árvores coníferas	Ácidos fenólicos e flavonoides	SPE/UHPLC-DAD-MS/MS	Vasić et al. (2019)

n.i., não informado, SPE - extração em fase sólida, LLE – extração líquido-líquido, HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*; MS, do inglês *Mass Spectrometry*; ESI, do inglês *Electrospray ionization*; DAD, do inglês *Diode Array Detector*; UV-Vis, ultravioleta e visível.

Fonte: o próprio autor (2019).



Tanto a técnica de LLE, quanto de SPE são empregadas para a extração de agliconas, não sendo indicadas para a extração de compostos fenólicos conjugados, a não ser que uma etapa anterior à extração envolvendo uma hidrólise seja executada (PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009). A maior vantagem da LLE é a solubilidade dos compostos fenólicos em diversos solventes orgânicos, o que proporciona uma maior capacidade de extração, e dentre as desvantagens, os longos tempos de extração e grandes volumes de solvente requeridos são os principais (LIU et al., 2016). Dentre as vantagens relacionadas à SPE, principalmente quando comparada à LLE clássica estão o menor consumo de solvente orgânico e consequentemente reduzidos volumes de resíduos tóxicos gerados, facilidade de automação, e disponibilidade comercial de diversos solventes de extração (BOYACI et al., 2015). Por outro lado, entre as desvantagens estão os altos custos dos cartuchos (utilizados uma única vez e descartados) e dos dispositivos comerciais multivias (*manifolds*) e, eventualmente a dificuldade em selecionar o solvente adequado para a aplicação desejada (CAMPONE et al., 2014; MONIRUZZAMAN et al., 2014).

Não existe um consenso com relação à técnica de extração mais apropriada para compostos fenólicos em matrizes complexas, e mais especificamente direcionados a amostras de mel, portanto, é indiscutível a necessidade de estudos amplos relacionados ao tema. Nesse contexto, e com o objetivo de superar as dificuldades comumente observadas nos métodos convencionais de preparo de amostras, os estudos recentes buscam a redução: dos tempos de extração; do número de etapas envolvidas; dos custos operacionais; dos volumes de solventes tóxicos utilizados; e, consequentemente, dos resíduos gerados (HILBIG et al., 2018; SILVA et al., 2019a; ZHU et al., 2019).

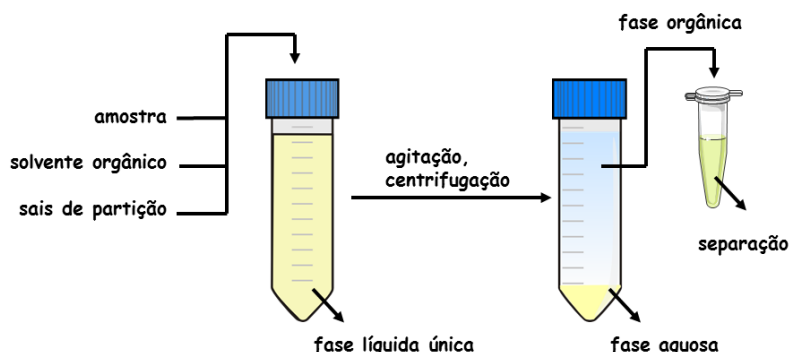
Além das características (citadas anteriormente) desejáveis durante a escolha do método de preparo de amostras, deve ser considerada a preservação da integridade química dos analitos de interesse. Nesse contexto, Fontana; Bottini (2014) utilizaram o método de QuEChERS para extrair uma ampla variedade de compostos fenólicos de vinhos, reconhecido como uma matriz complexa, assim como o mel. Os autores reportaram que o método é robusto e confiável para a extração de compostos fenólicos nesta matriz, que foi seguida por identificação dos mesmos por HPLC-DAD. Esse método de extração foi proposto por Anastassiades et al. (2003) para extração de pesticidas em frutas, no entanto, mesmo apresentando diversas vantagens frente aos métodos de extração convencionais, são poucas as aplicações destinadas à determinação de compostos bioativos, tais como os fenólicos, e principalmente, em alimentos.

### 5.2.1 Método QuEChERS

O método QuEChERS foi desenvolvido por Anastassiades et al. (2003), e a nomenclatura do método é a abreviação de suas principais características: rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). O método foi desenvolvido pelos pesquisadores para extração de multi-classes de pesticidas polares e apolares em frutas, e, desde então tem sido largamente utilizado para análise de pesticidas (DURAK et al., 2020; FERREIRA et al., 2016; SONG et al., 2019; TETTE et al., 2016; VARELA-MARTÍNEZ et al., 2019) e micotoxinas (ALCÁNTARA-DURÁN et al., 2019; GONZÁLEZ-JARTÍN et al., 2019; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2015; XING et al., 2016; XU et al., 2019) em diversas matrizes.

O método é conduzido em duas etapas: extração e limpeza. A primeira, uma extração líquido-líquido seguida de partição por *salting-out* e a segunda, uma etapa de extração em fase sólida dispersiva (do inglês *d-SPE: dispersive solid-phase extraction*) (ANASTASSIADES et al., 2003), como ilustrado na Figura 8.

**Figura 8.** Representação esquemática do método de QuEChERS.



Fonte: Adaptado de Valente; Gonçalves; Rodrigues (2013).

Evidentemente, o método proposto pelos autores não é o primeiro a utilizar estes mecanismos de purificação e extração de amostras, porém, a combinação de ambos, dos solventes e sais empregados em associação é pioneira (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). Devido a sua praticidade de execução, existem estudos publicados com diversas variações do método QuEChERS, com modificações realizadas em função do(s) composto(s) alvo e da matriz a ser analisada (SCHMIDT; SNOW, 2016).

Segundo Anastassiades et al. (2003), os fatores que afetam o método são a composição da amostra, o tipo de solvente, a relação amostra:solvente, o procedimento de agitação empregado na extração, a temperatura, a partição das fases e a limpeza do extrato. A avaliação

da qualidade do método pode ser feita a partir de ensaios de recuperação, da análise dos compostos co-extraídos (por gravimetria ou cromatografia), da cor e da quantidade de água apresentadas nos extratos.

A escolha do solvente deve considerar a polaridade dos compostos-alvo, a seletividade desejada, a partição em água, a possibilidade do uso de técnicas cromatográficas, os custos, a segurança dos produtos químicos empregados e a preocupação com o meio ambiente (ANASTASSIADES et al., 2003). A etapa de extração é realizada com acetonitrila que é miscível em água em todas as proporções. Sua polaridade é favorável para a extração de uma variedade de compostos, com menor interferência de substâncias co-extraídas, além de ser compatível com as fases estacionárias empregadas em cromatografia a gás e líquida. O uso da acetonitrila facilita a separação de fases (água e acetonitrila) na etapa de *salting-out*, e a remoção de água presente no extrato final (*clean-up*), além de ser um solvente orgânico menos prejudicial quando comparado aos utilizados em extrações líquido-líquido convencionais, como acetona e acetato de etila (ANASTASSIADES et al., 2003; GUO et al., 2010; VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013).

A miscibilidade da acetonitrila em água promove a formação de uma fase única que depois deve ser separada por partição usando *salting-out*. Porém, de acordo com Anastassiades et al. (2003), em amostras com elevado teor de açúcares, como o mel, acetonitrila e água não se misturam, ou seja, não formam uma fase única na etapa de extração, o que facilita a etapa posterior de limpeza do extrato orgânico. Quanto à relação amostra:solvente, segundo os autores, apesar de a acetonitrila apresentar baixa volatilidade, o que dificulta sua evaporação, este não é um problema já que uma relação de 1:1 é satisfatória para a extração, podendo ser empregado 10 g de amostra para 10 mL de solvente. O efeito do pH do solvente não pode ser negligenciado nesta etapa, porque compostos como ácidos fenólicos são mais estáveis em pHs menores, o que evita sua oxidação (FONTANA; BOTTINI, 2014; GUO et al., 2010).

O método apresenta a vantagem de não depender de equipamentos ou vidrarias sofisticadas para ser conduzido. A etapa de extração geralmente é realizada em vórtex ou agitador orbital, em recipiente fechado (tubo de centrífuga), sendo que apenas um recipiente é usado (ANASTASSIADES et al., 2003). É importante salientar que o método não visa necessariamente a concentração dos analitos, mas esta pode acontecer, contudo, o método de QuEChERS apresenta importantes vantagens quando comparados, por exemplo, à SPE.

Seguida da extração, ocorre a etapa de partição entre fases, o fenômeno de *salting-out*, que consiste na adição de um eletrólito à solução aquosa a fim de aumentar a razão de distribuição do soluto, sendo aplicado para diferentes fins, como a análise de amostras

biológicas como plasma humano (CHEN et al., 2019), e análise de compostos diversos em matrizes alimentares (GAO et al., 2015; JAIN; GUPTA; VERMA, 2015; KOLTSAKIDOU; ZACHARIS; FYTIANOS, 2015). A adição de um eletrólito ou mistura de eletrólitos permite o enfraquecimento das forças de solvatação entre os solutos e o solvente, induzindo a formação de um sistema bifásico (VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013). Os sais utilizados para o processo de *salting-out* em solventes orgânicos miscíveis em água devem ser insolúveis no solvente orgânico e altamente solúveis na água, a fim de maximizar a interação com as moléculas de água (ANASTASSIADES et al., 2003; CHEN et al., 2019).

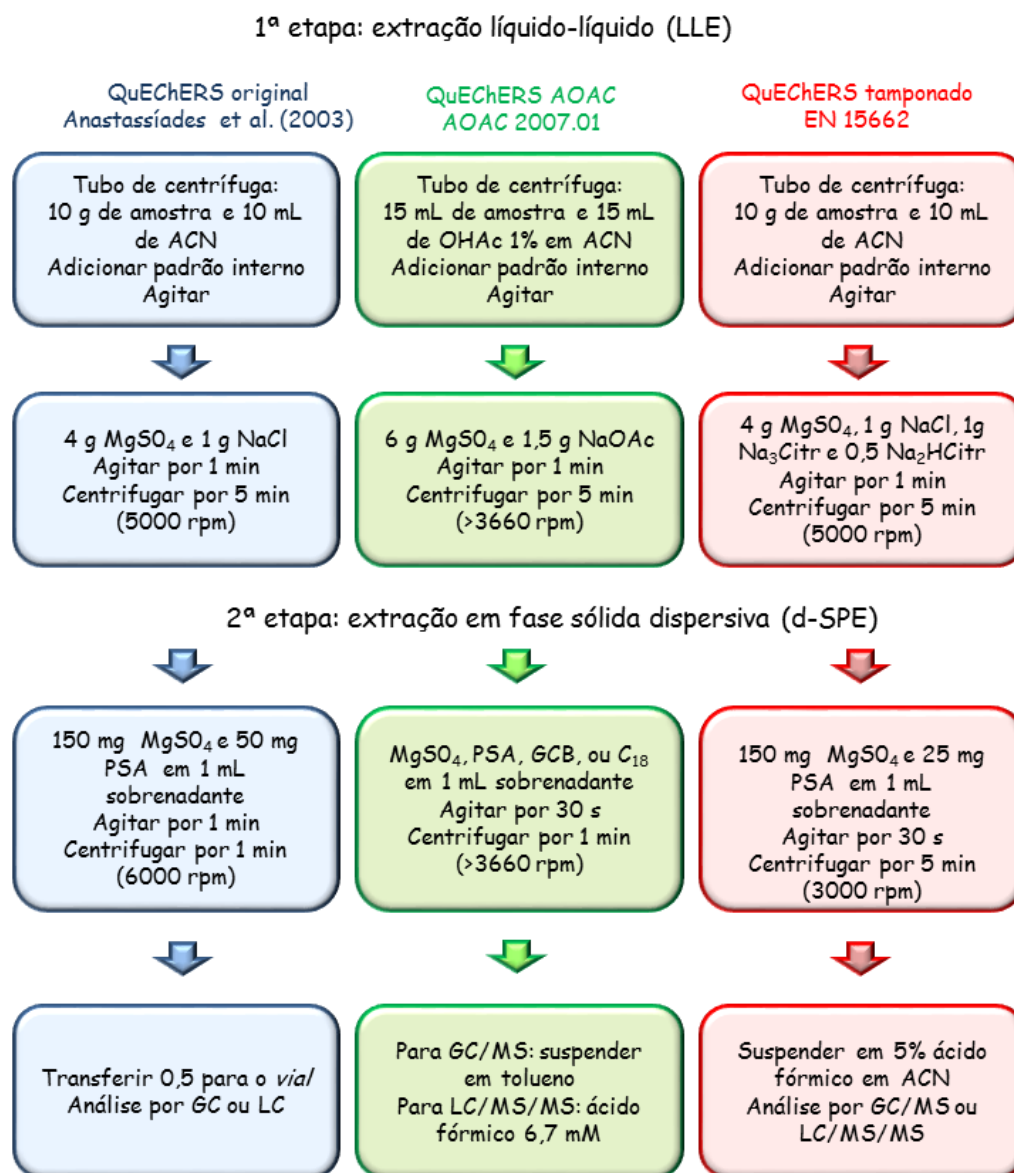
A principal vantagem do emprego de sais é que evitam o aumento do volume envolvido na reação, facilitando a etapa posterior de limpeza. No primeiro trabalho, publicado por Anastassiades et al. (2003) durante a etapa de *salting-out* foi utilizado sulfato de magnésio, devido a sua habilidade de solvatação em água (solubilidade de 337 g por litro de água a 20 °C). Além de altamente hidratado pela água, o sulfato de magnésio apresenta a vantagem de liberar calor nesse processo (alcançando temperaturas entre 40 e 45 °C), o que facilita o processo de extração. Além do sulfato, cloreto de sódio foi empregado, uma vez que, segundo os autores, este sal apresenta forte influência na separação de fases e, conseqüentemente, na polaridade de ambas (seletividade), promovendo maior recuperação dos compostos polares.

As etapas de limpeza e retirada da água residual do extrato foram realizadas simultaneamente por meio da *d*-SPE. Nesta etapa, o sulfato de magnésio é novamente incluído ao sistema para retirar a água da fase orgânica, e adsorventes são utilizados para removerem substâncias interferentes, como pigmentos, açúcares e ácidos orgânicos. Os autores utilizaram amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) que remove interferentes por ligações de hidrogênio (ANASTASSIADES et al., 2003; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). PSA é um trocador aniônico fraco utilizado em QuEChERS devido a sua notável capacidade de aprisionamento dos ácidos orgânicos polares, ácidos graxos, alguns açúcares e pigmentos (GUO et al., 2010). Esta etapa é frequentemente passível de modificações, pois dependendo da composição da matriz, determinados compostos devem ser eliminados. Geralmente, o tipo e quantidade de adsorventes são alterados, podendo ser empregado ainda o octadecilsilano (C<sub>18</sub>), que tem a capacidade de remover compostos apolares, bem como terra diatomácea (celite), entre outros (ANASTASSIADES et al., 2003; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015).

Sem considerar possíveis modificações e adaptações realizadas por diversos autores para aplicação do método QuEChERS em variadas situações, existem dois métodos recomendados por órgãos reguladores, modificados a partir do original: o método da AOAC 2006.01 (AOAC

INTERNATIONAL, 2011) e o método tamponado, proposto pela Norma Europeia 15662 (EU, 2007), ambos desenvolvidos para aplicação na análise de pesticidas, como apresentado no fluxograma da Figura 9.

**Figura 9.** Fluxogramas dos métodos QuEChERS recomendados por órgãos reguladores na análise de pesticidas.



Legenda - ACN, acetonitrila; OHAc, ácido acético; NaOAc, acetato de sódio; Na<sub>3</sub>Citr, citrato de sódio; Na<sub>2</sub>HCitr, citrato de sódio sesquidratado; PSA, amina primária secundária; GCB, carbono negro grafitado; C<sub>18</sub>, octadecilsilano, *vial*, frasco para acondicionamento das amostras para análise em equipamento de cromatografia; GC, cromatografia a gás; LC, cromatografia líquida; MS, detecção por espectrômetro de massas.

Fonte: adaptado de Schmidt; Snow (2016).

As etapas básicas são as mesmas para todos os métodos: extração líquido-líquido entre fase orgânica e água usando sais de partição (*salting-out*), seguida de agitação e centrifugação. Uma alíquota do extrato orgânico é recolhida e submetida a uma purificação utilizando sulfato de magnésio e um adsorvente como amina secundária primária (PSA). O método da AOAC utiliza acetato de sódio, em substituição ao NaCl na etapa de *salting-out*, e acetonitrila com 1% de ácido acético, a fim de tamponar o sistema de extração para pesticidas, sensíveis a meios básicos, tais como diclofluanida e pimetozina. Vale ressaltar que os tipos e quantidades de solventes e sais utilizados devem ser avaliados de acordo com a necessidade da análise e da matriz, a fim de promover uma melhor recuperação e remoção de picos interferentes (SCHMIDT; SNOW, 2016).

O método QuEChERS é particularmente popular para a determinação de resíduos de pesticidas polares e não polares em várias matrizes alimentares, porque é simples, com custo relativamente baixo, passível de alto rendimento, eficiente, com um número mínimo de etapas e sujeito a modificações. O método QuEChERS modificado foi aplicado em amostras de mel, principalmente para a extração de pesticidas (BARGANSKA; SLEBIODA; NAMIESNIK, 2014; FONTANA; CAMARGO; ALTAMIRANO, 2010; KAMEL, 2010; WIEST et al., 2011) e poluentes (DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ et al., 2012). Barganska; Slebioda; Namiesnik (2014) destacaram o uso do metanol como solvente extrator de sulfonamidas, como forma de evitar a ligação entre estes compostos e os açúcares presentes no mel, o que impediria a recuperação de sulfonamidas. Já Fontana; Camargo; Altamirano (2010), reportaram em seu trabalho a importância do estudo do pH para a extração de pesticidas organofosforados em mel pelo método de QuEChERS, visto que este possui compostos como ácidos orgânicos e aminoácidos, que podem alterar o pH. Finalmente, Wiest et al. (2011) consideraram necessária a adição de uma etapa de concentração ao método de QuEChERS, para extração de 80 contaminantes em amostras de mel, abelhas e pólen, encontrados em baixas concentrações.

O método de QuEChERS foi empregado na extração de compostos fenólicos variados, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos em matrizes como uva (BURIN et al., 2014), maracujá (ROTTA et al., 2019) e cenoura (SILVA; HAESSEN; CÂMARA, 2012). Fontana; Bottini (2014) aplicaram o método para extração de compostos fenólicos em vinho e realizaram um estudo de todas as etapas do processo, semelhante ao realizado por Anastassiades et al. (2003), considerando a estabilidade dos compostos e os interferentes presentes na matriz. Até o presente momento não há relatos de aplicação do método de QuEChERS para extração de compostos fenólicos em mel de melato. Para isso, as etapas do método devem estudadas e testadas de forma

a minimizar os efeitos de matriz. Este estudo pode ser benéfico para identificar a melhor abordagem de purificação do mel de melato para eliminar as interferências. Neste sentido, as abordagens estatísticas uni e multivariadas são fundamentais para avaliar as etapas críticas que afetam a eficiência e a seletividade do método de extração (GRANATO; NUNES; BARBA, 2017).

## **6. Aplicação de ferramentas quimiométricas na ciência de alimentos**

O uso de métodos matemáticos e estatísticos, incluindo técnicas univariadas e multivariadas, em ciência de alimentos, tem aumentado significativamente ao longo dos últimos anos (ACIERNO et al., 2018; GARRIDO-DELGADO; EUGENIA MUÑOZ-PÉREZ; ARCE, 2018; MAHNE OPATÍĆ et al., 2018; SILVA et al., 2019b). Ferramentas e métodos estatísticos diversos podem ser interessantes quando diferentes matrizes alimentares, parâmetros de análise e potencial bioativo precisam ser avaliados (GRANATO; NUNES; BARBA, 2017; NUNES et al., 2015).

Para entender um conjunto considerável de dados com variáveis mutuamente dependentes, é importante que, de alguma forma, estes dados possam ser agrupados com o objetivo de identificar a influência de cada variável (KHATTREE; NAIK, 1999). Planejamentos experimentais são técnicas de otimização multivariada que são amplamente utilizadas em diversos campos de pesquisa, com destaque para a ciência de alimentos, a fim de identificar variáveis influentes em diversos sistemas, como por exemplo, processos industriais, métodos de análise, preparo de amostras, ou qualquer outro processo que precise ser otimizado (CHEN et al., 2018; GAO et al., 2020; RICIPUTI et al., 2018). Dentre as vantagens do uso, destacam-se a economia de tempo e de recursos (financeiros e humanos), e o fato de que todas as variáveis analisadas são tratadas com igual importância (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009).

Para a otimização multivariada inicialmente deve-se escolher o delineamento estatístico para analisar uma determinada região, e, na sequência, conduzir os experimentos de forma aleatória, e por fim analisar os resultados ou as respostas obtidas por meio da análise de variância (ANOVA) a partir dos resultados da regressão, de modo que o modelo mais adequado possa ser usado para representar os dados obtidos (FERREIRA et al., 2019).

O método de superfície de resposta, o qual explora os efeitos das variáveis de processo nas respostas específicas de um sistema é o mais empregado em estudos que contemplam ciência de alimentos (ANDRADE; LANÇAS, 2017; BAHADI et al., 2019; HUI et al., 2020).

Embora os modelos fatoriais sejam úteis para determinar superfícies de resposta simples que apresentem linearidade em todos os fatores investigados, os mesmos são empregados comumente para determinar quais parâmetros experimentais são os mais importantes a serem investigados e quais os que não afetam significativamente os resultados experimentais (GRANATO; NUNES; BARBA, 2017). Os delineamentos experimentais comumente usados para determinar as superfícies de resposta são: o delineamento composto central completo e fracionário e alguns mais complexos, como o Box-Behnken, o Doehlert e os planejamentos de mistura, como o Simplex-Centroide (FERREIRA et al., 2019; YU; LOW; ZHOU, 2018).

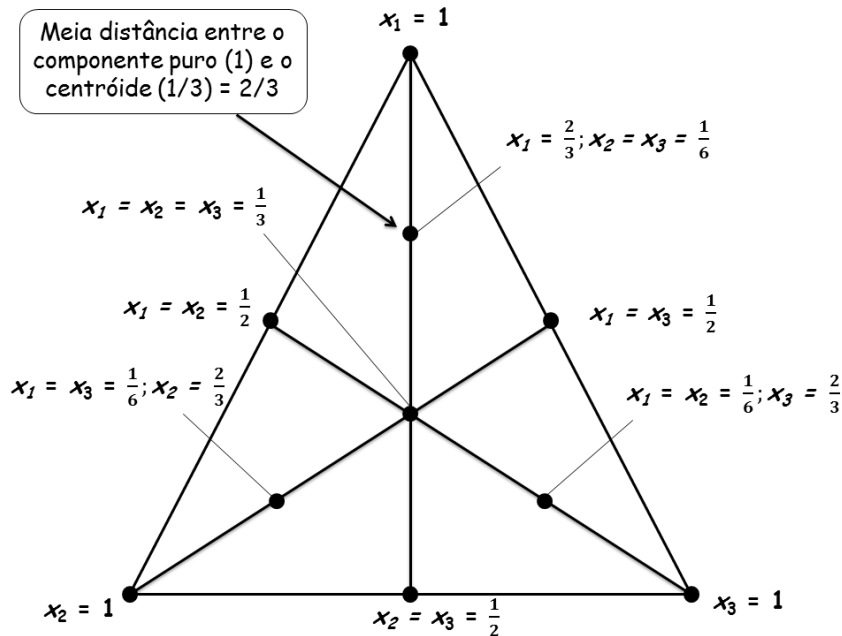
Os delineamentos compostos centrais (DCC) apresentam algumas vantagens, como rotabilidade e blocagem ortogonal, análise de falta de ajuste do modelo, além do reduzido número de ensaios (TEÓFILO; FERREIRA, 2006), tornando este tipo de planejamento uma opção simples e largamente empregada para otimização de processos de extração. Este tipo de planejamento foi utilizado para otimização da extração de compostos fenólicos em milho roxo, por Monroy et al. (2016), em colorau, por Chisté et al. (2011), em uva vermelha, por Morelli; Prado (2012), e em mirtilo, amora e grumixama por Machado et al. (2017); além do uso para extração de isoflavonas em farinha de soja por Moras et al. (2017).

Por sua vez, os planejamentos de mistura diferem dos outros planejamentos citados, pois as propriedades das misturas dependem das proporções dos ingredientes que as compõem, e não dos seus valores absolutos (NANO et al., 2009). Neste tipo de *design*, as propriedades químicas e físicas são estudadas em função de proporções variáveis dos componentes da mistura, cuja soma das frações sempre deve ser igual a 1 (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009). Conseqüentemente, o espaço de representação de uma mistura com  $q$  componentes fica reduzido a uma região chamada *simplex*, uma configuração espacial determinada por um número de pontos um a mais do que o número de dimensões do espaço (NUNES, 1998). Tais condições reduzem a região *simplex* para dimensões iguais a  $q-1$ , sendo que para  $q=2$  tem-se uma reta, para  $q=3$ , um triângulo equilátero e para  $q=4$ , um tetraedro (REIS; ANDRADE, 1996). Esta é uma ferramenta estatística importante que pode ajudar a esclarecer a relação entre, por exemplo, a composição do solvente e o composto de interesse na separação e quantificação de compostos. Os planejamentos de mistura mais utilizados são o Simplex-Lattice e o Simplex-Centroide.

O planejamento do tipo Simplex-Centroide, elucidado por Scheffé (1963) investiga além dos vértices, os centroides da região *simplex*. A Figura 10 apresenta os pontos internos do planejamento Simplex-Centroide.



**Figura 10.** Pontos internos do planejamento Simplex-Centroide.



Fonte: adaptado de Reis; Andrade (1996).

Apesar de ser um planejamento de simples aplicação, possui a desvantagem de não permitir o teste de falta de ajuste do modelo, uma vez que o número de termos do planejamento é igual ao número de pontos reproduzidos. A ausência do teste de falta de ajuste pode ser solucionada pela replicação dos ensaios ou adição de pontos convenientes. O número de experimentos deste planejamento é igual a  $2^q - 1$ , onde  $q$  é o número de componentes da mistura, exemplificado na Figura 10, ou seja, para a mistura de 3 componentes, serão realizados 7 ensaios, além da adição de 3 pontos axiais ou internos (meia distância entre o componente puro e o centroide), usados quando se deseja inferir sobre o efeito de cada componente da mistura na resposta (NUNES, 1998).

Quando planejamentos experimentais como os mencionados são utilizados, os modelos matemáticos gerados podem prever a condição especificamente para obtenção da melhor resposta possível para o que se deseja, dentro da região estudada. Em análises cromatográficas, quando se deseja otimizar a composição da fase móvel para uma determinada separação, ou ainda, as condições de extração de um amplo número de compostos, por diversas vezes, as condições ótimas são diferentes para cada analito ou grupo de analitos em estudo. Nestes casos, pode-se fazer o uso de uma técnica estatística de otimização simultânea de respostas. Esta função, foi descrita por Derringer e Suich (1980), que atribuíram à função o nome de “*desirability function*” ou função de “desejabilidade”. Esta função representa a média geométrica de todas as respostas normalizadas, obtidas de cada uma das funções que a compõe.

A normalização é realizada levando considerando o menor e o maior valor que se espera obter para cada resposta, de acordo com as Equações 1, 2 e 3.

$$d_i = 0 \text{ se } Y_i < Y_{i-\text{inf}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{i-\text{inf}}}{Y_{i-\text{max}} - Y_{i-\text{inf}}} \text{ se } Y_{i-\text{inf}} < Y_i < Y_{i-\text{max}} \quad \text{Eq. 2}$$

$$d_i = 1 \text{ se } Y_i > Y_{i-\text{max}} \quad \text{Eq. 3}$$

onde  $d_i$  é o valor normalizado da resposta,  $Y_i$  é o valor obtido em uma determinada condição,  $Y_{i-\text{inf}}$  é o menor valor esperado e  $Y_{i-\text{max}}$  é o maior valor esperado, sendo que a variação de  $d_i$  pode se aproximar do valor máximo, igual a 1.

Esta abordagem, também nomeada de “tomada de decisão multicritério”, é geralmente utilizada para otimização simultânea de respostas em cromatografia e eletroforese capilar, em situações em que muitos compostos precisam ser separados, ou seja, há um número grande de respostas a serem otimizadas. Bourguignon; Massart (1991) utilizaram a *desirability function* para escolher o melhor cromatograma utilizando como resposta a resolução entre os picos. Jimidar; Bourguignon; Massart (1996) utilizaram a técnica de Derringer; Suich (1980) em eletroforese capilar de zona para encontrar a combinação mais desejável de separação, tempo de análise e sensibilidade. Seguindo a mesma linha, alguns autores (BALLUS et al., 2011, 2014) tem usado a função para otimização de múltiplas respostas obtidas em estudos de separação de compostos em matrizes alimentares.

O uso da quimiometria no desenvolvimento de métodos é bem estabelecido e aplicado com diferentes objetivos, sendo que o número de publicações cresce a cada ano, auxiliando na melhoria da performance dos processos e confiabilidade dos resultados e minimizando as dificuldades causadas por métodos baseados em tentativa e erro. Aqui, deve ser ressaltada também a minimização de custos e menor geração de resíduos, justamente por se evitar alcançar as respostas adequadas por tentativa e erro. Além da otimização de métodos de separação, extração, purificação; a quimiometria também encontra espaço na análise de um amplo conjunto de resultados em ciência de alimentos, e o uso de técnicas exploratórias como a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Componentes Analysis*) tem sido frequente (GRANATO et al., 2018; SILVA et al., 2019a). Esta análise é uma ferramenta para avaliação de resultados, que representa graficamente relações entre amostras e variáveis e

fornece uma maneira de reduzir a dimensão dos dados. Tem como fundamento a geração de novas variáveis, denominadas componentes principais, para explicar a variabilidade dos resultados, além de evidenciar a associação entre as diferentes variáveis estudadas (NUNES et al., 2015).

Este método de análise estatística representa uma alternativa interessante ao uso de planejamentos experimentais, pois também permite compreender matematicamente as principais alterações nos dados e quais os fatores devem ser manipulados para observar melhoria ou diferença nos resultados, sendo muito útil e cada vez mais utilizado para a determinação de marcadores de origem ou de autenticidade, a fim de detectar práticas fraudulentas em alimentos e bebidas (GRANATO et al., 2018).

## **7. Autenticidade de mel**

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (BRASIL, 2000) o define como o produto alimentício produzido pelas abelhas (*Apis mellifera*), a partir do néctar das flores (mel floral) ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores (mel de melato) que ficam sobre partes vivas de plantas; que as abelhas então recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia.

De acordo com o último levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), no ano de 2017 foram produzidos 41,6 mil toneladas de mel no Brasil. A região Sul se destaca como a principal produtora e exportadora, com uma parcela que corresponde a 39,7% do total nacional. O estado de Santa Catarina aparece em 5º lugar na produção de mel com 10,7% do total produzido no país. Os parâmetros de identidade e qualidade de méis, estabelecidos pelo regulamento (BRASIL, 2000), mesmo sendo determinados por métodos clássicos com elevados limites de detecção, são amplamente empregados na detecção de adulterações (SILVA et al., 2016b), expondo a facilidade em se produzir méis artificiais ou adulterados, sem que seja descoberta a fraude.

Neste contexto, a avaliação da autenticidade de méis tem ganhado bastante atenção devido à frequente ocorrência de práticas fraudulentas. Existem dois aspectos diferentes com relação a autenticidade de méis: autenticidade relacionada às práticas de produção, colheita e processamento; e autenticidade relacionada com a origem botânica e geográfica (AZEVEDO et al., 2017b; BERGAMO et al., 2018a, 2018b; GEANA; CIUCURE, 2019). Adulteração é uma

preocupação não apenas para evitar fraude econômica, mas para garantir a segurança de alimentos como o mel.

Em méis florais, formas comuns de adulteração incluem a adição direta de xaropes como os de milho, arroz e cana e a rotulagem incorreta no que diz respeito à origem botânica, além disso, em méis de melato a adição de méis florais ou até mesmo méis de cor escura, com baixo valor comercial é uma das formas de fraude (GEANA; CIUCURE, 2019; SCHIEVANO et al., 2019). O aumento do interesse comercial por méis de melato tem aumentado sua valorização e seu preço para a venda. Para o mel de melato de bracatinga, aliado ao interesse de importação por outros países, há a necessidade de diferenciação deste mel como uma resposta ao mercado consumidor (BERGAMO et al., 2018a). O que tem sido observado é que os produtores brasileiros de mel de melato de bracatinga enfrentam as restrições de não possuírem um produto de origem controlada, com garantia de rastreabilidade e autenticidade, passível de ter sua própria legislação para maior controle da cadeia produtiva e consequente valorização do produto.

Atualmente, o mel de melato de bracatinga passa pelo processo de Indicação Geográfica (modalidade Denominação de Origem) (BRASIL, 2018). A denominação de origem exhibe diversas vantagens, com destaque para melhor rastreabilidade do produto, desenvolvimento da região produtora, valorização da cultura regional, agregação de valor ao produto, abertura de novos mercados e preservação do meio ambiente. A União Europeia regulamenta o sistema conhecido como denominação de origem protegida (DOP), visando promover e proteger nomes de diversos tipos de alimentos. Os produtos que possuem o registro de denominação de origem têm características comprovadas, resultantes unicamente da região e das capacidades dos produtores da região de produção a que estão associados (EU, 2006). Além disso, a denominação de origem de um produto traz inúmeros benefícios não somente à região associada, mas ao consumidor, com a garantia da qualidade do produto, e evidentemente ao produtor, por meio de sua organização social. Indiretamente a região a qual o produto é vinculado é beneficiada pelo desenvolvimento sócio econômico e valorização do patrimônio cultural.

Para que se estabeleça a denominação de origem do mel de melato de bracatinga, é de grande relevância o desenvolvimento de abordagens analíticas rápidas e confiáveis para determinação de sua autenticidade. A melissopalínologia – identificação dos grãos de pólen no mel – ainda é bastante usada para confirmação da origem geográfica e botânica de méis florais (KASPRZYK et al., 2018; OROIAN; ROPCIUC, 2017). No entanto, esse tipo de análise é lenta e requer um banco de dados amplo para a correta identificação botânica da origem do pólen,

além de possuir dependência na habilidade e experiência do analista, e de não ser aplicável para méis de melato. Sendo assim, outros parâmetros de identificação alternativos à análise palinológica são constantemente explorados, e alguns exemplos de trabalhos publicados exploram a correlação do perfil de substâncias presentes em méis, tais como minerais, fenólicos, determinados parâmetros físico-químicos, sempre com o auxílio de ferramentas estatísticas (ALDA-GARCILOPE et al., 2012; BERGAMO et al., 2018a; KARABAGIAS et al., 2014). Dados extraídos de métodos de espectroscopia, também são largamente empregados para determinação de autenticidade, combinados com ferramentas quimiométricas a fim de determinar a origem de mel (ALIAÑO-GONZÁLEZ et al., 2019; KASPRZYK et al., 2018; LATORRE et al., 2013; ZUCCATO et al., 2017).

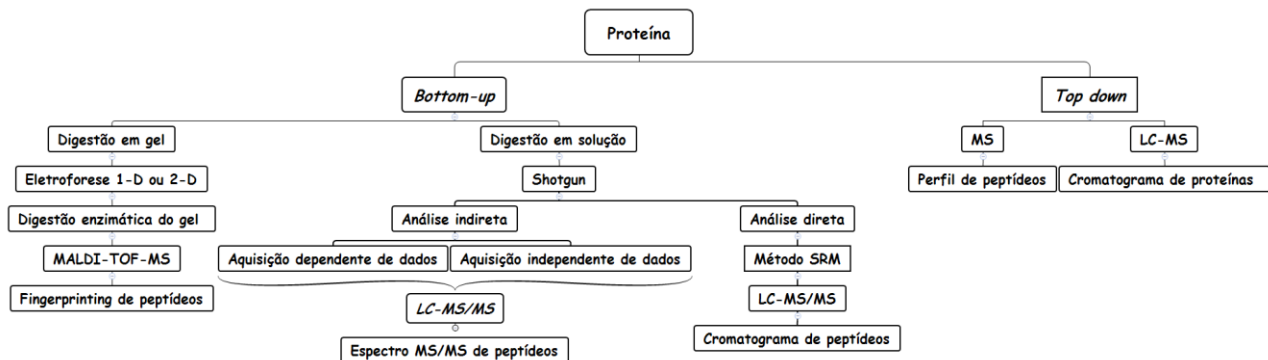
Alguns trabalhos já foram conduzidos no que concerne à diferenciação de mel de melato de bracinga, principalmente com relação aos méis florais de uma mesma região, como o uso de parâmetros físico-químicos (BERGAMO et al., 2018b), perfil de minerais (BERGAMO et al., 2018a) e perfil eletroforético de proteínas (AZEVEDO et al., 2017b). Contudo, os resultados na maioria das vezes são pontuais, sendo que a comprovação da denominação de origem demanda a busca por marcadores específicos de autenticidade de mel de melato de bracinga.

As ciências ômicas têm sido amplamente empregadas para comprovar a autenticidade de alimentos, podendo solucionar as limitações dos métodos e estratégias atualmente empregados para este fim. O grupo das ciências ômicas inclui a proteômica, metabolômica, genômica, transcriptômica e mais recentemente, lipidômica e glicômica (ALFIERI, 2019; BÖHME et al., 2019).

A proteômica é por definição, a análise de proteínas em um sistema biológico particular em um determinado momento. A proteômica inclui o conhecimento estrutural e funcional das proteínas, mas também a quantificação de sua abundância, o estudo de suas modificações e as interações entre elas. As proteínas podem atuar como indicadores em diversas propriedades associadas à qualidade, composição ou origem dos alimentos. A análise do proteoma pode ser aplicada para a busca de novas proteínas e peptídeos marcadores em alimentos, permitindo o desenvolvimento de ensaios que permitam detectar adulterações. Métodos analíticos confiáveis podem ser desenvolvidos e validados a fim de detectar peptídeos marcadores previamente identificados (BÖHME et al., 2019; ORTEA; O'CONNOR; MAQUET, 2016).

Existem duas estratégias que podem ser utilizadas para análise proteômica, a *bottom-up* (em tradução literal: de baixo para cima) ou a *top down* (em tradução literal: de cima para baixo) (ORTEA; O'CONNOR; MAQUET, 2016). A Figura 11 apresenta o organograma para ambas as estratégias.

**Figura 11.** Fluxo de execução comum em uma análise proteômica.



Fonte: adaptado de Ortea; O'Connor; Maquet (2016).

A abordagem *bottom-up* é baseada na análise de peptídeos por MS, obtidos após a digestão enzimática das proteínas de interesse. Duas subdivisões são comuns para a abordagem *bottom-up*, o uso de eletroforese em gel com posterior digestão *in gel* das proteínas separadas pela massa molar e ponto isoelétrico; e o uso de digestão em solução de um extrato proteico. Nesta última abordagem, também conhecida *shotgun* (proteômica de espingarda em tradução literal), a análise pode ser direta ou indireta (GALLARDO; ORTEA; CARRERA, 2013; ORTEA; O'CONNOR; MAQUET, 2016).

A análise indireta comumente é realizada por cromatografia líquida acoplada a analisador de massas de triplo tempo de voo (LC-Triple-TOF, do inglês *Liquid Chromatography-Triple-Time of Flight Mass Spectrometry*), sendo relativamente de fácil execução, sendo conhecida também como proteômica não-direcionada. Entretanto, apresenta como principal desvantagem o fato de não proporcionar informações detalhadas acerca das proteínas presentes nas amostras. A análise direta, ou direcionada, é usualmente executada pelo método de monitoramento de reação selecionada (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*), utilizando espectrômetro de massas (BÖHME et al., 2019; ORTEA; O'CONNOR; MAQUET, 2016). O fluxograma de execução do método SRM compreende: a extração das proteínas → digestão enzimática → separação dos peptídeos por HPLC → ionização dos peptídeos separados → determinação das massas no espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-QqQ-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography-Triple quadrupole-Mass Spectrometry*) é utilizado pois apresenta seletividade e sensibilidade apropriadas para este tipo de análise (VIDOVA; SPACIL, 2017).

Por outro lado, a abordagem *top down* se baseia na caracterização dos peptídeos produzidos pela fragmentação de proteínas intactas diretamente no interior do espectrômetro

de massas, sem a realização da etapa de digestão enzimática. Essa abordagem é possível devido à alta precisão dos novos espectrômetros de massa de alta resolução, embora esta abordagem represente como desvantagem a limitação dos equipamentos para analisar proteínas intactas (GALLARDO; ORTEA; CARRERA, 2013).

Independentemente da abordagem empregada, a análise proteômica é uma estratégia importante para autenticação de alimentos com poucos estudos disponíveis para méis, até o presente momento. Sendo assim, a análise proteômica de mel de melato de bracinga será realizada neste trabalho, visando a identificação de um marcador de autenticidade, inexistente até o presente momento.

## CAPÍTULO II

### QUIMIOMETRIA APLICADA À SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) POR HPLC-DAD

As informações deste capítulo foram publicadas em:

SILVA, B.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Simplex-centroid design and Derringer's desirability function approach for simultaneous separation of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys by HPLC/DAD. **Journal of Chromatography A**, v. 1585, p. 182–191, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.072>



## RESUMO

Este estudo propõe um método cromatográfico rápido e robusto para separação simultânea de 18 compostos fenólicos previamente identificados em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) por HPLC-DAD. Foram empregados o planejamento Simplex-Centroide, um delineamento composto central rotacional e a *desirability function* de Derringer e Suich, para otimização simultânea das respostas, sendo que os parâmetros estudados foram a composição da fase móvel, a vazão e a temperatura do forno da coluna com o objetivo de separar todos os compostos fenólicos. Estas estratégias multivariadas foram eficientes na determinação das condições ideais de separação, sendo que foram avaliadas como respostas as resoluções entre os pares de pico e tempo de corrida. Os 18 picos foram separados em 25 min e o gradiente da fase móvel iniciou com 1,6% de MeOH, 3,3% de ACN, 1,0% de THF e 94,1% de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, alterados para 10,0% de MeOH, 33,3% de ACN, 6,0% de THF e 50,7% de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, com temperatura do forno de 33 °C e vazão de fase móvel de 0,73 mL min<sup>-1</sup>. O método foi validado de acordo com as recomendações da Eurachem e a avaliação dos parâmetros confirmaram a confiabilidade nos resultados gerados. O método validado foi aplicado na determinação de compostos fenólicos em 18 amostras de mel de melato de bracatinga do Estado de Santa Catarina, Brasil.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos. Delineamento experimental. Simplex-Centróide. Separação cromatográfica. Otimização simultânea de respostas.

## ABSTRACT

This study presented a fast and robust chromatographic method for the simultaneous separation of 18 phenolic compounds previously identified in bracatinga honeydew honey (*Mimosa scabrella* Bentham) by HPLC-DAD. Simplex-Centroid design, a central composite rotational design and the Derringer's desirability function were used for the experimental optimization. The parameters mobile phase composition, flow rate and temperature of the column oven were studied aiming the separation of all phenolic compounds. These multivariate strategies were efficient in determining the ideal separation conditions, and the resolutions between the peak pairs plus running time were evaluated as responses. The 18 peaks were separated in 25 min, and the gradient of the mobile phase started with 1.6% MeOH, 3.3% ACN, 1.0% THF and 94.1% 0.1% formic acid, changing for 10.0% MeOH, 33.3% ACN, 6.0% THF and 50.7% 0.1% formic acid. Column oven temperature of 33 °C and mobile phase flow rate of 0.73 mL min<sup>-1</sup> were used. The method was validated according to the Eurachem guidelines, and the results confirmed the reliability. The validated method was applied to determine phenolic compounds in 18 samples of bracatinga honeydew honey from Santa Catarina, Brazil.

**Keywords:** Phenolic compounds. Experimental design. Simplex-Centroid. Chromatographic separation. Simultaneous response optimization.

## 1. INTRODUÇÃO

É estabelecido que compostos fenólicos desempenham papéis importantes devido a sua capacidade de desempenhar atividades antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, entre outras (MAJTAN et al., 2011; MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016; SERAGLIO et al., 2016; VILLAVICENCIO et al., 2018). Tal fato tem impulsionado o interesse na investigação destes compostos em méis, refletindo a preocupação crescente e atual da população no que diz respeito às propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos.

Os compostos fenólicos são os mais explorados em méis, tanto por suas propriedades biológicas quanto pelo fato de serem considerados marcadores de origem do mel (DIAS et al., 2016). Alguns autores relataram que méis de melato tem maior quantidade de compostos fenólicos quando comparados aos méis florais (ESCRICHE et al., 2014; HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016), contudo, poucos estudos exploraram o perfil de compostos fenólicos em méis de melato (FLORES; ESCUREDO; SEJO, 2015), principalmente o de bracatinga. Até o presente momento, apenas um estudo publicado por Seraglio et al. (2016) identificou a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e aldeídos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.).

Nesta perspectiva, a cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica de separação mais empregada na determinação de compostos fenólicos em méis, comumente acoplada a detectores de UV-Visível, arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) e de espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (CAN et al., 2015; NAYIK; NANDA, 2016; SERAGLIO et al., 2016). O custo elevado dos espectrômetros de massas reflete o amplo uso de detectores DAD. Por outro lado, os longos tempos de corridas apresentados pelos métodos cromatográficos desenvolvidos para identificação de compostos fenólicos em mel por DAD, estão entre as principais limitações. A exemplo dos estudos em diferentes méis, destaca-se os publicados por Escriche et al. (2014), que analisaram 10 compostos fenólicos em 60 minutos de corrida cromatográfica; Haroun et al. (2012), que determinaram 15 compostos no tempo de 95 minutos; Nayik; Nanda (2016) que identificaram 13 compostos fenólicos em 55 minutos; Silici; Sarioglu; Karaman (2013) que identificaram 9 compostos em 60 minutos; e Socha et al. (2011) que identificaram apenas 6 compostos em 60 min.

Em sistemas cromatográficos, diversos parâmetros podem afetar a separação de compostos, principalmente a composição e fluxo de fase móvel, a fase estacionária, o pH e a temperatura da coluna (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009). Uma vez que, amostras de mel geralmente envolvem a presença de um grande número de compostos fenólicos, é desejável

uma separação cromatográfica que alie resolução adequada e reduzidos tempos de corrida. Desta maneira, se torna imprescindível o emprego de ferramentas quimiométricas durante o desenvolvimento do método, como por exemplo, os planejamentos experimentais. Estes compreendem técnicas de otimização, amplamente utilizadas para a escolha de variáveis que influenciam um determinado processo (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009). Dentre as vantagens do emprego de planejamentos experimentais, destacam-se a economia de tempo e o fato de que todas as variáveis analisadas são tratadas com igual importância. O processo de otimização deve levar em consideração todas as separações cromatográficas críticas simultaneamente (BALLUS et al., 2011).

Na literatura, vários estudos promoveram a separação de substâncias em diversos alimentos, com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência e aplicação de diferentes combinações de planejamentos fatoriais, tais como os fatoriais completo e fracionário e alguns mais complexos, como o Box-Behnken, o Doehlert e os planejamentos de mistura, como o Simplex-Centroide (BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009; DEMIAN; MAKRIS, 2013; GARAI, 2017; GROSSO et al., 2014; SIVAKUMAR et al., 2007; SKENDI; IRAKLI; CHATZOPOULOU, 2017). Contudo, não existem ainda relatos, até o momento, de uso de quimiometria aplicada à separação cromatográfica de compostos fenólicos em méis de melato.

Neste contexto, a proposta deste estudo foi desenvolver um método cromatográfico (HPLC-DAD) para a separação de compostos fenólicos em amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). A fim de encontrar as melhores condições de separação, foram empregados o planejamento de misturas Simplex-Centroide, o delineamento composto central rotacional e finalmente a *desirability function* (descrita por Derringer e Suich, 1980) para otimização das múltiplas respostas. Após a otimização, o método foi validado de acordo com as recomendações da Eurachem e aplicado na determinação de compostos fenólicos em 18 amostras de mel de melato de bracatinga do estado de Santa Catarina, Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e padrões

Padrões de ácidos ferúlico, siríngico, clorogênico, *p*-cumárico e cafeico, além dos flavonoides campferol, luteolina, hesperidina, coniferaldeído, naringenina, pinobanksina, rutina e isoramnetina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.). Foram também utilizados os padrões ácido benzoico (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha), ácido 3,4

dihidroxibenzóico (Acros Organic, Geel, Bélgica), quercetina (Fluka, Saint Gallen, Suíça), ácido gálico (Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e ácido salicílico (Nuclear, Diadema, São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha) e metanol (99,9%), acetonitrila (99,8%), tetraidrofurano (>99,9%), ácido fórmico ( $\geq 95,0\%$ ) e dimetilsulfóxido (DMSO) ( $\geq 99,7\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.). Os sais cloreto de sódio e sulfato de magnésio anidro foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A) e os adsorventes amina primária secundária (PSA) e C<sub>18</sub> foram adquiridos da Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, E.U.A.).

## 2.2 Preparo de soluções

Soluções padrão de compostos fenólicos foram preparadas a partir da dissolução dos padrões sólidos em metanol com exceção de isoramnetina e hesperidina, solúveis em DMSO. Soluções estoque de aproximadamente 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com exceção de pinobanksina (aproximadamente 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram armazenadas a  $-18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento das análises. Os solventes metanol, acetonitrila, tetraidrofurano e ácido fórmico 1% utilizados na fase móvel foram filtrados em membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45  $\mu\text{m}$ , e em seguidas degaseificados em ultrassom por 10 min.

## 2.3 Amostras

As amostras de mel de melato de bracinga foram coletadas e fornecidas por apicultores do estado de Santa Catarina, durante a safra de 2016, e estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Origem geográfica e data de coleta das amostras de mel de melato de bracinga.

Código	Cidade	Data de coleta	Código	Cidade	Data de coleta
BS1	Bocaina do Sul - SC	03/2016	SJ1	São Joaquim - SC	06/2016
BS2	Bocaina do Sul - SC	03/2016	SJ2	São Joaquim - SC	06/2016
BS3	Bocaina do Sul - SC	03/2016	SJ3	São Joaquim - SC	10/2016
BR1	Bom Retiro - SC	04/2016	UB1	Urubici - SC	05/2016
BR2	Bom Retiro - SC	08/2016	UB2	Urubici - SC	05/2016
BR3	Bom Retiro - SC	08/2016	UB3	Urubici - SC	04/2016
LG1	Lages - SC	04/2016	UP1	Urupema - SC	04/2016
LG2	Lages - SC	05/2016	UP2	Urupema - SC	05/2016
LG3	Lages - SC	08/2016	UP3	Urupema - SC	05/2016

Fonte: o próprio autor (2019).

Os favos ou fragmentos de favos de mel foram acondicionados em embalagens plásticas previamente identificadas e transportados ao Laboratório de Química de Alimentos em caixas térmicas, com temperatura de aproximadamente 5 °C, imediatamente após a sua coleta. As amostras foram drenadas manualmente dos favos e coletadas em tubos de polipropileno. Em seguida, foram centrifugadas a 450 g por 10 min (Fanem, 280R, São Paulo, Brasil) e armazenadas sob congelamento ( $-18 \pm 2$  °C) para as análises subsequentes.

#### 2.4 Instrumento e condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo 1260, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.A.), acoplado a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) utilizando coluna Zorbax Poroshell 120 C<sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm d.i., tamanho da partícula de 2,7 µm). O gradiente de fase móvel foi constituído por ácido fórmico 0,1% (A), metanol (B), acetonitrila (C) e tetraidrofurano (D), variando de 94,1% (A), 1,6% (B), 3,3% (C) e 1,0% (D) em 0 min de corrida até 50,7% (A), 10,0% (B), 33,3% (C) e 6,0% (D) em 25 min de corrida. O fluxo foi de 0,73 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi mantida em 33 °C e o volume de injeção de amostra de 3 µL.

A detecção de compostos fenólicos foi realizada de acordo com os respectivos espectros de absorção máxima, sendo: em 240 nm para os ácidos benzóico e salicílico; 260 nm para o ácido 3,4-dihidroxibenzóico, rutina, luteolina e quercetina; 280 nm para ácido gálico, ácido siríngico, hesperidina e naringenina; 300 nm para pinobanksina e ácido *p*-cumárico; 325 nm para coniferaldeído e ácidos cafeico, clorogênico e ferúlico; 370 nm para campferol e isoramnetina.

#### 2.5 Planejamento experimental Simplex-Centroides

O planejamento de misturas do tipo Simplex-Centroides foi utilizado para definir a proporção ideal dos solventes orgânicos para a composição da fase móvel do sistema cromatográfico. Foram avaliados os solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e tetraidrofurano (THF) em fase aquosa (água acidificada com 0,1% de ácido fórmico) com forças cromatográficas iguais.

O planejamento abrangeu pontos axiais (os últimos três pontos), compreendendo solução aquosa de três solventes puros: MeOH, ACN e THF, três misturas binárias de solventes

orgânicos e quatro misturas ternárias diferentes, totalizando dez sistemas que foram injetados em duplicata em ordem aleatória. A matriz está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Matriz do planejamento Simplex-Centroide para otimização de fase móvel.

	Níveis codificados			Níveis reais (%)		
	MeOH	ACN	THF	MeOH	ACN	THF
1	1	0	0	10	0	0
2	0	1	0	0	5	0
3	0	0	1	0	0	6
4	0,5	0,5	0	5	2,5	0
5	0,5	0	0,5	5	0	3
6	0	0,5	0,5	0	2,5	3
7	0,33	0,33	0,33	3,3	1,6	2
8	0,66	0,17	0,17	6,7	0,8	1
9	0,17	0,66	0,17	1,6	3,3	1
10	0,17	0,17	0,66	1,6	0,8	4

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

A temperatura do forno foi fixada em 35 °C considerando os pontos de ebulição dos três solventes orgânicos (MeOH, 65 °C; ACN, 82 °C; THF, 66 °C); a taxa de fluxo foi de 0,7 mL min<sup>-1</sup> e o tempo de corrida 35 min para os dez sistemas. As soluções padrão foram dissolvidas na respectiva fase móvel de cada um dos dez sistemas (100 µL de solução padrão + 900 µL de fase móvel, concentração final de cada analito de aproximadamente 10 µg mL<sup>-1</sup>). A resposta considerada no planejamento foi a resolução (Rs) entre os pares de picos adjacentes co-eluídos em pelo menos uma das condições do planejamento experimental analisadas, calculadas de acordo com a Equação 4:

$$R_s = \frac{2 (tr_2 - tr_1)}{L_2 + L_1} \quad \text{Eq. 4}$$

em que  $tr_1$  e  $tr_2$  são tempos de retenção e  $L_1$  e  $L_2$  são as larguras das bases do par de picos adjacentes. Resoluções acima de 1,25 foram consideradas aceitáveis. Os modelos foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% utilizando o programa Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK, E.U.A.). As condições ótimas para separar os 18 compostos fenólicos foram determinadas examinando os coeficientes do modelo.

## 2.6 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Após a definição da fase móvel, a partir do planejamento experimental Simplex-Centroide, os parâmetros taxa de fluxo e temperatura do forno da coluna foram avaliados através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) com adição de quatro pontos axiais e três repetições do ponto central, conforme apresentado na Tabela 3, resultando em onze tratamentos, que foram injetados no cromatógrafo em ordem aleatória.

**Tabela 3.** Matriz do DCCR para otimização de fluxo de fase móvel e temperatura da coluna.

	Níveis codificados		Níveis reais	
	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)
1	-1	-1	0,50	30,0
2	1	-1	0,90	30,0
3	-1	1	0,50	40,0
4	1	1	0,90	40,0
5	-1,41	0	0,41	35,0
6	1,41	0	0,98	35,0
7	0	-1,41	0,70	27,9
8	0	1,41	0,70	42,1
9	0	0	0,70	35,0
10	0	0	0,70	35,0
11	0	0	0,70	35,0

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

O tempo de corrida foi definido como o tempo necessário para a eluição do último composto do sistema com menor taxa de fluxo, neste caso, o sistema 5 (menor taxa de fluxo, tempo de corrida maior). As soluções padrão foram dissolvidas na fase móvel otimizada previamente pelo planejamento Simplex-Centroide. A resposta foi considerada a resolução (Rs) (Eq. 4) entre pares de picos adjacentes que coeluíram em pelo menos uma das condições do DCCR, além do tempo de corrida que também foi considerado como resposta de interesse. Resoluções acima de 1,25 foram consideradas aceitáveis. Os modelos foram avaliados por ANOVA ao nível de confiança de 95% utilizando o programa Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK, E.U.A.).

## 2.7 Otimização simultânea de múltiplas respostas

A melhor condição em relação aos experimentos de modelagem para separar os 18 compostos fenólicos com resolução aceitável foi otimizada simultaneamente pela *desirability*



*function*, descrita por Derringer e Suich (1980). Os valores desejáveis foram estabelecidos para cada uma das respostas individuais e combinados em sua função de desejabilidade global, com auxílio do programa Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK, E.U.A.).

Os valores desejáveis individuais foram definidos para maximizar as resoluções e para minimizar o tempo de corrida. Para a maximização das resoluções foram empregadas as Equações 5, 6 e 7:

$$d_i = 0 \text{ se } R_i < R_{\min} \quad \text{Eq. 5}$$

$$d_i = \frac{R_i - R_{\min}}{R_{\text{alvo}} - R_{\min}} \text{ se } R_{\min} < R_i < R_{\text{alvo}} \quad \text{Eq. 6}$$

$$d_i = 1 \text{ se } R_i > R_{\text{alvo}} \quad \text{Eq. 7}$$

onde  $d_i$  é a desejabilidade individual,  $R_i$  são os valores individuais de resolução entre os pares de picos previstos a partir do modelo estatístico,  $R_{\min}$  é a resolução mínima dentre os experimentos do DCCR e  $R_{\text{alvo}}$  é o valor alvo para resolução. Para maximização,  $R_{\min}$  foi estabelecida como 1,25 para todos os pares de picos, que proporciona boa separação entre eles. O valor de  $R_{\text{alvo}}$  foi considerado a maior resolução observada experimentalmente para cada par de picos no DCCR, o que significa que qualquer resolução calculada não deve ser inferior a 1,25 nem superior a resolução máxima obtida experimentalmente. Para a maximização do tempo de corrida foi considerado, de acordo com as Equações 8, 9 e 10:

$$d_i = 1 \text{ se } t_i < t_{\text{alvo}} \quad \text{Eq. 8}$$

$$d_i = \frac{t_i - t_{\max}}{t_{\text{alvo}} - t_{\max}} \text{ se } t_{\max} < t_i < t_{\text{alvo}} \quad \text{Eq. 9}$$

$$d_i = 0 \text{ se } t_i > t_{\max} \quad \text{Eq. 10}$$

onde  $d_i$  é a desejabilidade individual,  $t_i$  são os valores de tempo de corrida previstos a partir do modelo estatístico,  $t_{\max}$  é o tempo de corrida máximo do DCCR e  $t_{\text{alvo}}$  é o valor alvo para o tempo de corrida. Para minimização,  $t_{\text{alvo}}$  foi estabelecido como o tempo mínimo de execução observado experimentalmente no DCCR e  $t_{\max}$  a média dos valores de tempo de corrida.

A condição indicada pela *desirability function* para separação dos 18 pares de picos de compostos fenólicos foi submetida a uma verificação experimental, realizada em três réplicas independentes. Em seguida foram calculados o fator de retenção (Equação 11), o coeficiente de separação (Equação 12), e a resolução (Equação 4) (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006):

$$k = \frac{tr_c - tr_s}{tr_c} \quad \text{Eq. 11}$$

em que  $tr_c$  é o tempo de retenção do composto e  $tr_s$  é o tempo de retenção do solvente, ou tempo morto;

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Eq. 12}$$

em que:  $k_2$  e  $k_1$  são os fatores de retenção dos compostos 2 e 1.

## 2.8 Extração de compostos fenólicos

O método de QuEChERS foi utilizado para extração de compostos fenólicos (FONTANA; BOTTINI, 2014). Em um tubo de centrífuga, 5 g de mel foram adicionados de 4 mL de acetonitrila acidificada (ácido fórmico 1%) e a mistura agitada em agitador de tubos do tipo vórtex por 1 min. Para a separação de fases, 1,0 g de NaCl e 4 g de MgSO<sub>4</sub> foram adicionados e os tubos agitados em vórtex por 1 min. Após centrifugação por 5 min a 2800 g, alíquota de 2 mL de fase orgânica foi recolhida e transferida para um novo tubo de centrífuga. Para a etapa de limpeza, 150 mg de CaCl<sub>2</sub>, 50 mg de PSA e 50 mg de C<sub>18</sub> foram adicionados e a mistura agitada em vórtex por 30 s a 2800 g. Uma alíquota de 400 µL de extrato foi evaporada sob corrente de nitrogênio e reconstituída em fase móvel para análise por HPLC-DAD (SILVA et al., 2019a).

## 2.9 Validação analítica

### 2.9.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros utilizados para avaliar a conformidade do sistema foram a repetibilidade das áreas dos picos cromatográficos, a resolução dos picos e o fator de retenção de cada

composto, verificados por meio de dez injeções consecutivas de solução padrão, considerando o coeficiente de variação (%) das médias das injeções para cada medição.

### 2.9.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) e quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) foram determinados pela injeção de soluções padrão em ordem decrescente de concentração, considerando o LOD a relação 3:1 entre o sinal analítico de interesse e o sinal da amostra do branco (ruído), e o LOQ, a relação 10:1 entre o sinal analítico e o ruído (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

### 2.9.3 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de curvas de calibração de solução padrão preparadas em três réplicas independentes, contendo no mínimo seis níveis de concentração (apresentados na sessão de Resultados e discussão) distribuídos de forma equidistante, injetados aleatoriamente (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi utilizado para estimativa dos parâmetros das curvas de calibração. Pela análise de regressão linear e do gráfico de resíduos foi verificada visualmente a presença de pontos discrepantes (*outliers*), e os pontos suspeitos foram confirmados através do teste de Grubbs (GRUBBS, 1969). A fim de verificar o atendimento as premissas referentes ao MMQO, os resíduos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, homocedasticidade pelo teste de Cochran (COCHRAN, 1941), independência pelo teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1971), e o ajuste ao modelo linear foi feito empregando o teste  $F$ .

### 2.9.4 Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por meio da adição de padrão na amostra de mel de melato de bracinga UP1, proveniente da cidade de Urupema, por não haver uma matriz isenta dos compostos fenólicos de interesse. Foram construídas curvas de calibração em extratos da matriz nas mesmas faixas de concentração utilizadas para as curvas de solvente. A avaliação do efeito de matriz se deu pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas de solução padrão e de matriz para todos os compostos, através da aplicação dos testes  $F$  e  $t$ . Em caso de teste  $F$  não significativo ( $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ ), a matriz não afeta

a precisão do método na faixa de trabalho avaliada. Em caso de teste  $F$  significativo ( $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ ), o teste  $t$  deve ser aplicado para avaliar as diferenças entre as variâncias e se  $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$  considera-se que a matriz não afeta a precisão do método (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

### 2.9.5 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela determinação do fator de pureza dos picos de interesse nas amostras de mel de melato de bracinga. O limite do fator de pureza foi estabelecido em 990, com o uso do *software* ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara – USA). Valores acima de 990 indicam que os espectros são semelhantes. Os valores entre 900 e 990 indicam que há alguma semelhança, e abaixo de 900 indicam que os espectros são diferentes (PADILHA et al., 2017). O fator de correspondência representa o grau de semelhança entre dois espectros, e é calculado através da Equação 13:

$$FC = \frac{10^3 \cdot \left\{ \sum x \times y - \left( \frac{\sum x \times \sum y}{n} \right) \right\}^2}{\left\{ \sum x^2 - \left( \frac{\sum x \times \sum x}{n} \right) \right\} \cdot \left\{ \sum y^2 - \left( \frac{\sum y \times \sum y}{n} \right) \right\}} \quad \text{Eq. 13}$$

em que FC é o fator de correspondência;  $x$  e  $y$  são as absorvâncias do primeiro e segundo espectro, respectivamente, com o mesmo comprimento de onda;  $n$  é o número de pontos de dados e  $\Sigma$  é a soma dos dados.

### 2.9.6 Precisão

A precisão intra-ensaio foi determinada pelo coeficiente de variação entre as áreas dos picos das soluções padrão injetadas no mesmo dia em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto) das curvas de calibração preparadas em triplicata. A precisão inter-ensaio foi determinada através do coeficiente de variação entre as áreas dos picos das soluções padrão injetadas em três dias diferentes nos mesmos níveis de concentração, as mesmas avaliadas para a precisão intra-ensaio.

### 2.9.7 Exatidão

A exatidão foi determinada pela recuperação aparente de amostras fortificadas em três níveis de concentração, 3, 5 e 10 vezes o LOQ, em três réplicas independentes, injetadas aleatoriamente. A porcentagem de recuperação foi calculada através da Equação 14:

$$\% \text{ Rec} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad \text{Eq. 14}$$

em que  $C_1$  é a concentração da amostra fortificada;  $C_2$  é a concentração da amostra não fortificada e  $C_3$  é a concentração de padrão adicionado na fortificação.

### 2.9.8 Robustez

Para a determinação da robustez do método foi empregado o método de *Youden*. Sete parâmetros analíticos foram selecionados para avaliação, e pequenas variações foram induzidas nos valores nominais de cada um destes parâmetros, conforme apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros analíticos e suas variações aplicadas para avaliação da robustez do método cromatográfico.

<b>Parâmetro analítico</b>	<b>Valor nominal</b>	<b>Valor alterado</b>
Temperatura da coluna (°C)	32,9	32,5
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,728	0,750
Volume de injeção (µL)	3,0	3,5
Comprimento de onda (nm)	-*	+ 2 nm**
Tempo de equilíbrio da coluna (min)	4,0	4,5
Concentração de ácido fórmico na fase móvel A (%)	0,10	0,08
Proporção de água na fase móvel de diluição (%)	94,1	91,0

\*240, 260, 280, 300, 325 e 370 nm. \*\*adicionar 2 nm em cada um dos comprimentos de onda.

Fonte: o próprio autor (2019).

A combinação de parâmetros resultou em oito ensaios realizados para determinar a influência de cada um no resultado. Uma amostra de mel de melato de bracinga fortificada, preparada em três réplicas independentes, foi injetada no sistema cromatográfico em cada uma das combinações apresentadas na Tabela 5. Para cada combinação foram avaliadas as áreas dos picos, a resolução dos picos e o fator de retenção de cada composto.

**Tabela 5.** Delineamento experimental dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.

Parâmetro analítico	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura da coluna (°C)	A	A	A	A	a	a	a	a
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	B	B	b	b	B	B	b	b
Volume de injeção (µL)	C	c	C	c	C	c	C	c
Comprimento de onda (nm)	D	D	d	d	d	d	D	D
Tempo de equilíbrio da coluna (min)	E	e	E	e	e	E	e	E
Concentração de AF na fase móvel A (%)	F	f	f	F	F	f	f	F
Proporção de água na fase móvel de diluição (%)	G	g	g	G	g	G	G	g
Condição resultante	s	t	u	v	w	x	y	z

AF, ácido fórmico. Letras maiúsculas indicam condições nominais e letras minúsculas indicam condições alteradas.

Fonte: o próprio autor (2019).

A média dos valores nominais foi subtraída da média dos valores alterados, para cada um dos sete parâmetros analíticos estudados, conforme a Equação 15. Para avaliar as diferenças nas respostas após as alterações, foi aplicado o teste *t* para todos os analitos e parâmetros estudados.

$$P/p = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad \text{Eq. 15}$$

em que P/p se referem ao efeito de cada um dos sete parâmetros.

## 2.10 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em três réplicas independentes e os resultados expressos como média ± desvio padrão ou coeficiente de variação. O intervalo de confiança de 95% foi adotado para todas as análises relativas à otimização e validação do método. As análises foram realizadas com auxílio do programa Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK, E.U.A.) e Microsoft Excel 2010 através de análise de variância (ANOVA) e teste *t-Student* ou teste de *Tukey* para comparação das médias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Experimentos antecedentes ao planejamento experimental

O método proposto contemplou 18 compostos fenólicos de diferentes classes, encontrados em mel de melato de bracatinga em estudo publicado por Seraglio et al. (2016), cujas estruturas químicas podem ser observadas no Apêndice A.

Os experimentos preliminares deste trabalho demonstraram que a composição da fase móvel exerceu forte influência na seletividade do método para separação dos compostos fenólicos. Partindo desta observação, primeiramente foi otimizada a composição de fase móvel.

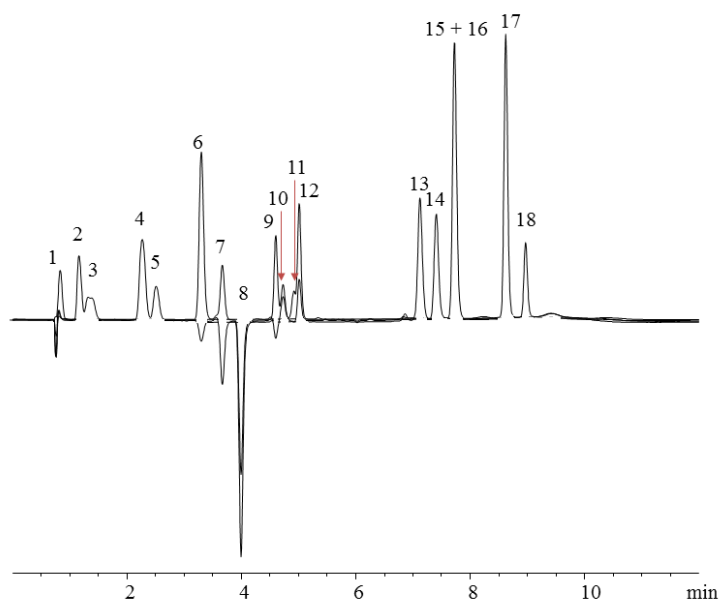
A força cromatográfica ótima para a separação comumente é selecionada empiricamente, por tentativa e erro, com os experimentos iniciais utilizando uma fase móvel de força cromatográfica elevada, de modo que todos os compostos eluam com tempo de retenção semelhante ao de um composto não retido, ou seja, o chamado tempo morto ( $t_m$ ). Em seguida, diminui-se a força cromatográfica da fase móvel até alcançar um resultado de fator de retenção aceitável para todos os analitos (MEYER, 2010). O MeOH (fase móvel B) foi empregado nos experimentos iniciais, e foi escolhido considerando seu vasto uso na composição de fases móveis em métodos cromatográficos. A fase móvel A correspondeu à água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico.

Para determinar a quantidade ideal de MeOH em fase aquosa, corridas subsequentes, com o aumento gradativo da quantidade inicial de 10% foram realizadas para encontrar a relação MeOH:ácido fórmico 0,1% que proporcionasse eluição e separação aceitável dos 18 compostos fenólicos. Para estes ensaios, a temperatura do forno da coluna foi mantida em 35 °C e a taxa de fluxo em 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Não existe regra a respeito da influência da temperatura em separações por cromatografia líquida de alta eficiência, mas de forma geral, o aumento da temperatura frequentemente aumenta o desempenho da coluna, pois diminui a viscosidade da fase móvel, o que facilita a transferência de massas, e ainda diminui o tempo de análise devido a possibilidade de uso de vazões maiores, decorrente do aumento do coeficiente de difusão (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A temperatura de 35° C ainda é compatível com o ponto de ebulição do MeOH, de 65 °C. Para evitar vazamentos e o desgaste da coluna é preferível usar pressões mais baixas, o que representa fluxos menores, sendo que 0,7 mL min<sup>-1</sup> atendeu a estas premissas e pode evitar a sobreposição dos picos.

O gradiente variando de MeOH:ácido fórmico 0,1% 10:90 (v/v) até MeOH:ácido fórmico 0,1% 60:40 (v/v) promoveu a eluição de todos os compostos. O tempo final de corrida foi de 12 min, porém, os compostos apresentaram, no geral, baixa resolução, sendo que esta

característica não confere confiabilidade aos resultados relacionados à quantificação dos compostos. Além disso, pinobanksina e luteolina coeluíram-se totalmente. O cromatograma de eluição dos compostos fenólicos está apresentado na Figura 1.

**Figura 1.** Cromatograma de eluição de compostos fenólicos obtido por HPLC-DAD (260, 300 e 325 nm) usando MeOH como modificador orgânico.



Legenda - 1, ácido gálico; 2, ácido 3,4 dihidroxibenzóico; 3, ácido clorogênico; 4, ácido cafeico; 5, ácido siríngico; 6, ácido *p*-cumárico; 7, ácido ferúlico; 8, coniferaldeído; 9, rutina; 10, ácido benzoico; 11, ácido salicílico; 12, hesperidina; 13, quercetina; 14, naringenina; 15, pinobanksina; 16, luteolina; 17, campferol; 18, isoramnetina. Condições cromatográficas – volume de injeção: 0,3  $\mu$ L; temperatura da coluna: 35  $^{\circ}$ C; fluxo de fase móvel: 0,7 mL  $\text{min}^{-1}$ ; gradiente de fase móvel: 0 min, 10% MeOH e 90% ácido fórmico 0,1%, 12 min, 60% MeOH e 40% ácido fórmico 0,1%,  
Fonte: o próprio autor (2019).

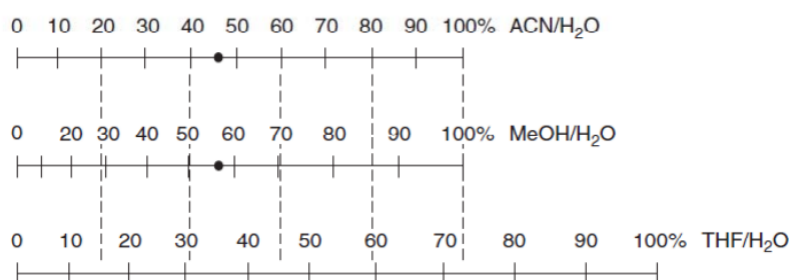
Menores tempos de retenção foram observados para os ácidos fenólicos com no mínimo dois grupamentos hidroxila; ou uma hidroxila e uma metila ligadas ao anel aromático, a saber: ácidos gálico, 3,4 dihidroxibenzóico, clorogênico, siríngico, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico, seguidos do aldeído fenólico coniferaldeído. Os ácidos de estrutura mais simples, com apenas uma hidroxila ligada ao anel aromático, benzoico e salicílico, eluem na sequência, entre os flavonoides glicosídeos rutina e hesperidina. A eluição destes quatro compostos representou o ponto crítico durante o desenvolvimento do método de separação, pois o uso do MeOH não conferiu seletividade eficiente para uma separação aceitável desses analitos, independentemente das diversas condições de gradiente, fluxo e temperatura testadas.



Com tempos de retenção maiores, os flavonoides agliconas apresentaram um padrão de eluição na seguinte ordem: quercetina, classificada como flavonol, naringenina e pinobanksina, ambos flavanonas, luteolina, campferol e isoramnetina, todos flavonóis. A eluição das flavanonas representou o segundo ponto crítico do método de separação, com coeluição entre os compostos pinobanksina e luteolina. Embora tenha sido possível identificar todos os compostos coeluídos citados, todos estes pares apresentaram resoluções abaixo de 1,25, o que dificulta a integração dos picos cromatográficos para posterior quantificação dos compostos.

Na tentativa de melhorar a seletividade da separação, o MeOH foi substituído por ACN. O nomograma apresentado na Figura 2 foi utilizado para estimar a proporção de ACN correspondente a mesma força cromatográfica do MeOH, variando de 10 a 60%, correspondendo a proporção de 5 a 50% de ACN. Para estes ensaios, a temperatura do forno da coluna foi mantida em 35 °C e a taxa de fluxo em 0,7 mL min<sup>-1</sup>.

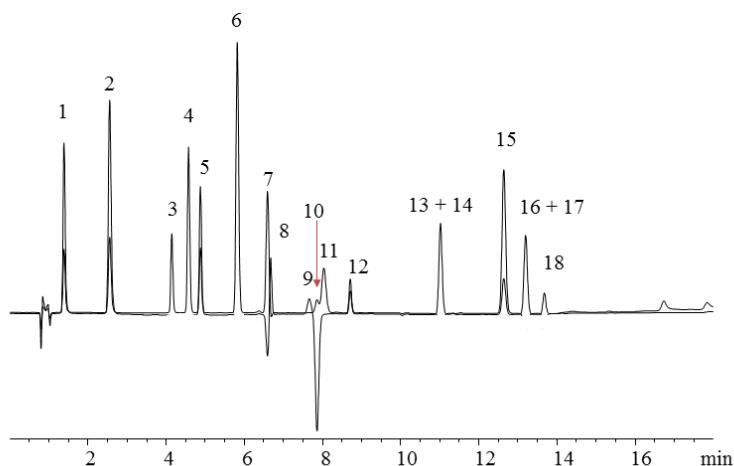
**Figura 2.** Nomograma de força de solventes para HPLC.



Fonte: Zocolo (2012).

O uso da ACN como modificador orgânico resultou em tempos de retenção maiores, o que conferiu melhor resolução entre os pares de picos em comparação com o uso do MeOH. O padrão de eluição dos ácidos fenólicos com tempos de retenção menores seguiu a mesma ordem pelo uso do MeOH (ácidos gálico, 3,4 dihidroxibenzóico, clorogênico, siríngico, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico), demonstrando que a mudança de modificador orgânico não interferiu na eluição destes compostos, porém, o ácido ferúlico coeluiu com o flavonoide rutina, como pode ser visto na Figura 3.

**Figura 3.** Cromatograma de eluição de compostos fenólicos obtido por HPLC-DAD (260, 300 e 325 nm) usando ACN como modificador orgânico.



Legenda - 1, ácido gálico; 2, ácido 3,4 dihidroxibenzóico; 3, ácido clorogênico; 4, ácido cafeico; 5, ácido siríngico; 6, ácido *p*-cumárico; 7, ácido ferúlico; 8, rutina; 9, benzoico; 10, coniferaldeído; 11, ácido salicílico; 12, hesperidina; 13, luteolina; 14, quercetina; 15, naringenina; 16, campferol; 17, pinobanksina; 18, isoramnetina. Condições cromatográficas – volume de injeção: 0,3  $\mu$ L; temperatura da coluna: 35  $^{\circ}$ C; fluxo de fase móvel: 0,7 mL  $\text{min}^{-1}$ ; gradiente de fase móvel: 0 min, 5% ACN e 95% ácido fórmico 0,1%, 12 min, 50% ACN e 50% ácido fórmico 0,1%,  
Fonte: o próprio autor (2019).

A eluição seguiu com os ácidos de estrutura simples, benzoico e salicílico, separados pelo aldeído fenólico coniferaldeído. A eluição destes três compostos representou outro ponto crítico do desenvolvimento do método usando ACN como modificador orgânico, apresentando resoluções baixas entre os pares de picos. Por sua vez os flavonoides agliconas apresentaram ordem de eluição diferenciada em comparação com o uso do MeOH, sendo: hesperidina, luteolina, quercetina, naringenina, campferol, pinobanksina e isoramnetina. Os compostos luteolina e quercetina e pinobanksina e campferol apresentaram-se totalmente coeluídos, o que foi constatado visualmente.

Podem ser observados alguns pontos principais de dificuldade de separação, tanto com MeOH quanto com ACN: a eluição dos flavonoides glicosídeos (rutina e hesperidina) e dos ácidos de estrutura simples (benzoico e salicílico) e a eluição dos flavonoides agliconas, apresentando picos deformados devido a coeluição parcial ou total entre esses analitos.

Em cromatografia, a força cromatográfica é um parâmetro que define a força de eluição do solvente quando é usado como fase móvel. Representa a energia de adsorção de uma molécula eluente por unidade de área do adsorvente usado como fase estacionária. A relação da força de diversos solventes é denominada série eluotrópica (BREITKREITZ; JARDIM;

BRUNS, 2009; MEYER, 2010), apresentada na Tabela 6 para os solventes frequentemente utilizados em fase móvel.

**Tabela 6.** Série eluotrópica das propriedades de solventes utilizados em HPLC de fase reversa.

Propriedade	Água	ACN	MeOH	THF
Força ( $\epsilon^\circ$ )	Alta	0,50	0,73	0,48
Viscosidade (mPas)	1	0,37	0,6	0,46
Absorção UV (nm)	<190	190	205	220
Ponto de ebulição ( $^\circ\text{C}$ )	100	82	65	66
Dipolo ( $\pi$ ) <sup>1</sup>	0,39	0,60	0,28	0,51
Acidez ( $\alpha$ ) <sup>2</sup>	0,43	0,15	0,43	0,00
Basicidade ( $\beta$ ) <sup>3</sup>	0,18	0,25	0,29	0,49

ACN, acetonitrila; MeOH, metanol; THF, tetraidrofurano.

<sup>1</sup>Habilidade do solvente de interagir com o soluto por forças dipolares.

<sup>2</sup>Habilidade do solvente de atuar como doador de hidrogênio para um soluto básico.

<sup>3</sup>Habilidade do solvente de atuar como receptor de hidrogênio de um soluto ácido.

Fonte: Meyer (2010).

Os parâmetros  $\pi$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  são normalizados de tal forma que a sua soma seja igual a 1,00 e, portanto, são apenas números relativos. Estes são chamados de parâmetros solvatocrômicos, e são úteis para a caracterização das propriedades de seletividade de um solvente (MEYER, 2010; SNYDER, 1974). Observando os parâmetros solvatocrômicos, pode-se observar que a ACN tem alta dipolaridade e capacidade em participar de ligações com hidrogênio reduzida, sendo mais pronunciada a habilidade de recepção de prótons em comparação com a habilidade de doação. O MeOH tem dipolaridade reduzida, mas possui habilidade de atuar tanto como doador quanto como receptor de prótons, ou seja, pode atuar através de três forças diferentes. Por fim, o THF tem alta dipolaridade e capacidade de atuar apenas como receptor de prótons.

Tendo em vista as diferentes características dos principais solventes utilizados em cromatografia e a dificuldade de separação de um número considerável de compostos apresentados, um planejamento experimental foi conduzido a fim de otimizar a fase móvel para separação dos compostos fenólicos.

### 3.2 Planejamento Simplex-Centroide

O planejamento de misturas Simplex-Centroide foi pouco relatado para otimização de mistura de fase móvel em separações cromatográficas aplicadas para alimentos. Borges et al. (2007) utilizaram para otimização de fase móvel cromatográfica para análise de *fingerprint* de chá verde e relataram que o uso do delineamento de misturas permitiu a obtenção de um número

maior de picos. Moreno-Vilet et al. (2017) estudaram as condições de análise de frutanos de agave por cromatografia líquida de exclusão, usando planejamento de misturas. Em estudos mais recentes como o de Guizzellini et al. (2018), o planejamento de misturas também foi utilizado para otimização de solvente extrator de compostos fenólicos em cultivares de café. Os autores destacaram que o etanol e suas misturas binárias foi adequado para extração de ácidos clorogênicos e que o planejamento permitiu identificar a cultivar Bourbon com uma boa fonte de compostos fenólicos. Seguindo a mesma linha de estudos Moreira; Dias (2018) também usaram o planejamento para otimização da extração de compostos fenólicos de camapu (*Physalis angulata*), e recomendaram o uso de metanol e água para a extração.

O planejamento Simplex-Centroide utilizado contemplou os três principais modificadores orgânicos usados em cromatografia líquida de alta eficiência, uma vez que foi observada a influência quando o solvente MeOH foi substituído por ACN, sendo, portanto, empregados MeOH, ACN e THF. O número de experimentos deste planejamento foi de  $2^3-1$ , onde 3 é o número de componentes da mistura (correspondentes a MeOH, ACN e THF), totalizando 7 ensaios, além da adição de 3 pontos axiais ou internos. Os dez sistemas compreenderam soluções aquosas dos três solventes puros, três misturas binárias e quatro misturas ternárias diferentes.

A condição inicial de estudo foi o gradiente relativo à fase móvel com ACN (variando de 5 a 50%, porcentagens relativas à força de fase móvel em que ocorreu a eluição de todos os compostos) e as respectivas porcentagens de MeOH e THF de acordo com o nomograma da Figura 2. Assim, a porcentagem de MeOH variou de 10 a 60% e de THF de 6 a 36%.

Em todos os sistemas estudados, ao todo 28 pares de compostos coeluíram em qualquer um destes sistemas. Os pares de compostos que apareceram ou coeluíram em apenas um dos sistemas não foram considerados, pois considerando a variação da ordem de eluição entre os sistemas, pares de compostos que aparecem coeluídos com mais frequência tendem a ter importância maior na otimização da separação. Sendo assim, 12 pares de compostos foram monitorados. Os sistemas 6 (mistura binária de ACN e THF) e 7 (mistura ternária) apresentaram maior número de pares de picos coeluídos, cinco cada um, e os demais sistemas apresentaram três ou quatro coeluições cada um. Um panorama da ordem de eluição dos compostos nos sistemas estudados está apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7.** Ordem de eluição de compostos fenólicos entre os dez sistemas do planejamento Simplex-Centroide.

<b>Sistema</b>									
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico
3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb
Clorogênico	Clorogênico	Siringico	Clorogênico	Siringico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico
Caféico	Caféico	Clorogênico	Caféico	Clorogênico	Siringico	Siringico	Siringico	Siringico	Siringico
Siringico	Siringico	Caféico	Siringico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico
Cumárico	Cumárico	Coniferald.	Cumárico	Coniferald.	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Coniferald.
Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Cumárico	Ferúlico	Coniferald.	Ferúlico	Ferúlico	Cumárico
Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Ferúlico	Coniferald.	Ferúlico	Coniferald.	Coniferald.	Ferúlico
Salicílico	Rutina	Cumárico	Salicílico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico
Coniferald.	Salicílico	Hesperidina	Coniferald.	Salicílico	Rutina	Rutina	Salicílico	Rutina	Rutina
Rutina	Coniferald.	Rutina	Rutina	Hesperidina	Hesperidina	Salicílico	Rutina	Salicílico	Hesperidina
Hesperidina	Hesperidina	Salicílico	Hesperidina	Rutina	Salicílico	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina	Salicílico
Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Pinobanksina	Luteolina	Luteolina
Pinobanksina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Naringenina	Quercetina	Quercetina	Luteolina	Quercetina	Quercetina
Naringenina	Naringenina	Pinobanksina	Pinobanksina	Pinobanksina	Naringenina	Pinobanksina	Quercetina	Pinobanksina	Naringenina
Quercetina	Pinobanksina	Naringenina	Naringenina	Quercetina	Pinobanksina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Pinobanksina
Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol
Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina	Isoramnetina
<b>Número de picos coeluídos no sistema</b>									
4	3	4	3	3	5	5	4	3	3

Ácidos fenólicos

Aldeído fenólico

Flavonoides

Fonte: o próprio autor (2019).

Os sistemas 1, 4, 5 e 8, correspondentes aos ensaios em que o MeOH encontra-se em misturas binárias com ACN e THF, ou apresenta-se em maior proporção, evidenciaram a eluição dos ácidos fenólicos com tempos de retenção menores, seguidos dos flavonoides, o que é explicado pela favorecida solubilidade de ácidos fenólicos em metanol. Nos sistemas 3, 6 e 10, correspondentes a ensaios em que o THF acha-se em maior proporção na mistura ou pertence à mistura binária com ACN, o ácido salicílico eluiu após os flavonoides glicosídeos rutina e hesperidina; enquanto nos sistemas 2, 7 e 9, correspondentes a ensaios com maior proporção de ACN ou mistura ternária dos solventes orgânicos, o ácido salicílico eluiu entre os dois flavonoides glicosídeos.

Ensaaios com maior proporção de THF como modificador orgânico (3, 5, 6 e 10) apresentaram tempos de retenção maiores para todos os analitos, e, conseqüentemente maiores tempos de corrida, resultado da menor força de eluição do THF em comparação com os solventes MeOH e ACN. Portanto, devido à diferença do perfil de eluição dos compostos entre os sistemas, o tempo de corrida foi fixado em 35 min, similar ao sistema 3, ou seja, o tempo correspondente à eluição de todos os analitos nesse sistema, sistema em que fase móvel possui apenas o THF como modificador orgânico.

A Tabela 8 apresenta as resoluções de cada par de picos de compostos fenólicos que coeluíram em qualquer um dos dez sistemas. As resoluções negativas ocorrem quando a ordem de eluição dos compostos muda de um sistema para o outro. As resoluções monitoradas estão grifadas em cinza.

**Tabela 8.** Resoluções de cada par de picos de compostos fenólicos para o planejamento Simplex-Centroide.

	<b>CLO/ SIR</b>	<b>p-CU/ FER</b>	<b>FER/ CON</b>	<b>FER/ BEN</b>	<b>BEN/ SAL</b>	<b>SAL/ CON</b>	<b>HES/ RUT</b>	<b>RUT/ SAL</b>	<b>LUT/ QUE</b>	<b>QUE/ NAR</b>	<b>PIN/ NAR</b>	<b>CAM/ ISO</b>
1	4,49	3,59	1,67	1,23	0,00	0,19	-4,31	-8,33	3,99	-3,27	0,04	2,46
2	3,54	3,27	3,50	2,30	1,10	0,21	-9,65	1,41	0,00	4,27	-0,03	2,16
3	-2,05	-1,36	-3,36	0,64	11,52	-15,70	1,28	4,25	0,00	5,71	0,00	0,00
4	4,30	3,63	3,20	2,05	0,94	0,17	-10,25	-4,33	1,44	2,12	0,11	2,46
5	-0,53	0,01	-2,10	0,02	1,86	3,79	0,18	-6,04	2,77	-0,32	-0,19	2,53
6	0,06	0,86	0,00	2,78	4,72	-7,90	-4,37	3,51	3,59	0,00	-0,23	1,20
7	0,78	1,68	-0,78	3,39	4,51	-16,40	-3,74	0,61	2,96	1,01	0,01	0,93
8	2,15	1,88	0,00	2,17	3,47	-5,58	-4,31	-4,33	0,83	1,13	2,32	0,00
9	1,48	2,23	1,46	2,68	2,73	-4,41	-7,00	0,26	1,44	3,42	1,12	1,02
10	0,91	0,13	-1,32	1,91	5,58	-9,02	-1,43	2,70	4,37	0,11	-0,01	2,45

Resolução entre pares de picos de interesse que coeluíram em qualquer uma das condições experimentais do planejamento Simplex-Centroide estão grifadas de cinza.

Compostos fenólicos: CLO, ácido clorogênico; SIR, ácido siríngico; p-CU, ácido p-cumárico; FER, ácido ferúlico; CON, coniferaldeído; BEN, ácido benzoico; RUT, rutina; SAL, ácido salicílico; HES, hesperidina; LUT, luteolina; QUE, quercetina; PIN, pinobanksina; NAR, naringenina; CAM, campferol e ISO, isoramnetina.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Não há relatos, até o momento, na literatura de um estudo de otimização de tantas variáveis em sistemas cromatográficos, sendo um desafio ainda maior alcançar a separação dos 18 compostos fenólicos. Foi possível perceber, entre todos os analitos alvo, os ácidos salicílico e ferúlico foram os mais suscetíveis a variações, com a participação em 3 coeluições, o que não pode ser justificado pela semelhança química pois o ácido salicílico é derivado do ácido hidroxibenzoico e o ácido ferúlico é derivado do ácido hidroxicinâmico. Ácido benzoico, coniferaldeído, quercetina e naringenina estiveram envolvidos em 2 coeluições cada e apenas os ácidos gálico, 3,4 dihidroxibenzoico e cafeico não estiveram envolvidos em nenhuma coeluição. Nenhum dos sistemas estudados possibilitou a completa separação de todos os compostos fenólicos.

A partir dos resultados da Tabela 8 foram calculados modelos estatísticos para cada uma das 12 respostas – resoluções calculadas para os 12 pares críticos que apresentaram coeluição. Os modelos foram avaliados pela ANOVA e na Tabela 9 estão apresentados os coeficientes significativos de cada modelo e a significância da regressão no nível de confiança de 95 %.



**Tabela 9.** Coeficientes significativos do modelo e resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão no planejamento Simplex-Centroide.

Resoluções	Coeficientes <sup>a</sup>							Regressão		
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	QM <sub>R</sub> /QM <sub>r</sub> <sup>b</sup>	F <sub>tab</sub> <sup>c</sup>	Valor de <i>p</i>
CLO/SIR	4,36*	3,26	-1,54	0,31	-6,24	-2,27	-1,20	4,52	6,94	0,122
<i>p</i> -CU/FER	3,48*	3,20*	-1,25*	0,47	-4,42	-0,27	4,16	31,95		0,008
FER/CON	1,54	3,42*	-3,10*	2,04	-4,73	0,09	-25,36	20,48		0,016
FER/BEN	1,31*	2,17*	0,63	1,04	-3,51	4,99	42,31*	14,36		0,026
BEN/SAL	0,47	1,01	11,17*	2,31	-15,35	-7,23	71,55	12,31		0,032
SAL/CON	-0,41	1,00	-15,06*	0,27	46,30	2,25	-391,46*	6,98		0,070
HES/RUT	-4,29*	-9,46*	1,05	-12,65*	6,34	-0,84	33,26	64,61		0,003
RUT/SAL	-8,17*	1,07	4,47*	-3,83	-15,26*	2,46	93,25*	40,04		0,006
LUT/QUE	3,43	-0,11	0,57	-3,54	3,12	15,29	-7,29	1,10		0,511
QUE/NAR	-2,90	4,55*	5,19*	7,77	-6,50	-20,45	33,49	4,69		0,116
PIN/NAR	0,45	0,06	-0,19	1,41	-0,39	-1,07	22,64	0,19		0,959
CAM/ISO	1,96	2,09	0,51	-0,54	5,23	1,34	-39,36	0,32		0,890

\*Coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ).

<sup>a</sup>A, metanol; B, acetonitrila; C, tetraidrofurano.

<sup>b</sup>QM<sub>R</sub>, quadrado médio da regressão; QM<sub>r</sub>, quadrado médio do resíduo.

<sup>c</sup>F tabelado para 6 graus de liberdade do quadrado médio da regressão e 3 graus de liberdade do quadrado médio do resíduo, ao nível de 95% de confiança.

Compostos fenólicos: CLO, ácido clorogênico; SIR, ácido siríngico; *p*-CU, ácido *p*-cumárico; FER, ácido ferúlico; CON, coniferaldeído; BEN, ácido benzoico; RUT, rutina; SAL, ácido salicílico; HES, hesperidina; LUT, luteolina; QUE, quercetina; PIN, pinobanksina; NAR, naringenina; CAM, campferol e ISO, isoramnetina.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Dentre as doze respostas avaliadas, cinco (correspondentes aos pares clorogênico/siringico, luteolina/quercetina, quercetina/naringenina, pinobanksina/naringenina e campferol/isoramnetina) apresentaram relação  $F_{cal}/F_{tab}$  menor que o valor a 95% de confiança, o que sugere falta de precisão dos modelos para descrever estas respostas, portanto o mesmo não pode ser usado para descrever a melhor fase móvel para estes compostos. As demais apresentaram regressão significativa e relação  $F_{cal}/F_{tab}$  maior que 6,94, variando de 1,0 a 9,3 vezes maior.

A interpretação dos coeficientes do modelo pode auxiliar no entendimento de como a eluição dos picos é afetada pela mudança dos níveis dos fatores experimentais avaliados. Com relação aos coeficientes que influenciaram significativamente cada uma das respostas, o MeOH (A) foi significativo para o aumento da resolução entre os pares clorogênico/siringico, *p*-cumárico/ferúlico e ferúlico/benzóico e a redução desta resposta entre os pares hesperidina/rutina e rutina/salicílico. Enquanto que para a ACN, seu efeito foi significativo para o aumento da resolução entre os pares *p*-cumárico/ferúlico, ferúlico/coniferaldeído, ferúlico/benzóico e quercetina/naringenina; e diminuição da resolução entre o par hesperidina/rutina. Por outro lado, o solvente THF foi significativo positivamente para a resolução entre os pares benzóico/salicílico, rutina/salicílico e quercetina/naringenina, com forte influência no aumento da resolução entre o primeiro par citado, com coeficiente de 11,17, e apresentou comportamento negativo para os pares *p*-cumárico/ferúlico, ferúlico/coniferaldeído e salicílico/coniferaldeído, com destaque para o último par, cujo coeficiente foi de -15,06.

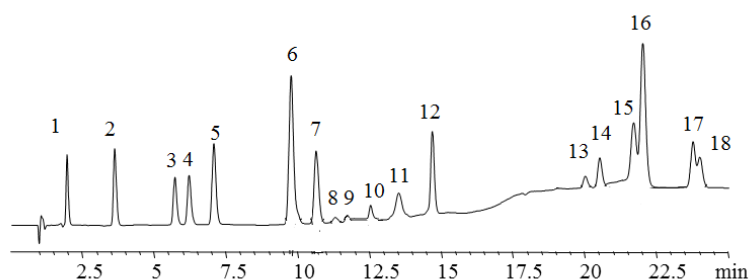
A interação entre MeOH e ACN foi significativa apenas para o par hesperidina/rutina, resultando em forte influência na diminuição da resolução deste par quando ambos solventes foram utilizados (coeficiente de -12,65). As influências observadas a partir da interação entre MeOH e THF também resultaram na resolução dos pares rutina/salicílico de forma negativa (com coeficiente de -15,26). A interação entre ACN e THF não gerou influência significativa para nenhum dos pares de analitos. A análise dos coeficientes demonstrou que todos os solventes isolados ou em misturas foram significativos para o aumento ou diminuição da resolução de pelo menos 5 dos pares de compostos.

Observou-se que três pares de compostos não tiveram suas resoluções afetadas significativamente, independentemente do tipo e quantidade de solvente utilizado na fase móvel, sendo luteolina/quercetina, pinobanksina/naringenina e campferol/isoramnetina. A diferença na estrutura química desses analitos implicou na dificuldade de se alcançar uma resposta ótima para a eluição aceitável de todos os 18 compostos fenólicos, sendo que MeOH,

ACN e THF agiram de maneira diferente na eluição de cada um dos compostos de acordo com a força cromatográfica e a polaridade de cada um, como observado na Tabela 6, que apresenta os coeficientes de cada um dos solventes. Somado a essa dificuldade, a falta de ajuste de alguns dos modelos não permitiu a otimização da fase móvel.

Além disso, nenhum dos sistemas possibilitou a separação completa de todos os 18 compostos fenólicos. Em situações como esta, o planejamento experimental é bastante útil na identificação de situações desejáveis e na varredura das melhores condições para se chegar ao resultado esperado, que, neste caso, é a separação cromatográfica dos compostos fenólicos. A checagem dos cromatogramas do planejamento Simplex-Centroides mostrou que nas condições do sistema 9 apresentado na Figura 4 (níveis codificados de MeOH = 0,16; ACN = 0,67 e THF = 0,16, vide Tabela 2), que corresponde a fase móvel composta por 1,6, 3,3 e 1% de MeOH, ACN e THF (níveis reais, calculados vide Tabela 2), respectivamente, com 94,1% de água; foi possível detectar todos os compostos, sem nenhuma coeluição total (apenas parcial) entre pares de picos adjacentes.

**Figura 4.** Cromatograma de separação de compostos fenólicos com fase móvel otimizada pelo planejamento Simplex-Centroides.



Legenda: 1, ácido gálico; 2, ácido 3,4 dihidroxibenzóico; 3, ácido clorogênico; 4, ácido siríngico; 5, ácido cafeico; 6, ácido *p*-cumárico; 7, ácido ferúlico; 8, coniferaldeído; 9, ácido benzoico; 10, rutina; 11, ácido salicílico; 12, hesperidina; 13, luteolina; 14, quercetina; 15, pinobanksina; 16, naringenina; 17, campferol; 18, isoramnetina. Condições cromatográficas – volume de injeção: 0,3  $\mu$ L; temperatura da coluna: 35  $^{\circ}$ C; fluxo de fase móvel: 0,7 mL  $\text{min}^{-1}$ ; gradiente de fase móvel: 0 min; 1,6% MeOH, 3,3% ACN, 1,0% THF e 94,1% ácido fórmico 0,1%, 25 min; 10,0% MeOH, 33,3% ACN, 6,0% THF e 50,7% ácido fórmico 0,1%.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Embora este resultado ainda apresente valores de resolução baixas ( $< 1,25$ ) para alguns pares de compostos, como rutina e ácido salicílico ( $R_s = 0,26$ ), pinobanksina e naringenina ( $R_s = 1,12$ ) e campferol e isoramnetina ( $R_s = 1,02$ ), a composição da fase móvel e o gradiente do

sistema 9 foram definidos como mais apropriados para a separação dos analitos alvo. É importante destacar que esta condição foi a melhor dentre as estudadas, e que as resoluções (mesmo de 0,26 para rutina/ácido salicílico) para os pares críticos observados, são consideradas aceitáveis para o número de compostos a serem separados juntamente com tempo final de corrida. Além disso, o estudo das condições de fluxo e temperatura podem solucionar as dificuldades encontradas até o momento.

### **3.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR)**

O estudo das melhores condições para os demais parâmetros do método cromatográfico, fluxo e temperatura do forno da coluna foi realizado após a otimização da fase móvel. Para alcançar as melhores condições, foi utilizado um delineamento composto central rotacional com as variáveis fluxo e temperatura, avaliadas em três níveis, mais os pontos axiais e centrais (resultando em  $2^2$  experimentos).

Um panorama da ordem de eluição dos compostos nos sistemas estudados é apresentado na Tabela 10. A ordem de eluição dos compostos entre os sistemas foi mais semelhante em comparação ao planejamento Simplex-Centroide, visto que a mesma fase móvel foi aplicada a todos os sistemas do DCCR. Contudo, as alterações da vazão e da temperatura da coluna provocaram algumas diferenças de eluição entre os sistemas para os compostos ácido benzoico, ácido salicílico, rutina e hesperidina. Rutina e hesperidina são os únicos glicosídeos dentre os flavonoides, por isso a eluição em tempo de retenção menor que os demais, junto aos ácidos fenólicos de estrutura química mais simples, benzoico e salicílico. A ordem de eluição dos compostos foi idêntica em 8 dos 11 sistemas, porém nos sistemas 1 e 3, a ordem de eluição de rutina e ácido benzoico foi invertida, bem como aconteceu com hesperidina e ácido benzoico nos sistemas 1 e 5. Estes sistemas são caracterizados por vazão de fase móvel menor (níveis -1,41 e -1).

**Tabela 10.** Ordem de eluição de compostos fenólicos entre os dez sistemas do DCCR.

<b>Sistema</b>										
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico	Gálico
3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb	3,4 dhb
Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico	Clorogênico
Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico	Siríngico
Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico	Caféico
Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico	Cumárico
Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico	Ferúlico
Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.	Coniferald.
Rutina	Benzóico	Rutina	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico	Benzóico
Benzóico	Rutina	Benzóico	Rutina	Rutina	Rutina	Rutina	Rutina	Rutina	Rutina	Rutina
Hesperidina	Salicílico	Salicílico	Salicílico	Hesperidina	Salicílico	Salicílico	Salicílico	Salicílico	Salicílico	Salicílico
Salicílico	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina	Salicílico	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina	Hesperidina
Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina	Luteolina
Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Quercetina
Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.	Pinobank.
Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina	Naringenina
Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol	Campferol
Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina	Isoramentina
<b>Número de picos coeluídos no sistema</b>										
2	4	3	6	4	6	6	2	3	3	4

Acidos fenólicos

Aldeído fenólico

Flavonoides

Fonte: o próprio autor (2019).

O DCCR utilizado contemplou dois dos principais parâmetros que afetam a eluição de compostos em cromatografia líquida de alta eficiência, o fluxo de fase móvel e a temperatura da coluna. A Tabela 11 apresenta as resoluções de cada par de picos de compostos fenólicos que coeluíram em qualquer um dos sistemas. Além das resoluções, o tempo final de corrida também foi considerado resposta de interesse do planejamento experimental, com vistas a minimizar seu valor por meio da otimização das condições cromatográficas. Os níveis foram escolhidos com base nos experimentos preliminares já descritos e nos ensaios do planejamento Simplex-Centroide. A presença de resoluções negativas é devido a mudança de ordem dos compostos adjacentes nos diferentes sistemas.

**Tabela 11.** Resoluções de cada par de picos de compostos fenólicos para o delineamento composto central rotacional.

	<b>CLO/ SIR</b>	<b>FER/ CON</b>	<b>p-CU/ FER</b>	<b>RUT/ SAL</b>	<b>SAL/ HES</b>	<b>BEN/ RUT</b>	<b>LUT/ QUE</b>	<b>PIN/ NAR</b>	<b>CAM/ ISO</b>	<b>tempo de corrida</b>
1	1,54	1,56	1,58	5,41	-0,91	-1,41	1,80	0,00	0,00	22,82
2	0,55	0,78	1,41	1,15	2,80	2,43	1,38	1,17	0,00	19,09
3	1,81	1,62	1,86	5,00	0,70	-0,86	1,57	0,83	0,83	21,79
4	0,98	1,03	1,94	0,63	4,62	2,74	0,53	0,60	1,08	17,98
5	2,06	0,53	2,84	1,48	-1,40	1,88	0,12	0,00	0,33	27,35
6	0,71	0,93	1,75	0,41	3,81	3,00	1,16	1,04	0,67	18,09
7	1,03	1,11	1,42	3,07	0,90	0,94	1,55	0,93	0,00	20,68
8	1,53	1,47	1,83	1,60	2,94	1,26	1,30	0,00	0,89	19,18
9	1,26	1,32	1,68	2,42	1,95	1,03	1,35	0,88	0,84	20,01
10	1,26	1,36	1,65	2,46	1,90	1,03	1,40	0,85	0,83	19,99
11	1,24	1,41	1,68	2,22	1,85	1,14	1,40	0,81	1,02	20,06

Resolução entre pares de picos de interesse que coeluíram sob qualquer uma das condições experimentais do DCCR estão grifados de cinza.

Compostos fenólicos: CLO, ácido clorogênico; SIR, ácido siríngico; p-CU, ácido p-cumárico; FER, ácido ferúlico; CON, coniferaldeído; BEN, ácido benzoico; RUT, rutina; SAL, ácido salicílico; HES, hesperidina; LUT, luteolina; QUE, quercetina; PIN, pinobanksina; NAR, naringenina; CAM, campferol e ISO, isoramnetina.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Nove pares de picos coeluíram em pelo menos um dos 11 sistemas estudados pelo DCCR. Os pares campferol/isoramnetina e pinobanksina/naringenina coeluíram em todos os sistemas estudados, seguidos pelo par ferúlico/coniferaldeído que coeluiu em 9 sistemas, o par luteolina/quercetina em 8 sistemas e o par clorogênico/sirínico em 7 sistemas. Nenhum dos sistemas propiciou separação completa de todos os compostos. O tempo médio de corrida foi de 20,6 min, sendo que os sistemas 4 e 6 apresentaram os menores tempos de corrida, devido às condições de fluxo alto e temperatura de média a alta.

A partir dos resultados da Tabela 11 foram calculados modelos estatísticos para cada uma das 10 respostas (resolução entre 9 pares de picos mais o tempo de corrida). Os modelos foram avaliados pela ANOVA e a Tabela 12 apresenta os coeficientes significativos de cada modelo e a significância da regressão e da falta de ajuste.



**Tabela 12.** Coeficientes significativos do modelo e resumo da ANOVA, considerando a significância estatística da regressão e da falta de ajuste do delineamento composto central rotacional.

Respostas <sup>a</sup>	Coeficientes <sup>b</sup>						Regressão		Falta de ajuste	
	Média	A	A <sup>2</sup>	B	B <sup>2</sup>	AB	QM <sub>R</sub> /QM <sub>r</sub> <sup>c</sup>	Valor de <i>p</i>	QM <sub>fa</sub> /QM <sub>ep</sub> <sup>d</sup>	Valor de <i>p</i>
CLO/SIR	1,25*	-0,94*	0,07*	0,35*	-0,02	0,08*	77,26	0,00	64,61	0,02
FER/CON	1,36*	-0,20*	-0,52*	0,20*	0,05	0,10	1,03	0,49	89,34	
<i>p</i> -CU/FER	1,67*	-0,41*	0,49*	0,35*	-0,18*	0,13*	2,62	0,16	662,85	0,00
RUT/SAL	2,36*	-2,54*	-0,71*	-0,75*	0,69	-0,05	1,52	0,33	205,57	0,00
SAL/HES	1,90*	3,76*	-0,58*	1,58*	0,14	0,10	205,82	0,00	25,35	0,04
BEN/RUT	1,07*	2,26*	0,85*	0,33*	-0,50*	-0,12	1,89	0,25	541,73	0,00
LUT/QUE	1,38*	0,00	-0,60*	-0,36*	0,19*	-0,31*	0,82	0,58	610,13	0,00
PIN/NAR	0,84*	0,60*	-0,24*	-0,26*	-0,30*	-0,70*	3,87	0,08	103,48	0,01
CAM/ISO	0,90*	0,18	-0,39	0,79*	-0,45*	0,13	20,87	0,00	1,60	0,41
tempo de corrida	20,02*	-5,16*	2,25*	-1,07*	-0,55*	-0,04	11,66	0,01	1424,99	0,00

\*Coeficientes significativos ( $p < 0,05$ )

<sup>b</sup>Resolução entre pares de picos que coeluíram sob qualquer uma das condições experimentais do DCCR e o tempo de corrida.

<sup>b</sup>A, fluxo; B, temperatura.

<sup>c</sup>QM<sub>R</sub>, quadrado médio da regressão; QM<sub>r</sub>, quadrado médio do resíduo;  $F_{\text{tab},95\%} = 5,05$ .

<sup>d</sup>QM<sub>fa</sub>, quadrado médio da falta de ajuste; QM<sub>ep</sub>, quadrado médio do erro puro;  $F_{\text{tab},95\%} = 19,16$ .

Compostos fenólicos: CLO, ácido clorogênico; SIR, ácido siríngico; *p*-CU, ácido *p*-cumárico; FER, ácido ferúlico; CON, coniferaldeído; BEN, ácido benzoico; RUT, rutina; SAL, ácido salicílico; HES, hesperidina; LUT, luteolina; QUE, quercetina; PIN, pinobanksina; NAR, naringenina; CAM, campferol e ISO, isoramnetina.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

A análise dos coeficientes dos modelos apresentados demonstrou que o coeficiente linear do fluxo (A) influenciou positiva e significativamente para o aumento da resolução entre os pares salicílico/hesperidina, benzóico/rutina e pinobanksina/naringenina, e negativamente para a resolução entre os pares críticos clorogênico/siríngico, ferúlico/coniferaldeído, *p*-cumárico/ferúlico, rutina/salicílico e para o tempo final de análise (coeficiente de -5,16), o que é esperado, já que fluxos menores prolongam o tempo total da análise cromatográfica. O coeficiente quadrático do fluxo (A<sup>2</sup>) revelou interferência positiva no tempo de corrida (coeficiente de 2,25), propiciando menores tempos quando são aplicadas taxas de fluxo maiores. Para os pares de compostos, o fator quadrático do fluxo atuou negativamente no aumento da resolução entre ferúlico/coniferaldeído, rutina/salicílico, salicílico/hesperidina, luteolina/quercetina e pinobanksina/naringenina, provavelmente devido à proximidade entre os picos desses analitos, o que implicaria em coeluições, caso o fluxo fosse aumentado para níveis próximos aos limites superiores avaliados.

Temperaturas menores (coeficientes lineares B) também são indesejadas para a separação entre rutina/salicílico, luteolina/quercetina, pinobanksina/naringenina, além do tempo de corrida, o qual se estendeu nessas temperaturas, como pode ser visto pelos resultados de coeficiente linear para as respostas do fator temperatura. Para o par campferol/isoramnetina, temperaturas menores influenciaram de forma positiva, com coeficiente linear de 1,06, demonstrando que para melhora da separação desses dois compostos fenólicos, o ideal seria a aplicação de fluxos e temperaturas menores. Temperaturas maiores (coeficiente quadrático B<sup>2</sup>) são indicadas para aumento da resolução entre rutina/salicílico e luteolina/quercetina, como pode ser percebido pelos seus fatores quadráticos de 0,69 e 0,19, respectivamente. A interação entre fluxo e temperatura apresentou interação positiva somente na separação entre os pares clorogênico/siríngico e *p*-cumárico/ferúlico.

Dentre as 10 respostas avaliadas, apenas o par cam/iso não apresentou evidência de falta de ajuste, com relação  $F_{cal}/F_{tab}$  menor que o valor a 95% de confiança para os graus de liberdade do quadrado médio da falta de ajuste e os graus de liberdade do quadrado médio do erro puro, o que sugere falta de precisão dos demais modelos para descrever a separação dos 8 pares e o tempo de corrida. Para estas respostas, a relação foi de 1,3 a 74,9 vezes maior que o valor a 95% de confiança. A análise da regressão mostra que 4 das 10 respostas apresentaram regressão significativa, clorogênico/siríngico, salicílico/hesperidina, campferol/isoramnetina e tempo de corrida. As demais apresentaram a relação  $F_{cal}/F_{tab}$  menor que o valor a 95% de confiança para os graus de liberdade do quadrado médio da regressão e os graus de liberdade do quadrado médio do resíduo.

Para que um modelo seja considerado adequado, o mesmo deve apresentar regressão significativa e falta de ajuste não significativa. Geralmente, uma regressão significativa equivale a inferir que a maior parte da variação total das observações deve ser descrita pela equação da regressão, e o restante, pelos resíduos. De toda a variação que é descrita pelos resíduos espera-se que o erro puro represente a maior parte, já que este equivale ao erro experimental, e não a falta de ajuste, que está diretamente relacionada com o modelo (RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

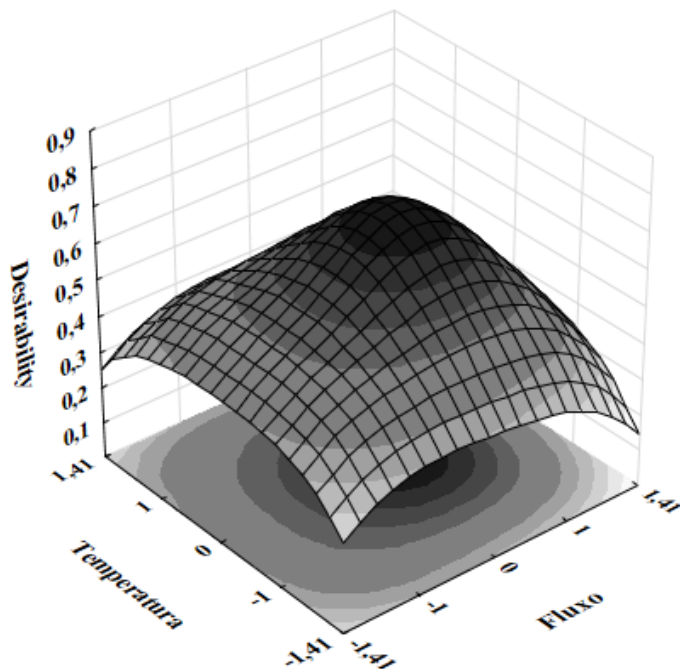
Em casos como o apresentado neste estudo, em que o modelo aparentou não ser adequado, é importante examinar a distribuição gráfica dos resíduos *versus* os valores preditos pelo modelo (Apêndice B), a fim de confirmar a aleatoriedade de sua distribuição. A partir do perfil observado nos resultados, constatou-se que a distribuição dos resíduos não se apresentou conforme o esperado para três respostas, incluindo os pares rotina/salicílico, benzóico/rutina e o tempo de corrida. Em todos os pares, o quadrado médio do erro puro (erro experimental) apresentou resultado que variou entre 0 e 0,02, porém para estes dois pares e para o tempo de corrida, o quadrado médio da falta de ajuste evidenciou valores mais elevados (rutina/salicílico = 3,49; benzóico/rutina = 2,16 e tempo de corrida = 1,85) que para as demais respostas observadas (entre 0,01 a 0,43), confirmando a falta de precisão dos modelos para descrever estas três respostas. Entretanto, como será observado a seguir, a falta de ajuste destes modelos não afetará diretamente a busca pelas condições ótimas, uma vez que a resposta tempo de corrida apresentou relação  $F_{cal}/F_{tab}$  duas vezes maior que o valor estipulado a 95% de confiança para os graus de liberdade do quadrado médio da regressão e os graus de liberdade do quadrado médio do resíduo.

Como nenhuma das condições experimentais do DCCR resultou na separação de todos os 18 compostos fenólicos, o que é perfeitamente aceitável, o próximo passo foi usar a *desirability function* de Derringer e Suich (1980) a fim de otimizar a separação, empregando os modelos para as 10 respostas de forma simultânea.

### 3.4 Otimização de múltiplas respostas

A otimização simultânea de todas as respostas foi realizada com o auxílio da *desirability function*, proposta por Derringer e Suich (1980), a qual é representada pela superfície de resposta da Figura 5.

**Figura 5.** Superfície de resposta da otimização das condições de fluxo e temperatura do método cromatográfico de separação de compostos fenólicos.



Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Todos os modelos foram combinados para a tentativa de alcançar a resolução máxima entre cada um dos pares de picos críticos e o tempo mínimo de corrida. O valor de “desejabilidade” foi de  $d = 0,62$ , e a condição indicada em níveis codificados foi: fluxo, 0,14; e temperatura, -0,42, o que correspondeu em níveis reais a  $0,728 \text{ mL min}^{-1}$  e  $32,9 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, como condições ideais para separação.

A verificação das condições indicadas foi realizada pela reprodução do método empregando estas condições, em três réplicas independentes, cujos valores observados não diferiram significativamente dos valores preditos pelo modelo a 95% de confiança, a partir do teste *t*. A Tabela 13 apresenta os critérios de “desejabilidade” e as respostas preditas e observadas para cada uma das 10 variáveis em estudo.

**Tabela 13.** Critérios da *desirability function*, variáveis e respostas ótimas previstas, e respostas observadas experimentalmente para as variáveis previstas.

Variáveis e respostas	Critério de “desejabilidade”			Variáveis previstas (reais e codificadas)	Respostas observadas**	Respostas previstas	Desvio
	Objetivo	Menor limite*	Maior limite*				
<i>Variáveis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	No alcance	0	1	0,728 (0,14)	-	-	-
Temperatura (°C)	No alcance	0	1	32,9 (-0,42)	-	-	-
<i>Respostas</i>	-	-	-	-	-	-	-
CLO/SIR	Maximizar	0,55	2,05	-	1,97 (2,34)	1,37	30,39
FER/CON	Maximizar	0,53	1,62	-	1,43 (1,52)	1,33	7,62
<i>p</i> -CU/FER	Maximizar	1,41	2,83	-	1,89 (5,31)	1,65	12,74
RUT/SAL	Maximizar	0,41	5,41	-	3,08 (5,67)	2,65	13,97
SAL/HES	Maximizar	-1,40	4,61	-	1,36 (3,17)	1,70	-24,92
BEN/RUT	Maximizar	-1,41	3,00	-	1,17 (0,31)	1,12	4,29
LUT/QUE	Maximizar	0,13	1,80	-	1,90 (5,19)	1,60	15,78
PIN/NAR	Maximizar	0,00	1,17	-	0,80 (1,76)	0,91	-12,61
CAM/ISO	Maximizar	0,00	1,08	-	0,00 (0,00)	0,44	-
tempo de corrida	Minimizar	17,98	27,35	-	20,34 (0,28)	19,99	1,69

\*Menores e maiores valores obtidos experimentalmente para cada uma das respostas nos ensaios do DCCR.

\*\*Resultados expressos como média e coeficiente de variação entre as repetições.

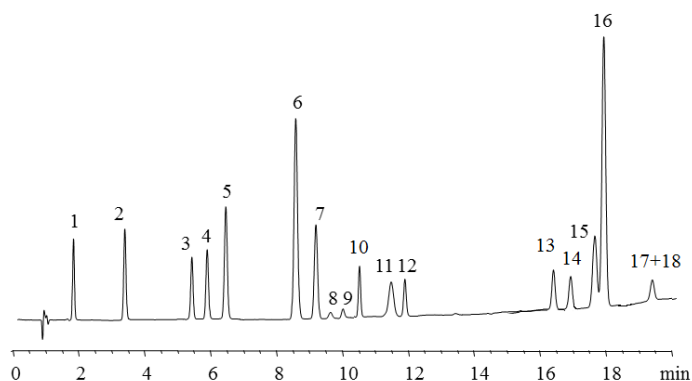
Compostos fenólicos: CLO, ácido clorogênico; SIR, ácido siríngico; *p*-CU, ácido *p*-cumárico; FER, ácido ferúlico; CON, coniferaldeído; BEN, ácido benzoico; RUT, rutina; SAL, ácido salicílico; HES, hesperidina; LUT, luteolina; QUE, quercetina; PIN, pinobanksina; NAR, naringenina; CAM, campferol e ISO, isoramnetina.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Dentre os 9 pares de picos que apresentavam coeluições nas condições estudadas, 6 foram perfeitamente separados pelas condições de desejabilidade indicadas, sendo: clorogênico/siríngico, ferúlico/coniferaldeído, *p*-cumárico/ferúlico, rutina/salicílico, salicílico/hesperidina e luteolina/quercetina. Os pares benzóico/rutina e pinobanksina/naringenina apresentaram resolução de 1,17 e 0,80 respectivamente, o que não causou comprometimento da seletividade e conseqüentemente da quantificação destes compostos (como será mostrado a seguir). Os compostos campferol e isoramnetina apresentaram-se completamente coeluídos. Ademais, houveram discrepâncias consideráveis entre o valor previsto pelo modelo e o observado experimentalmente para os pares clorogênico/siríngico e salicílico/hesperidina, por outro lado, o resultado experimental foi satisfatório para separação desses pares. Vale ressaltar que a avaliação do ajuste dos modelos estatísticos é essencial para entender as regiões críticas do mesmo, porém a avaliação visual também tem importância na definição da melhor condição para o alcance do objetivo.

Como pode ser visto pelos valores preditos pelo modelo, as condições utilizadas não proporcionariam resoluções aceitáveis para os pares pin/nar e cam/iso, com valores preditos de resolução de 0,91 e 0,44 respectivamente, o que é perfeitamente aceitável, tendo em vista o diferente comportamento dos compostos em função da fase móvel, fluxo e temperatura utilizados, como já foi visto pelos coeficientes dos modelos. Isso pode ser facilmente explicado pelo uso de todos os modelos para definir a função de “desejabilidade”, incluindo aqueles com falta de ajuste, o que leva à predição errônea de condições ideais. Embora correspondam a um valor desejável suficientemente alto ( $d = 0,62$ ), em alguns casos essas condições não funcionaram de forma adequada para alguns analitos, como campferol e isoramnetina, constatado durante a execução das condições experimentais no laboratório. Estes dois compostos serão avaliados a partir da soma das suas áreas, o que inclui a quantificação nas amostras de mel de melato de bracinga, e ao longo do texto serão nomeados como um pico único com a nomenclatura “campferol + isoramnetina”. A Figura 6 apresenta o cromatograma do método de separação para os compostos fenólicos nas condições experimentais ótimas.

**Figura 6.** Cromatograma da separação de 18 compostos fenólicos.



Legenda: 1, ácido gálico; 2, ácido 3,4 dihidroxibenzóico; 3, ácido clorogênico; 4, ácido siríngico; 5, ácido cafeico; 6, ácido *p*-cumárico; 7, ácido ferúlico; 8, coniferaldeído; 9, ácido benzoico; 10, rutina; 11, ácido salicílico; 12, hesperidina; 13, luteolina; 14, quercetina; 15, pinobanksina; 16, naringenina; 17, campferol; 18, isoramnetina. Condições cromatográficas – volume de injeção: 0,3  $\mu\text{L}$ ; temperatura da coluna: 32,9  $^{\circ}\text{C}$ ; fluxo de fase móvel: 0,728  $\text{mL min}^{-1}$ ; gradiente de fase móvel: 0 min; 1,6% MeOH, 3,3% ACN, 1,0% THF e 94,1% ácido fórmico 0,1%, 25 min; 10,0% MeOH, 33,3% ACN, 6,0% THF e 50,7% ácido fórmico 0,1%.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

A comparação visual dos cromatogramas e a resolução entre os picos normalmente são suficientes para avaliação da eficiência da separação, contudo alguns parâmetros cromatográficos foram incluídos nessa avaliação, os quais estão apresentados no Apêndice C.

Os resultados para o fator de retenção variaram entre 1,15 e 23,55. O fator de retenção (Eq. 11) de um soluto é determinado pela razão das quantidades de moléculas dos analitos que são retidas na fase estacionária, ou ao percorrer a coluna na fase móvel, e também está relacionado à razão dos tempos em que as moléculas permanecem na fase estacionária e na fase móvel (BORGES; BOTTOLI; COLLINS, 2010; BREITKREITZ; JARDIM; BRUNS, 2009). Nenhum extremo é recomendado, seja por fornecer separações pouco eficientes, seja por implicar em tempos de análise longos, com provável alargamento dos picos (SKOOG et al., 2014). No caso da análise de múltiplos componentes, como neste estudo, fatores de retenção  $\geq 10$  são considerados aceitáveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O fator de separação (Eq. 12), por definição, deve ser maior que 1, uma vez que é calculado pela razão entre os fatores de retenção de dois compostos, portanto a razão de 1 indica fatores de retenção semelhantes (MEYER, 2010; SKOOG et al., 2014). Os valores de fator de separação variaram entre 1,02 a 2,72, indicando separação satisfatória.

Existem controvérsias a respeito da resolução (Eq. 4) mínima considerada suficiente. Alguns autores consideram resoluções de no mínimo 1,25 para fins de quantificação

(COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), enquanto outros consideram resoluções de pelo menos 1,5 (MEYER, 2010; SKOOG et al., 2014). Dentre os 18 analitos avaliados, apenas 3 pares apresentaram valores menores que 1,25, ainda assim, sem prejuízo de seletividade para quantificação dos mesmos, com exceção do par campferol + isoramnetina, o qual será considerado a soma das áreas durante todo o procedimento de validação e aplicação do método nas amostras de mel.

### 3.5 Validação do método

O método proposto foi validado quanto aos parâmetros: conformidade do sistema, limites de detecção e quantificação, linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão e robustez. Na Tabela 14 estão apresentados os coeficientes de variação para as áreas, tempos de retenção e resolução entre pares de picos adjacentes dos 18 compostos fenólicos, a fim de avaliar a conformidade do sistema.

**Tabela 14.** Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico.

Compostos	Coeficiente de variação (%)		
	Área do pico	Tempo de retenção	Resolução
Ácido gálico	2,86	0,46	4,70
Ácido 3,4 dhb	3,03	0,38	5,21
Ácido clorogênico	3,73	0,21	3,99
Ácido siríngico	2,96	0,22	3,71
Ácido cafeico	3,36	0,25	4,59
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,18	0,18	3,34
Ácido ferúlico	3,25	0,19	3,94
Coniferaldeído	3,94	0,17	4,77
Ácido benzóico	3,72	0,15	3,52
Rutina	4,03	0,19	6,16
Ácido salicílico	5,10	0,16	4,74
Hesperidina	2,76	0,11	6,33
Luteolina	4,06	0,10	6,93
Quercetina	5,35	0,11	5,33
Pinobanksina	4,40	0,10	4,64
Naringenina	3,02	0,11	6,37
Campferol + isoramnetina	4,33	0,09	0,00

Fonte: o próprio autor (2019).

Para os três parâmetros avaliados observou-se resultados abaixo de 10% para os coeficientes de variação, demonstrando a adequação do sistema cromatográfico para uso em procedimentos de validação. A Tabela 15 apresenta os resultados relacionados aos limites de detecção e quantificação, seletividade, efeito de matriz e precisão.



**Tabela 15.** Avaliação dos limites de detecção e quantificação, seletividade, efeito de matriz e precisão do método cromatográfico.

Compostos			Seletividade	Efeito de matriz	Precisão (CV em %)	
	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>b</sup>	Fator de pureza	<i>t</i> calculado <sup>c</sup>	Intra-ensaio <sup>d</sup>	Inter-ensaio <sup>e</sup>
Ácido gálico	0,70 ± 0,09	2,30 ± 0,09	998,794	-7,5039	0,4 - 1,3	8,7 - 12,5
Ácido 3,4 dhb	1,30 ± 0,28	4,30 ± 0,05	999,869	-3,9505	0,5 - 0,9	6,9 - 12,3
Ácido clorogênico	1,80 ± 0,23	6,00 ± 0,28	831,256	-4,5784	0,8 - 14,1	7,1 - 13,8
Ácido siríngico	1,00 ± 0,27	3,30 ± 0,20	963,664	1,5968	0,6 - 0,9	6,8 - 14,3
Ácido cafeico	1,00 ± 0,18	3,30 ± 0,32	999,662	-2,8456	0,3 - 1,5	6,9 - 9,7
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,60 ± 0,19	2,00 ± 0,08	874,160	0,3507	0,3 - 1,0	6,4 - 18,6
Ácido ferúlico	1,00 ± 0,64	3,30 ± 0,19	999,626	1,0834	0,5 - 2,7	7,7 - 15,5
Coniferaldeído	1,30 ± 0,24	4,30 ± 0,25	999,418	-1,7389	0,5 - 3,8	9,1 - 16,7
Ácido benzóico	0,80 ± 0,14	2,70 ± 0,32	753,805	-0,2174	0,4 - 0,7	7,3 - 12,3
Rutina	2,70 ± 0,17	9,00 ± 0,04	998,563	-5,7014	0,7 - 2,8	10,1 - 20,0
Ácido salicílico	1,00 ± 0,12	3,30 ± 0,20	999,107	1,4370	0,5 - 1,2	10,3 - 18,1
Hesperidina	1,30 ± 0,11	4,30 ± 0,15	999,680	1,2367	1,4 - 3,1	10,4 - 20,7
Luteolina	2,40 ± 0,08	8,00 ± 0,22	999,761	-0,7073	1,2 - 3,3	5,9 - 11,6
Quercetina	2,40 ± 0,14	8,00 ± 0,33	999,807	-12,4794	1,6 - 3,3	3,3 - 16,2
Pinobanksina	2,00 ± 0,41	6,70 ± 0,34	999,207	45,5784	0,9 - 1,5	2,4 - 9,5
Naringenina	0,30 ± 0,09	1,00 ± 0,42	999,460	1,6914	0,8 - 7,9	0,4 - 7,9
Campferol + isoramnetina	1,50 ± 0,15	5,00 ± 0,12	938,943	1,1694	3,5 - 9,8	3,5 - 17,0

<sup>a</sup>LOD, limite de detecção; resultados expressos como média ± desvio padrão.

<sup>b</sup>LOQ, limite de quantificação; resultados expressos como média ± desvio padrão.

<sup>c</sup>*t* calculado, valor obtido pelo teste *t*; *t* tabelado bicaudal = 2,7764, valor crítico para o teste *t*.

<sup>d</sup>*n* = 3

<sup>e</sup>*n* = 9

CV, coeficiente de variação.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados pela adição de padrão em solvente, visto que não existem matrizes isentas destes compostos. Os limites de detecção variaram entre 0,3 e 2,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para naringenina e rutina, e os limites de quantificação entre 1,0 e 9,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para naringenina e rutina. Os valores de coeficiente de variação estão abaixo do recomendado pela Eurachem (2014) de no máximo 20%, indicando confiabilidade dos dados obtidos e adequada detectabilidade do método analítico.

Não existe, atualmente, uma concordância sobre qual é o melhor método para determinação do LOD. A importância da determinação e as dificuldades associadas advêm do fato de que a probabilidade de detecção não é alterada rapidamente quando seu limite é ultrapassado. Ainda, o limite de detecção pode variar em função do tipo da amostra. Para a validação de um método analítico, normalmente é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal apresentado pela razão branco/ruído, como realizado neste trabalho. Outra forma de determinar o LOD é pelo cálculo da média e do desvio-padrão amostral dos brancos da amostra, quando houver disponibilidade, o que é um desafio (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2011), principalmente no caso do mel de melato de bracatinga, devido à complexidade da amostra. Sendo assim, é fundamental que avaliações independentes sejam realizadas em amostras com concentrações semelhantes aos encontrados para este parâmetro determinado em solvente.

Para avaliação do efeito de matriz, foram comparados os coeficientes angulares da curva analítica dos padrões em solvente e da curva preparada em extrato da matriz de mel de melato de bracatinga. A matriz não causou influência no sinal analítico de 16 compostos, uma vez que o  $t$  calculado foi menor que o  $t$  tabelado para estes analitos, portanto, estes poderão ser quantificados a partir da curva em solvente. A exceção ocorreu com a pinobanksina, com  $t$  calculado maior que  $t$  tabelado, revelando a influência da matriz no sinal cromatográfico detectado. Consequentemente este composto fenólico será quantificado a partir da curva de calibração construída em matriz.

Foram avaliadas as premissas necessárias para uso do MMQO a fim de verificar a linearidade da curva em matriz da pinobanksina. Os resíduos da regressão apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, com valor de  $D$  de 0,1695 menor que o valor  $D_n$  tabelado de 0,3094. A homocedasticidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Cochran, com  $C$  calculado igual a 0,3918 e  $C$  tabelado igual a 0,7218. A independência entre os resíduos foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson e apresentou resultado inconclusivo. Por fim o ajuste linear da curva em matriz foi avaliado pelo teste  $F$  e, o valor de  $F$  calculado foi

igual a 536,32, maior que  $F$  tabelado (1,16), demonstrando ausência de falta de ajuste e linearidade do modelo dentro da faixa de concentração estudada.

A seletividade foi avaliada pelo fator de pureza espectral dos picos de compostos fenólicos em uma amostra de mel de melato de bracatinga, com a adição de todos os padrões à matriz, uma vez que a amostra escolhida para avaliar este parâmetro não apresentava todos os analitos alvo. É importante destacar que a seletividade é a capacidade do método em determinar com exatidão uma substância na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra, como interferentes, produtos de degradação e outros componentes presentes na matriz (EURACHEM, 2014). Os resultados obtidos para o fator de pureza foram  $\geq 990$  para 12 dos 18 compostos avaliados. Os picos cromatográficos dos analitos ácido siríngico e campferol + isoramnetina apresentaram fator de pureza que variou de 963 e 938, respectivamente, indicando grande possibilidade de que o sinal detectado para essas substâncias não seja puro. Considerando que os compostos campferol e a isoramnetina coeluíram, essa possibilidade deve ser considerada apenas para o pico do ácido siríngico. Os ácidos clorogênico, *p*-cumárico e benzóico apresentaram fator de pureza inferior a 900, sugerindo a possível existência de substâncias interferentes da matriz e que apresentam tempos de retenção semelhantes, como pode ser percebido nos espectros apresentados no Apêndice D. Os resultados foram considerados adequados para os fins pretendidos, uma vez que a maioria dos picos cromatográficos obtidos para os compostos estudados apresentou pureza espectral satisfatória.

A precisão do método foi avaliada para todos os analitos em três níveis de concentração da curva de calibração de solução padrão. O menor e maior coeficiente de variação entre as áreas dos picos para a precisão intra-ensaio (mesmo analista, mesmo dia) e inter-ensaio (mesmo analista, 3 dias diferentes) estão apresentados na Tabela 15. A precisão intra-ensaio apresentou faixas de coeficientes de variação menores que 10% para todos os analitos. A precisão inter-ensaio apresentou maiores coeficientes de variação entre 7,91 (naringenina) e 20,00 (rutina). Os coeficientes de variação podem ser considerados adequados visto que todos os valores se encontraram abaixo de no máximo de 20%, estipulado para a faixa de concentração variando de  $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$  até  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (EU, 2002).

Para avaliação da linearidade foi realizada a regressão linear dos dados obtidos e os gráficos gerados apresentaram valores de  $R^2$  acima de 0,98 para todas as curvas de calibração. No gráfico dos resíduos da regressão, foram identificados possíveis *outliers* para todos os analitos e estes foram submetidos ao teste de Grubbs, não sendo confirmados. Atendendo às premissas relacionadas ao MMQO, a normalidade, homocedasticidade e independência dos dados foram avaliados, e a Tabela com os resultados está disponível no Apêndice E.

A distribuição normal dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ao nível de confiança de 95% e foi confirmada, uma vez que todos os valores estão abaixo do valor crítico  $D_n$ , e o valor de  $p < 0,05$ . A homocedasticidade dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Cochran. A distribuição dos resíduos da regressão foi homogênea ao longo dos níveis para todas as curvas, demonstrando homocedasticidade, uma vez que os valores calculados foram menores que os valores tabelados.

A independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson, sendo os resultados comparados com os seus respectivos valores tabelados de  $dL$ ,  $dU$ ,  $4-dU$  e  $4-dL$  e classificados conforme a condição em que se adequavam, ou seja: se  $0 \leq DW < dL$ , os resíduos da regressão são dependentes; se  $dL \leq DW \leq dU$ , são inconclusivos; se  $dU < DW < 4-dU$ , são independentes; se  $4-dU \leq DW \leq 4-dL$ , são inconclusivos e se  $4-dL < DW \leq 4$ , são dependentes. A ausência de autocorrelação entre os resíduos foi confirmada para 9 analitos. Três analitos apresentaram resultados inconclusivos e 5 mostraram autocorrelação entre os resíduos da regressão.

O ajuste dos dados ao modelo linear foi verificado por meio dos testes  $t$  e  $F$ , cujos resultados são apresentados na Tabela 16, juntamente com os níveis e concentrações utilizados para a construção das curvas de calibração.

**Tabela 16.** Parâmetros da curva de calibração de cada composto fenólico.

Compostos	Curva		Ajuste	
	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Níveis <sup>a</sup>	$F$ calculado	$F$ tabelado
Ácido gálico	4,3 – 28,0	7	2365,04	1,19
Ácido 3,4 dhb	2,3 - 28,0	8	3534,97	1,22
Ácido clorogênico	6,0 - 28,0	7	898,3078	1,19
Ácido siríngico	3,3 - 28,0	8	4165,476	1,22
Ácido cafeico	3,3 - 28,0	7	5497,77	1,19
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,0 - 25,0	6	1918,892	1,16
Ácido ferúlico	3,3 - 28,0	8	3585,859	1,22
Coniferaldeído	4,3 - 28,0	8	2336,205	1,16
Ácido benzóico	2,7 - 28,0	7	2819,556	1,22
Rutina	9,0 - 28,0	8	1786,288	1,19
Ácido salicílico	3,3 - 28,0	7	2044,68	1,22
Hesperidina	4,3 - 28,0	6	1639,002	1,19
Luteolina	8,0 - 28,0	7	1730,634	1,19
Quercetina	8,0 - 25,0	6	300,9074	1,16
Pinobanksina	6,7 - 28,0	7	1742,064	1,19
Naringenina	1,0 - 25,0	8	1827,853	1,22
Campferol + isoramnetina	5,0 - 25,0	6	65,03754	1,16

<sup>a</sup>Distribuição equidistante.  $F$  calculado, valor obtido pelo teste  $F$ ;  $F$  tabelado, valor crítico para o teste  $F$  baseado nos graus de liberdade da regressão e do resíduo.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

A falta de ajuste ao modelo linear foi descartada pois os valores de  $F$  calculados foram maiores que  $F$  tabelado. Pode-se concluir que os modelos apresentados são lineares nas faixas de trabalho estudadas. Embora alguns compostos tenham apresentado autocorrelação dos resíduos da regressão, as demais premissas foram atendidas e os demais parâmetros de validação do método não foram afetados. Pode-se então afirmar que a escolha do modelo MMQO é adequada, uma vez que não comprometeu a confiabilidade do método.

Para verificação da exatidão do método, a recuperação aparente foi avaliada em três níveis de concentração, referentes a 3, 5 e 10 vezes o LOQ, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Valores médios de recuperação aparente de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga.

Classe	Composto	Recuperação (%)		
		13 $\mu\text{g mL}^{-1}$	22 $\mu\text{g mL}^{-1}$	43 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Ácido fenólico	Ácido 3,4 dhb	91,1 (6,9)	93,0 (9,6)	82,9 (8,3)
Aldeído fenólico	Coniferaldeído	93,6 (16,2)	92,0 (15,8)	81,9 (2,1)
Flavonoide	Hesperidina	72,3 (8,0)	85,2 (2,3)	60,9 (1,0)

3,4 dhb, 3,4 dihidroxibenzóico.

Resultados expressos como média de recuperação e coeficiente de variação (%).

Fonte: o próprio autor (2019).

A fim de minimizar os custos relacionados ao uso dos padrões analíticos, foram avaliadas as taxas de recuperação de apenas três compostos, contemplando representantes das 3 classes de compostos fenólicos avaliadas, são eles: ácido 3,4 dihidroxibenzóico, aldeído coniferaldeído e o flavonoide hesperidina, tendo em vista que a recuperação de todos os compostos foi avaliada novamente no momento em que foram definidas as condições ideais de extração, na próxima etapa do trabalho, durante a otimização do preparo de amostras (*Capítulo III*).

As porcentagens de recuperação variaram entre 60,9 e 93,6% para todos os níveis avaliados. Somente a recuperação de hesperidina no maior nível avaliado se encontrou abaixo do recomendado pela European Commission (2002), entre 70 e 120%. Flavonoides glicosilados como a hesperidina apresentam propriedades hidrofílicas, devido a solubilidade do açúcar em água (WANG et al., 2019a). Este fenômeno pode explicar porque quando uma maior concentração de hesperidina foi usada, menor recuperação da fase orgânica (acetonitrila) foi observada. Os coeficientes de variação estão adequados, com valores menores que 20%.

Finalmente, a robustez do método foi avaliada pelo teste de *Youden*. A influência de sete parâmetros analíticos que influenciam a separação cromatográfica, foi avaliada em relação à

resolução, área dos picos e fator de retenção, a partir de oito combinações de experimentos. Para avaliar o efeito de cada parâmetro, a média dos quatro valores nominais foi subtraída da média dos quatro valores alterados, e os resultados estão apresentados nas Tabelas 18, 19 e 20. Considerando a subjetividade do teste de *Youden* para avaliação da robustez, o teste *t* foi aplicado entre os valores nominais e alterados para avaliação da significância das diferenças.

Na Tabela 18 estão apresentados os efeitos da alteração de parâmetros analíticos na resolução entre os pares de picos adjacentes.

**Tabela 18.** Efeitos dos parâmetros analíticos na resolução entre os picos do método para quantificação de compostos fenólicos.

Compostos	Efeitos						
	A-a	B-b	C-c	D-d	E-e	F-f	G-g
Ácido gálico	-0,17	0,43	-0,17	-0,93*	0,37	0,39	0,05
Ácido 3,4 dhb	-0,30	0,15	0,17	-0,19	-0,12	-0,17	0,19
Ácido clorogênico	0,03	0,07	0,00	-0,02	0,00	-0,10*	0,02
Ácido siríngico	0,11	0,07	0,02	-0,11	-0,12	0,03	-0,12
Ácido cafeico	-0,37	-0,14	-0,43	-0,46	-0,52	0,72	-0,23
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0,10	-0,05	-0,16	-0,16	-0,08	0,34*	-0,14
Ácido ferúlico	0,12	-0,01	0,05	0,09	-0,04	0,11	-0,09
Coniferaldeído	0,01	-0,18*	0,09	0,06	-0,09	0,12	-0,10
Ácido benzoico	-0,04	-0,27	-0,06	-0,15	-0,11	0,36*	-0,13
Rutina	0,10	0,87*	-0,01	-0,02	0,05	-0,19	0,01
Ácido salicílico	0,16	-0,08	0,04	-0,04	-0,13	0,09	-0,13
Hesperidina	0,73	0,96	0,36	0,41	0,79	-2,23*	0,41
Luteolina	-0,01	-0,10	-0,19	-0,13	-0,22*	0,07	0,09
Quercetina	0,36	-0,25	0,09	-0,27	-0,05	-0,24	0,08
Pinobanksina	0,04	-0,15	0,06	-0,13	0,11	-0,03	-0,08
Naringenina	-0,36*	-0,24	0,13	-0,02	-0,21	0,03	0,29
Campferol + isoramnetina	-	-	-	-	-	-	-

\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a condição nominal e a alterada, pelo teste *t*;

Parâmetros avaliados: A, temperatura da coluna (A = 32,9 °C, a = 32,5 °C); B, vazão (B = 0,728 mL/min, b = 0,750 mL/min); C, volume de injeção (C = 3 µL, c = 3,5 µL); D, comprimento de onda (D = 240, 260, 280, 300, 325 e 370 nm, d = 2 nm a mais em cada comprimento de onda); E, tempo de equilíbrio da coluna (E = 4 min, e = 4,5 min), F, concentração de ácido fórmico na fase móvel (F = 0,1%, f = 0,08%), G, porcentagem de água na fase móvel de diluição (G = 94,1 %, g = 91%).

Os parâmetros volume de injeção e porcentagem de água na fase móvel de diluição não influenciaram a resolução, uma vez que o teste *t* não apresentou diferenças significativas entre a condição nominal e a alterada para estes parâmetros. O parâmetro concentração de ácido fórmico na fase móvel foi o que mais influenciou na diferenciação entre as médias de valores nominais e alterados pelos resultados do teste *t*, sendo significativo para 4 compostos, sendo eles os ácidos clorogênico, *p*-cumárico, benzoico, e a hesperidina. Este parâmetro demonstrou ser de grande relevância na ionização dos compostos em separações cromatográficas.

Considerando os demais parâmetros, pinobanksina foi afetada pela temperatura da coluna; coniferaldeído e rutina pela vazão de fase móvel, ácido gálico pela mudança de comprimento de onda e finalmente a luteolina, pelo tempo de equilíbrio da coluna.

Na Tabela 19 estão apresentados os efeitos da alteração de parâmetros analíticos na área dos picos de compostos fenólicos.

**Tabela 19.** Efeitos dos parâmetros analíticos na área dos picos do método para quantificação de compostos fenólicos.

Compostos	Efeitos						
	A-a	B-b	C-c	D-d	E-e	F-f	G-g
Ácido gálico	3,32	9,26	-27,01*	8,13	3,40	-5,26	-2,68
Ácido 3,4 dhb	3,92	9,21	-28,94*	8,62	-0,30	-11,95	-6,15
Ácido clorogênico	-1,31	5,38	-11,66*	2,98	2,95	-5,64	-4,60
Ácido siríngico	13,56	14,30	-5,83	-5,32	-11,47	-28,41*	11,03
Ácido cafeico	-4,08	2,61	-18,19*	0,01	7,86	-5,27	2,41
Ácido <i>p</i> -cumárico	22,23	34,33	-33,39	12,35	14,75	-63,63*	-1,59
Ácido ferúlico	3,28	16,36	-24,74*	4,40	-0,54	-14,54	0,50
Coniferaldeído	3,89	13,88	-21,61*	-15,46	-2,51	-11,92	2,97
Ácido benzoico	11,17	-2,69	-21,93	72,38*	-7,99	-1,01	-9,51
Rutina	0,69	0,14	-5,92*	3,27	-0,46	-1,27	2,04
Ácido salicílico	4,51	-7,58	-22,19*	10,76	14,46	4,21	-0,80
Hesperidina	-9,02	-0,44	-22,98*	-7,22	-6,82	17,92	-3,31
Luteolina	0,24	2,83	-6,55*	3,13	1,10	-1,10	2,03
Quercetina	2,27	-0,30	-0,49	0,58	1,21	0,01	6,97
Pinobanksina	-20,91	-0,50	-29,87*	-17,68	6,91	2,37	8,41
Naringenina	0,96	2,64	-72,04*	-35,94	-2,89	-6,05	16,39
Campferol + isoramnetina	-1,29	2,72	-10,42*	2,14	0,93	-2,40	15,76*

\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a condição nominal e a alterada, pelo teste *t*;

Parâmetros avaliados: A, temperatura da coluna (A = 32,9 °C, a = 32,5 °C); B, vazão (B = 0,728 mL/min, b = 0,750 mL/min); C, volume de injeção (C = 3 µL, c = 3,5 µL); D, comprimento de onda (D = 240, 260, 280, 300, 325 e 370 nm, d = 2 nm a mais em cada comprimento de onda); E, tempo de equilíbrio da coluna (E = 4 min, e = 4,5 min), F, concentração de ácido fórmico na fase móvel (F = 0,1%, f = 0,08%), G, porcentagem de água na fase móvel de diluição (G = 94,1 %, g = 91%).

Os parâmetros temperatura da coluna, vazão e tempo de equilíbrio da coluna se mostraram robustos, sem provocar mudanças significativas devido a alterações destes. A alteração do parâmetro comprimento de onda não demonstrou robustez apenas para a área do ácido benzoico; a alteração do parâmetro porcentagem de água na fase móvel provocou alterações nas áreas dos compostos campferol + isoramnetina e a alteração da concentração de ácido fórmico na fase móvel causou influência para as áreas dos ácidos siríngico e *p*-cumárico. O parâmetro com menor robustez foi o volume de injeção, cuja alteração propiciou valores significativamente diferentes para 13 compostos, sendo, portanto, o parâmetro mais suscetível a promover alterações das áreas dos analitos, visto que devido à sensibilidade do sistema de

HPLC, alterações de volume de injeção, ainda que pequenas, são detectadas pelo sistema e provocam aumento do sinal analítico.

Na Tabela 20 estão apresentados os efeitos da alteração de parâmetros analíticos no fator de retenção dos compostos fenólicos. Nenhum parâmetro avaliado provocou alterações significativas entre as condições nominais e alteradas para todos os compostos. A Eurachem (2014) não recomenda nenhum procedimento específico neste caso, e o Inmetro (2011) recomenda que se não houver diferença significativa, deve-se calcular a média e o desvio das oito combinações resultantes do planejamento fatorial (vide Tabela 5).

**Tabela 20.** Efeitos dos parâmetros analíticos no fator de retenção dos picos do método para quantificação de compostos fenólicos.

Compostos	Efeitos						
	A-a	B-b	C-c	D-d	E-e	F-f	G-g
Ácido gálico	-0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	-0,08	-0,03
Ácido 3,4 dhb	-0,10	0,11	0,10	0,10	0,09	-0,14	-0,05
Ácido clorogênico	-0,16	0,21	0,15	0,12	0,09	-0,13	-0,09
Ácido siríngico	-0,16	0,24	0,15	0,14	0,11	-0,16	-0,08
Ácido cafeico	-0,19	0,16	0,17	0,19	0,13	-0,16	-0,14
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0,27	0,13	0,22	0,25	0,15	-0,13	-0,21
Ácido ferúlico	-0,27	0,12	0,24	0,26	0,15	-0,09	-0,24
Coniferaldeído	-0,26	0,15	0,26	0,27	0,15	-0,11	-0,24
Ácido benzóico	-0,29	0,13	0,29	0,30	0,17	-0,13	-0,26
Rutina	-0,33	-0,06	0,27	0,29	0,11	0,10	-0,35
Ácido salicílico	-0,37	0,08	0,32	0,33	0,17	0,04	-0,33
Hesperidina	-0,37	-0,13	0,30	0,30	0,11	0,16	-0,42
Luteolina	-0,51	-0,16	0,37	0,42	0,19	0,20	-0,64
Quercetina	-0,55	-0,18	0,39	0,43	0,18	0,21	-0,65
Pinobanksina	-0,56	-0,15	0,41	0,45	0,19	0,20	-0,64
Naringenina	-0,57	-0,19	0,41	0,45	0,20	0,23	-0,68
Campferol + isoramnetina	-0,63	-0,25	0,44	0,48	0,20	0,34	-0,75

Parâmetros avaliados: A, temperatura da coluna (A = 32,9 °C, a = 32,5 °C); B, vazão (B = 0,728 mL/min, b = 0,750 mL/min); C, volume de injeção (C = 3 µL, c = 3,5 µL); D, comprimento de onda (D = 240, 260, 280, 300, 325 e 370 nm, d = 2 nm a mais em cada comprimento de onda); E, tempo de equilíbrio da coluna (E = 4 min, e = 4,5 min), F, concentração de ácido fórmico na fase móvel (F = 0,1%, f = 0,08%), G, porcentagem de água na fase móvel de diluição (G = 94,1 %, g = 91%).

O coeficiente de variação entre os 8 ensaios para o fator de retenção variou entre 2,69 e 7,11%, demonstrando a robustez do método para avaliação do fator de retenção.

Os resultados revelaram que os parâmetros que exigem mais atenção durante a execução do método são o volume de injeção e a concentração de ácido fórmico na fase móvel, uma vez que estes foram os responsáveis por alterações significativas em um maior número de analitos. É importante enfatizar, que o método foi considerado adequadamente robusto, uma vez que



erros provenientes de diferenças nos volumes de injeção não são comuns, já que o sistema cromatográfico é completamente automatizado e seus componentes apresentam-se eficientes quando em perfeito estado e com as manutenções atualizadas. O cuidado com o preparo correto de fase móvel pode minimizar os efeitos da composição da mesma nos resultados. A validação do método otimizado de acordo com as diretrizes recomendadas pela Eurachem demonstrou que o mesmo é confiável para determinação de compostos fenólicos em amostras reais de mel de melato de bracatinga.

### **3.6 Aplicação do método**

O método de separação cromatográfica otimizado e validado foi aplicado em 18 amostras de mel de melato de bracatinga de seis cidades do planalto serrano do estado de Santa Catarina, Brasil. A Tabela 21 apresenta os resultados das análises.

**Tabela 21.** Compostos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de mel de melato de bracinga.

Amostra	Ácido gálico	Ácido 3,4-dhb	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido benzoico	Rutina	Salicílico	Luteolina	Quercetina	Naringenina
UP1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,01 ± 0,76	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
UP2	n.d.	28,76 ± 0,46	n.d.	15,20 ± 0,75	21,51 ± 1,82	20,10 ± 0,30	9,82 ± 0,23	n.d.	1,19 ± 0,17
UP3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ
UB1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ
UB2	n.d.	n.d.	n.d.	5,71 ± 0,07	<LOQ	<LOQ	16,05 ± 0,40	46,37 ± 2,40	<LOQ
UB3	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	15,23 ± 1,90	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ
BS1	n.d.	n.d.	n.d.	5,52 ± 0,18	19,52 ± 1,34	8,03 ± 0,35	n.d.	n.d.	<LOQ
BS2	n.d.	n.d.	3,38 ± 0,14	5,76 ± 0,13	25,99 ± 2,05	9,62 ± 0,35	11,24 ± 0,60	<LOQ	<LOQ
BS3	n.d.	n.d.	n.d.	5,58 ± 0,15	15,71 ± 0,30	8,90 ± 0,41	n.d.	n.d.	<LOQ
BR1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52,13 ± 1,70	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
BR2	n.d.	n.d.	7,01 ± 0,42	<LOD	28,62 ± 1,12	n.d.	14,80 ± 0,39	<LOQ	<LOQ
BR3	1,86 ± 0,09	n.d.	n.d.	5,83 ± 0,21	8,39 ± 0,34	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
LG1	n.d.	n.d.	n.d.	6,25 ± 0,17	23,47 ± 0,74	8,46 ± 0,17	n.d.	n.d.	<LOQ
LG2	n.d.	n.d.	n.d.	6,01 ± 0,14	32,2 ± 1,63	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ
LG3	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	11,59 ± 0,53	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ
SJ1	n.d.	n.d.	2,78 ± 0,07	7,04 ± 0,28	9,96 ± 0,37	n.d.	7,96 ± 0,66	<LOQ	<LOQ
SJ2	n.d.	n.d.	2,81 ± 0,20	6,82 ± 0,39	7,25 ± 0,43	7,82 ± 0,61	6,80 ± 0,42	n.d.	<LOQ
SJ3	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOD	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ

Origem geográfica: UP, Urupema; UB, Urubici; BS, Bocaina do Sul; BR, Bom Retiro; LG, Lages; SJ, São Joaquim. Resultados expressos como média ± desvio padrão,  $n = 3$ .

n.d., não detectado; <LOD, abaixo do limite de detecção; <LOQ, abaixo do limite de quantificação.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019b).

Foi possível quantificar nove compostos: os ácidos fenólicos gálico, 3,4-dihidroxibenzóico, *p*-cumárico, benzóico, salicílico; além dos flavonoides rutina, luteolina, quercetina e naringenina. Os ácidos gálico e 3,4-dihidroxibenzóico foram detectados em apenas uma amostra cada, e a naringenina foi quantificada em apenas uma amostra, sendo detectada, mas não quantificada em todas as outras amostras. A quercetina foi detectada em 4 amostras, mas quantificada em apenas uma. O teor de ácido *p*-cumárico variou de 2,8 a 3,4  $\mu\text{g g}^{-1}$ , ácido benzóico variou de 5,5 a 15,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ , ácido salicílico de 7,8 a 20,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  e luteolina de 6,8 a 16,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ . A rutina foi detectada em concentrações superiores, variando de 7,3 a 52,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  e foi detectada em 15 das 18 amostras analisadas. Os ácidos clorogênico, siríngico, cafeico e ferúlico, o coniferaldeído e os flavonoides hesperidina, pinobanksina, campferol e isoramnetina não foram detectados em nenhuma das amostras em estudo.

Seraglio et al. (2016) avaliaram compostos fenólicos em amostras de mel de melato de bracatinga coletadas na safra de 2014 de regiões próximas às do local de coleta que este estudo abrangeu. O preparo de amostra contemplou a LLE com água deionizada, analisadas por LC com detecção por espectrometria de massas. No trabalho citado, o teor dos ácidos benzóico e salicílico foi superior ao presente estudo, e o oposto ocorreu para todos os outros compostos avaliados. No entanto, deve-se considerar que as amostras foram coletadas sob diferentes condições edafoclimáticas e em diferentes safras

Os resultados descritos neste estudo, apesar das diferenças no método de extração, são consistentes com os resultados para méis de melato de outras origens (CAN et al., 2015; ESCRICHE et al., 2014), porém, o método proposto, apresenta vantagens quanto a desempenho do método cromatográfico, visto que Escriche et al. (2014) analisaram 10 compostos fenólicos em 60 minutos de corrida cromatográfica, e Can et al. (2015) reportaram 16 compostos fenólicos analisados em 50 minutos de corrida; enquanto que neste estudo, 18 compostos fenólicos – dois deles coeluídos - foram separados em 25 minutos de corrida. Estes resultados demonstraram que o uso de ferramentas quimiométricas proporcionou o desenvolvimento de um método mais rápido, com menor geração de resíduos, incluindo a etapa de preparo de amostra, e que obteve resultados satisfatórios comprovados pela validação do mesmo. Adicionalmente, uso do DAD deve ser ressaltado, sendo este um detector de menor custo em comparação aos espectrômetros de massa amplamente utilizados para análise de compostos fenólicos em alimentos.

#### 4. CONCLUSÃO

O uso do planejamento Simplex-Centroide, do delineamento composto central rotacional e da superfície de resposta gerada para a otimização de respostas simultâneas resultaram em um método que permitiu a separação cromatográfica de 18 compostos fenólicos, sendo dois deles coeluídos, em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), proporcionando resolução máxima entre picos em um menor tempo de análise, de apenas 25 min, o que configura um excelente resultado considerando os tempos de corrida reportados em outros estudos de compostos fenólicos em mel.

As abordagens estatísticas empregadas foram úteis para a otimização da separação dos analitos alvo, economizando tempo e diminuindo o uso de reagentes, além de permitir avaliar a influência de cada fator nos resultados alcançados. Este é o primeiro estudo de otimização da separação cromatográfica de compostos presentes em mel de melato de bracatinga. Os estudos de validação demonstraram que o método atende às especificações da Eurachem (2014) para quantificação de compostos fenólicos em amostras de méis de melato de bracatinga, sendo que o mesmo foi aplicado com sucesso em 18 amostras, podendo ser empregado para análises de rotina e até mesmo em outras amostras de alimentos.

### CAPÍTULO III

#### QuEChERS APLICADO À EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM MÉIS DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham)

As informações deste capítulo foram publicadas em:

SILVA, B.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Improved strategy based on QuEChERS method followed by HPLC/DAD for the quantification of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 116, 108471, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108471>

## RESUMO

O preparo de amostras de mel para análise de compostos minoritários como os fenólicos pode ser uma etapa complicada de sua determinação, principalmente devido à alta quantidade de açúcares presentes nessa matriz, considerada complexa. Neste contexto, a proposta deste estudo foi desenvolver um método rápido, simples e com uso reduzido de solventes para a extração de compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). O procedimento de preparo de amostras baseou-se no método QuEChERS, e as etapas de extração, *salting-out* e *clean-up* foram avaliadas, considerando o pH e o volume da solução extratora empregada; a variação dos sais utilizados na etapa de *salting-out* e os sais usados na etapa de *clean-up*, com o intuito de obter eficiência de extração satisfatória. Foram consideradas como respostas a recuperação de compostos fenólicos selecionados e a inspeção visual dos cromatogramas dos méis de melato de bracatinga. O procedimento do método QuEChERS após o estudo das condições foi: 5 g de mel homogeneizado; 4 mL de acetonitrila:1% de ácido fórmico como solvente extrator; 1 g de cloreto de sódio e 4 g de sulfato de magnésio na etapa de extração; 150 mg de CaCl<sub>2</sub> e 100 mg de PSA e C<sub>18</sub> (1:1, m/m) para a etapa de *clean-up*. A eficiência do método foi confirmada por meio de estudos de recuperação aparente dos analitos, cujos valores variaram entre 63 ± 4% para a rutina a 114 ± 1% para o ácido benzóico. O método QuEChERS de extração foi aplicado para a extração de compostos fenólicos em 52 amostras de mel de melato de bracatinga. Para a separação cromatográfica foi empregada fase móvel constituída por acetonitrila, metanol e tetraidrofurano, e coluna C<sub>18</sub> como fase estacionária. O volume de injeção foi de 3 µL, a temperatura do forno, 33 °C, e a vazão, 0,73 mL min<sup>-1</sup>. Os compostos fenólicos foram caracterizados de acordo com seu espectro de UV e tempos de retenção em comparação com os respectivos padrões. Dezesesseis compostos foram quantificados por HPLC-DAD, sendo que o ácido siríngico e a rutina foram encontrados em um número maior de amostras, em concentrações variando de 5,2 ± 0,5 a 40,5 ± 2,5 µg g<sup>-1</sup> e 7,9 ± 0,6 a 64,4 ± 8,0 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada para distinguir as amostras quanto à sua composição fenólica. O método de QuEChERS foi útil para a extração de compostos fenólicos do mel de melato de bracatinga e pode ser aplicado na sua determinação em outros méis.

**Palavras-chave:** Preparo de amostras. QuEChERS. Mel de melato de bracatinga. Compostos fenólicos. Quimiometria.

## ABSTRACT

The sample preparation for the analysis of minor honey compounds such as phenolics can represent a complicated step in their determination, mainly due to the high amount of sugars present in this complex matrix. In this context, the aim of this study was to develop a fast, simple and solvent saver method for the extraction of phenolic compounds in bracatinga honeydew honey (*Mimosa scabrella* Bentham) honeys. The sample preparation procedure was based on the QuEChERS method, and the extraction, salting-out and clean-up steps were evaluated. The pH and the volume of the extraction solution used; the variation of the salts used in the salting-out step and the salts used in the clean-up step were considered, to achieve satisfactory extraction efficiency. Recovery of selected phenolic compounds and the visual evaluation of the chromatograms of bracatinga honeydew honeys were the responses. After optimization, the QuEChERS was: 5 g of homogenized honey; 4 mL of acetonitrile: 1% formic acid as an extracting solvent; 1 g of sodium chloride and 4 g of magnesium sulphate in the extraction step; 150 mg of CaCl<sub>2</sub> and 100 mg of PSA and C<sub>18</sub> (1:1, w/w) for the clean-up step. The efficiency of the method was confirmed through studies of apparent recovery of the analytes, whose values ranged from 63 ± 4% for rutin to 114 ± 1% for benzoic acid. The QuEChERS method was applied for the extraction of phenolic compounds in 52 samples of bracatinga honeydew honey. For the chromatographic separation, a mobile phase consisting of acetonitrile, methanol and tetrahydrofuran was used. Stationary phase C<sub>18</sub> column was used. The injection volume was 3 µL, the oven temperature was 33 °C, and the flow rate was 0.73 mL min<sup>-1</sup>. The phenolic compounds were characterized according to their UV spectrum and retention times in comparison with the respective standards. HPLC-DAD quantified sixteen compounds, syringic acid and rutin were found in a more significant number of samples, in concentrations ranging from 5.2 ± 0.5 to 40.5 ± 2.5 µg g<sup>-1</sup> and 7.9 ± 0.6 to 64.4 ± 8.0 µg g<sup>-1</sup>, respectively. Principal Component Analysis (PCA) was used to distinguish the samples for their phenolic composition. The QuEChERS method was useful for the extraction of phenolic compounds from bracatinga honeydew honey. It can be applied for its determination in other honeys.

**Keywords:** Sample preparation. QuEChERS. Bracatinga honeydew honey. Phenolic compounds. Chemometrics.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são sintetizados como metabólitos secundários, cujas concentrações são proporcionais ao estresse sofrido pelas plantas ao longo de seu ciclo de vida. Estes compostos podem apresentar-se solúveis, solúveis conjugados a outros compostos e ligados ou insolúveis. Compostos em suas formas livres são encontradas nos vacúolos das células vegetais, enquanto as conjugadas estão ligadas a açúcares e a outros compostos de baixa massa molar. As formas insolúveis são covalentemente ligadas aos componentes estruturais da parede celular (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). Há evidências de atividade antioxidante, antitumoral, antibacteriana e anti-inflamatória dos compostos fenólicos em todas as suas formas (MAJTAN et al., 2011; PIRES et al., 2018b; SERAGLIO et al., 2017; VILLAVICENCIO et al., 2018)

O mel é uma matriz alimentícia complexa, com alto conteúdo de açúcares, além de uma gama de compostos minoritários. Somado a isso, a baixa concentração de compostos fenólicos representa um desafio, já que a determinação pode ser afetada por substâncias interferentes presentes no mel. Os estudos envolvendo compostos fenólicos presentes em méis utilizam na maioria das vezes os métodos clássicos de extração, em fase sólida (SPE) ou líquido-líquido (LLE) (CAN et al., 2015; ESCRICHE et al., 2014; OROIAN; ROPCIUC, 2017; OUCHEMOUKH et al., 2017; SERAGLIO et al., 2016), sendo que em ambas as técnicas as principais desvantagens são o tempo longo de extração e o elevado volume de solvente orgânico utilizado.

A demanda por novas técnicas de extração de compostos fenólicos tem se intensificado, permitindo a diminuição dos tempos de extração e redução do consumo de solventes orgânicos (ROTTA et al., 2019). A proposta destes novos métodos tem sido a recuperação dos analitos semelhante ou melhor do que a proporcionada por métodos convencionais de extração, em tempos menores, sendo mais econômicos e mais fáceis de executar, diminuindo as etapas de extração e a exposição do analista. Uma perspectiva relevante para a extração de compostos fenólicos é o uso de métodos que propiciem a miniaturização de métodos já utilizados para outros tipos de amostra.

O método de QuEChERS por exemplo, se baseia em duas etapas, uma extração líquido-líquido com consumo mínimo de solvente orgânico, seguido de partição por *salting-out* e uma etapa de limpeza utilizando extração em fase sólida dispersiva (ANASTASSIADES et al., 2003; FONTANA; BOTTINI, 2014). As principais vantagens do método são a simplicidade, baixo custo, rapidez e vasto potencial de aplicação em diferentes matrizes alimentares. O método



QuEChERS foi aplicado para extração de compostos fenólicos em poucas matrizes, com destaque para leguminosas (DELGADO-ZAMARREÑO et al., 2012), vinho (FONTANA; BOTTINI, 2014), maracujá (ROTTA et al., 2019) e cebola (SATO et al., 2015), porém ainda não foi estudado para a extração de compostos fenólicos em amostras de mel.

Dentro deste contexto, a proposta deste trabalho foi aplicar o método QuEChERS para extração de compostos fenólicos em amostras de mel de melato de bracinga. As etapas de extração, *salting-out* e *clean-up* foram estudadas e adaptadas, com o objetivo de alcançar maior eficiência do método e altas taxas de recuperação dos compostos fenólicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Os padrões dos compostos fenólicos utilizados estão descritos no *item 2.1 do Capítulo II*. Água ultrapura foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha) e metanol, acetonitrila, tetraidrofurano, acetato de etila, ácido fórmico e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.). Os sais cloreto de sódio e sulfato de magnésio anidro e hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.) e os adsorventes amina primária secundária (PSA) e octadecilsilano (C<sub>18</sub>) foram adquiridos da Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, E.U.A.).

### 2.2 Amostras

Cinquenta e duas amostras de mel de melato de bracinga foram coletadas e fornecidas por apicultores dos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (Tabela 1) durante a safra de 2018, nas mesmas condições de armazenamento, transporte, tratamento e acondicionamento até o momento das análises, descritas no *item 2.3 do Capítulo II*.

**Tabela 1.** Origem geográfica e data de coleta das amostras de mel de melato de bracatinga.

<b>Código</b>	<b>Cidade</b>	<b>Mês/ano de coleta</b>	<b>Código</b>	<b>Cidade</b>	<b>Mês/ano de coleta</b>
1	Bocaina do Sul – SC	06/2018	27	Matos Costa – SC	05/2018
2	Bom Retiro – SC	06/2018	28	Caçador – SC	05/2018
3	Urupema – SC	07/2018	29	São Joaquim – SC	04/2018
4	Bocaina do Sul – SC	07/2018	30	Bom Jesus – SC	04/2018
5	Monte Castelo – SC	07/2018	31	Urubici – SC	06/2018
6	Urubici – SC	07/2018	32	Rio Rufino – SC	06/2018
7	Lages – SC	06/2018	33	Palmeira - SC	06/2018
8	Bom Retiro – SC	06/2018	34	Bom Retiro – SC	04/2018
9	General Carneiro – PR	09/2018	35	Bom Retiro – SC	05/2018
10	Água Doce – SC	07/2018	36	Timbó Grande – SC	02/2018
11	General Carneiro – PR	09/2018	37	Calmon – SC	04/2018
12	Santa Terezinha – SC	07/2018	38	Calmon – SC	03/2018
13	General Carneiro – PR	09/2018	39	General Carneiro – PR	03/2018
14	Imbituba – SC	06/2018	40	General Carneiro – PR	03/2018
15	São Bonifácio – SC	06/2018	41	Bituruna – PR	06/2018
16	Araranguá – SC	05/2018	42	Bituruna – PR	04/2018
17	Otacílio Costa – SC	06/2018	43	Bituruna – PR	04/2018
18	São Bento do Sul – SC	06/2018	44	Cruz Machado – PR	04/2018
19	Correia Pinto – SC	06/2018	45	Cruz Machado – PR	05/2018
20	Bom Retiro – SC	06/2018	46	Vacaria – RS	05/2018
21	Canoinhas – SC	06/2018	47	Cambará – RS	05/2018
22	Santa Terezinha – SC	04/2018	48	Cambará – RS	05/2018
23	Lebom Régis – SC	05/2018	49	São José dos Ausentes – RS	05/2018
24	Monte Castelo – SC	05/2018	50	São José dos Ausentes – RS	05/2018
25	Santa Terezinha – SC	05/2018	51	Bocaina do Sul – SC	05/2018
26	Lebom Régis – SC	05/2018	52	Urubici – SC	05/2018

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

### 2.3 Método QuEChERS

Alguns fatores que afetam a recuperação e seletividade do método foram estudados a fim de adaptar as melhores condições das etapas de extração, conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Variáveis estudadas no método QuEChERS para extração dos compostos fenólicos.

Experimento <sup>a</sup>	Volume de solvente <sup>b</sup>	Acidificação do solvente <sup>c</sup>	NaCl ( <i>salting out</i> )	Sais ( <i>clean up</i> )
1	<b>3 mL/4 mL/ 5 mL</b>	1%	1,5 g NaCl	PSA, C <sub>18</sub> , MgSO <sub>4</sub>
2	4 mL	<b>0%/1%/2.5%</b>	1,5 g NaCl	PSA, C <sub>18</sub> , MgSO <sub>4</sub>
3	4 mL	1%	<b>0,5 g/1 g/1,5 g NaCl</b>	PSA, C <sub>18</sub> , MgSO <sub>4</sub>
4	4 mL	1%	1 g NaCl	<b>PSA, C<sub>18</sub>, MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub></b>

<sup>a</sup>Uma variável estudada a cada experimento, variáveis em negrito foram as estudadas no respectivo experimento.

<sup>b</sup>Acidificado com 1% de ácido fórmico

<sup>c</sup>Porcentagem de ácido fórmico adicionado ao solvente.

PSA, amina primária secundária.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

Em cada experimento, apenas uma variável foi estudada e as demais foram fixas de acordo com o exposto na tabela. Todas as etapas do método QuEChERS foram conduzidas em cada experimento, incluindo extração, *salting-out* e *clean-up*.

Para o método final, em tubo de centrífuga, 5 g de mel diluídos em 10 mL de água foram adicionados de 4 mL de acetonitrila acidificada (ácido fórmico 1%) e a mistura foi agitada em vórtex por 1 min. Para a separação de fases, 1,0 g de NaCl e 4 g de MgSO<sub>4</sub> (previamente submetido à secagem a 500 °C durante 5 h) foram adicionados e os tubos agitados em vórtex por 1 min. Após centrifugação por 5 min a 2800 g, alíquota de 2 mL de fase orgânica foi recolhida e transferida para um novo tubo de centrífuga. Para a etapa de limpeza, 150 mg de CaCl<sub>2</sub>, 50 mg de PSA e 50 mg de C<sub>18</sub> foram adicionados e a mistura agitada em vórtex por 30 s seguida de centrifugação por 4 min a 2800 g. Uma alíquota de 400 µL de extrato foi evaporada sob corrente de nitrogênio, reconstituída em fase móvel e centrifugada a 1400 g (Eppendorf Centrifuge 5410, Hamburg, Germany) antes da injeção no sistema HPLC-DAD.

#### 2.4 Avaliação da eficácia do método proposto

A avaliação da eficiência das condições estudadas foi determinada pela recuperação dos padrões de compostos fenólicos adicionados em uma determinada amostra de mel de melato de bracinga (amostra UP1 proveniente de Urupema, SC), sendo eles o aldeído fenólico coniferaldeído, o ácido *p*-cumárico e o flavonoide rutina, representando uma substância de cada classe de compostos fenólicos contemplados neste estudo. Portanto, a recuperação foi avaliada pela fortificação dessa amostra em dois níveis de concentração (baixa e alta, compreendendo a faixa usada para as curvas de calibração apresentadas na Tabela 16 do *Capítulo II*). Para cada

experimento um controle foi conduzido por meio da adição de uma amostra não fortificada com os padrões de compostos fenólicos. Quando foi detectada a presença dos compostos fenólicos adicionados nas amostras controle, as áreas foram descontadas para o cálculo da recuperação. Amostras fortificadas e não fortificadas foram preparadas em três réplicas independentes e injetadas aleatoriamente no sistema HPLC-DAD. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação, calculada de acordo com a Equação 14 ( $\% \text{ Rec} = ((C_1 - C_2) / C_2) \times 100$ ) do *Capítulo II*.

## 2.5 Condições cromatográficas

A separação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método descrito no *item 2.4 do Capítulo II*, utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo 1260, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.A.), acoplado a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), coluna Zorbax Poroshell 120 C<sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm d.i., tamanho da partícula de 2,7 µm). O gradiente de fase móvel foi constituído por 94,1% de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (A), 1,6% de metanol (B), 3,3% de acetonitrila (C) e 1,0% de tetraidrofurano (D) em 0 min de corrida, mudando para 50,7% (A), 10,0% (B), 33,3% (C) e 6,0% (D) em 25 min de corrida. O fluxo foi de 0,73 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi mantida em 33 °C e o volume de injeção de amostra de 3 µL.

## 2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em três replicatas independentes e os resultados expressos como média ± desvio padrão ou coeficiente de variação. O intervalo de confiança de 95% foi adotado para todas as análises. As análises foram realizadas com auxílio do programa Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK, E.U.A.) por meio da análise de variância (ANOVA) e teste *t-Student* ou teste de *Tukey* para comparação de médias. A Análise de Componentes Principais foi aplicada para diferenciação dos méis de melato de bracinga, considerando os compostos fenólicos determinados nas amostras em questão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método QuEChERS proposto por Anastassiades et al. (2003) tem sido amplamente empregado para a extração de pesticidas e micotoxinas em diversas matrizes. O uso do método

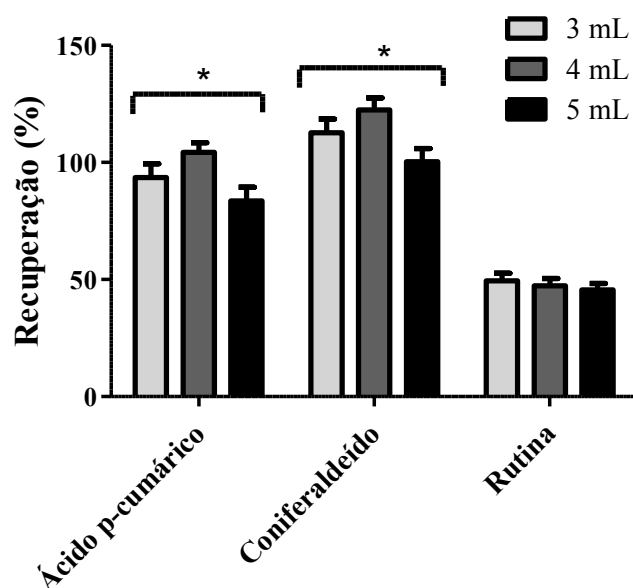
para extração de compostos fenólicos não é comum, principalmente em matrizes açucaradas como o mel, portanto, suas etapas foram estudadas neste trabalho, com vistas a propor o método para o preparo de amostras de mel de melato de bracatinga para determinação de compostos fenólicos.

### 3.1 Extração de compostos fenólicos pelo método de QuEChERS

Inicialmente, o volume do solvente extrator (experimento 1, Tabela 2) foi avaliado com o objetivo de alcançar a melhor recuperação, com o mínimo consumo do mesmo. Para determinar a influência do volume de solvente, o experimento 1 foi conduzido, com o emprego de 5 g de amostra, adicionadas de 10 ou 20 mg dos três padrões, representantes de cada classe de compostos fenólicos, contempladas no estudo. Neste experimento, apenas o volume de solvente foi avaliado, e as demais variáveis fixas de acordo com a Tabela 2.

As amostras fortificadas foram extraídas com alíquotas de 3, 4 ou 5 mL de acetonitrila acidificada com ácido fórmico 1% (de acordo com Fontana; Bottini (2014)) por 1 min em vórtex. Os resultados estão apresentados na Figura 1, e pode ser observado que o volume de 4 mL resultou em maiores recuperações.

**Figura 1.** Efeito da alíquota de solvente extrator na recuperação dos compostos fenólicos em uma amostra de mel de melato de bracatinga fortificada.

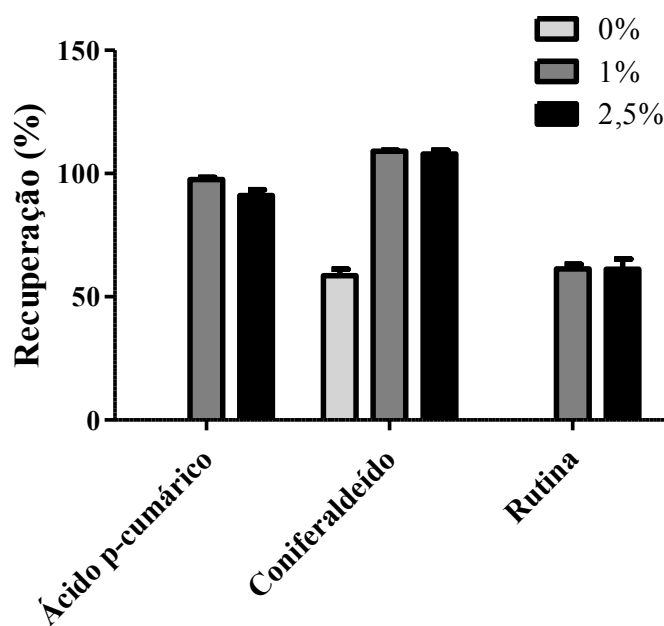


\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$ ;  
 Resultados expressos como média e desvio padrão entre as medições.  
 Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

A recuperação do flavonoide rutina apresentou resultado bem abaixo do esperado ( $47 \pm 5\%$ ), porém, existem outros fatores que influenciaram o método e que serão avaliados na sequência. Quando uma alíquota de 5 mL de ACN foi utilizada, a recuperação do ácido *p*-cumárico foi aproximadamente 25% menor que a concentração adicionada ( $77 \pm 4\%$  de recuperação). Sendo assim, levando em consideração as maiores porcentagens de recuperação, a relação amostra:solvente de 1:0,8 (5 g de amostra, 4 mL de ACN) foi adotada para os próximos experimentos.

No experimento 2 foi avaliado o efeito da acidificação do solvente de extração; uma estratégia utilizada no método QuEChERS a fim de melhorar a extração dos analitos com caráter ácido. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

**Figura 2.** Efeito da acidificação do solvente extrator na recuperação dos compostos fenólicos em uma amostra de mel de melato de bracinga fortificada.



Resultados expressos como média e desvio padrão entre as medições.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

Em geral, os compostos fenólicos de baixa massa molar, como os ácidos fenólicos, também são mais estáveis em faixas de pH ácidos. Além disso, quando o meio reacional apresenta-se ácido, a oxidação dos compostos fenólicos é evitada, proporcionando indiretamente um aumento da eficiência de extração, uma vez que nestas condições, o equilíbrio entre o fenol e fenolato (base conjugada do fenol) é deslocado para a forma de fenol, menos

polar, e os ácidos fenólicos se apresentarão principalmente em suas formas neutras, facilitando a extração com ACN (ANASTASSIADES et al., 2003; FONTANA; BOTTINI, 2014). A acidificação do sistema foi avaliada pela adição de diferentes concentrações de ácido fórmico (0, 1 e 2,5 %) à ACN.

Nas extrações conduzidas com ACN, sem adição de ácido fórmico, não foi observada a recuperação do ácido *p*-cumárico e da rutina. Quando 1% de ácido fórmico foi adicionado à ACN, a recuperação do ácido *p*-cumárico foi de  $98 \pm 2\%$  e de rutina de  $61 \pm 3\%$ , enquanto a recuperação do coniferaldeído foi praticamente 2 vezes maior com relação ao experimento conduzido sem acidificação (com recuperação de  $58 \pm 4\%$  alterada para  $109 \pm 1\%$ ). Isso pode ser explicado pelo pKa desses analitos (Tabela 3 e Apêndice A). O ácido *p*-cumárico possui pKa de 4,1, sendo, portanto, fortemente afetado pela diminuição do pH, como pode ser observado pelo expressivo aumento da recuperação em meio acidificado. A rutina, com pKa de 7, com aumento de aproximadamente 60 % da recuperação em relação ao uso de ACN sem adição de ácido fórmico, foi menos afetada pela acidificação do meio. O coniferaldeído apresenta o maior pKa dentre todos os compostos, 9,5, o que explica porque foi possível recuperar este analito da matriz mesmo sem acidificação do meio.

O pH aparente dos sistemas foi medido e os valores encontrados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de pH aparente dos sistemas avaliados para acidificação do solvente extrator usado na recuperação dos compostos fenólicos em uma amostra de mel de melato de bracinga fortificada; e valores de pKa dos analitos adicionados à amostra.

Sistema*	pH	Analito	pKa
0%	4,2	Ácido <i>p</i> -cumárico	4,1
1%	1,9	Coniferaldeído	9,5
2,5%	1,2	Rutina	7,0

\*Relativo a adição de ácido fórmico ao solvente extrator.

Fonte: o próprio autor (2019).

Como pode ser observado, compostos com pKa abaixo do pH do sistema sem acidificação, como o ácido *p*-cumárico, tem baixas recuperações pois não estão protonados. A acidificação com 2,5% de ácido fórmico resultou em recuperações de 91% para o ácido *p*-cumárico, 108% para coniferaldeído e 61% para rutina.

Ainda considerando a acidificação do solvente extrator, de acordo com Fontana; Bottini (2014), existe um efeito relacionado às propriedades do PSA. Os grupamentos amino primários

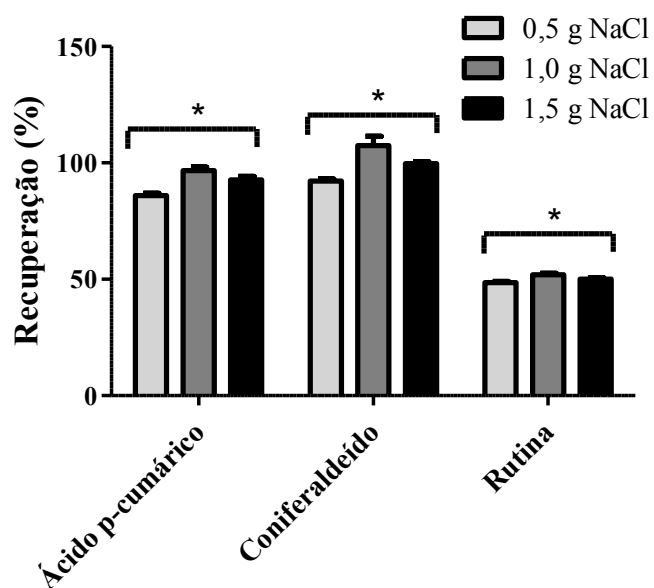
e secundários do adsorvente retém fortemente os analitos ácidos, a menos que haja uma quantidade de ácido suficiente para saturar o PSA, bloqueando as interações entre as hidroxilas dos analitos com o PSA, o que reforça a importância de avaliar a acidificação do solvente. Não foram observadas diferenças significativas entre a adição de 1 ou 2,5% de ácido fórmico, de acordo com teste  $t$  ( $p > 0,05$ ), portanto, a adição de 1% é suficiente para recuperação satisfatória dos analitos e saturação do PSA, sendo esta proporção adotada para os demais experimentos.

O método QuEChERS é dividido entre as etapas de extração e limpeza. Após a extração líquido-líquido com ACN acidificada é realizada a partição de fases por *salting-out*. O tipo e quantidade de sais adicionados nesta etapa influencia fortemente a separação das fases e a recuperação dos analitos. A adição das quantidades adequadas e a combinação de sais podem ser empregadas para o controle da quantidade de água a ser adicionada à fase orgânica e vice-versa, permitindo assim um certo grau de ajuste da polaridade das fases (ANASTASSIADES et al., 2003).

Com base nisso, o experimento 3 avaliou os sais utilizados na etapa de *salting-out*. O sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) foi mantido em concentração similar ao método original, 4 g, devido principalmente à sua marcante capacidade higroscópica. O  $MgSO_4$  foi submetido à secagem em temperatura de 500 °C durante 5 h, como recomendado por Anastassiades et al. (2003) para eliminar interferentes como ftalatos. Além do  $MgSO_4$ , foi adicionado cloreto de sódio (NaCl), em diferentes proporções 0,5, 1,0 e 1,5 g, aos 4 g de  $MgSO_4$ . Após adição dos sais, as amostras foram submetidas a agitação em vórtex por 1 min para solubilização. Os resultados estão apresentados na Figura 3.



**Figura 3.** Efeito da adição de NaCl na recuperação de compostos fenólicos em amostra de mel de melato de bracatinga extraídos pelo método de QuEChERS.



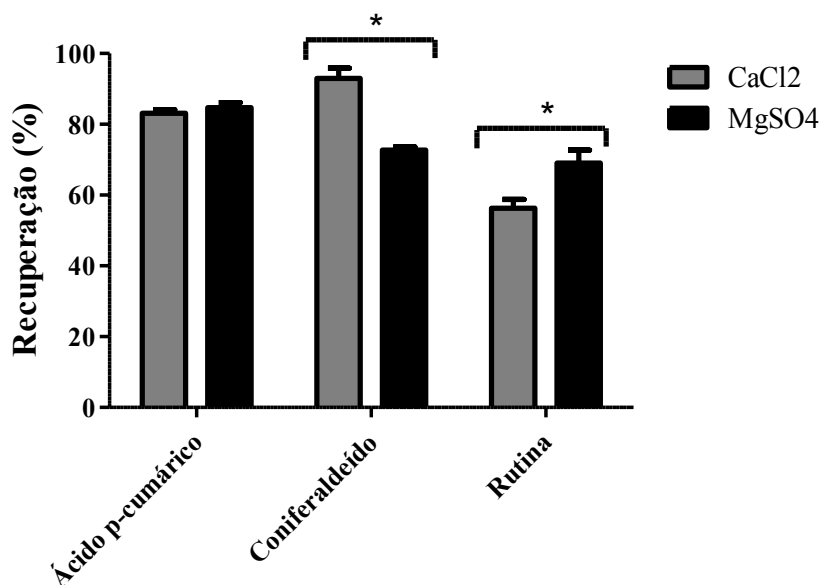
\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$ ;  
 Resultados expressos como média e desvio padrão entre as medições.  
 Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

A partir da Figura 3 foi possível observar que a adição de 1,0 g de NaCl promoveu os melhores percentuais de recuperação ( $p < 0,05$ ) para todos os analitos avaliados: ácido *p*-cumárico  $97 \pm 3\%$ , coniferaldeído  $107 \pm 1\%$  e rutina  $52 \pm 1\%$ . A adição de NaCl tem ligação direta com o aumento das recuperações de compostos polares e diminuição da extração de interferentes (ANASTASSIADES et al., 2003), aumentando a seletividade do método. Os resultados corroboram com o método original, que empregou 4 g de  $MgSO_4$  e 1 g de NaCl.

### 3.2 Etapa de *clean-up* dos extratos contendo compostos fenólicos

No experimento 4 foi estudada a etapa de *clean-up* (ou limpeza). Além da adição dos adsorventes  $C_{18}$  e PSA, para remoção de interferentes, principalmente açúcares, um sal é adicionado com o objetivo de remover quantidades remanescentes de água da fase orgânica. Foram avaliados os sais cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) e sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), 150 mg de cada, adicionados concomitantemente ao  $C_{18}$  e PSA. A Figura 4 apresenta os resultados.

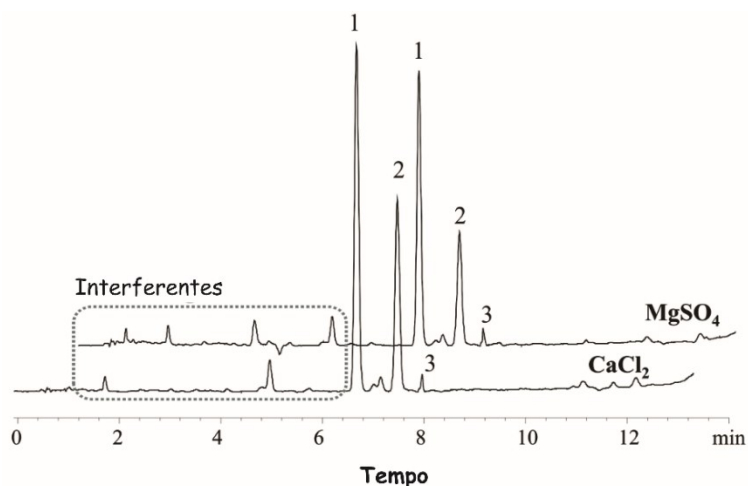
**Figura 4.** Efeito da adição de sais de limpeza na recuperação de compostos fenólicos em amostra de mel de melato de bracatinga extraídos pelo método de QuEChERS.



\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$ ;  
 Resultados expressos como média e desvio padrão entre as medições.  
 Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

Os sais adicionados têm como função reter a água remanescente após a etapa de *salting-out* e promover o aumento da força iônica do meio, provocando um aumento da capacidade de adsorção do PSA e do C<sub>18</sub> aos analitos e outros constituintes da matriz. Pequenas quantidades de água na fase orgânica e o aumento da força iônica favorecem a partição de analitos neutros para a fase orgânica (ACN). A recuperação do coniferaldeído foi de  $73 \pm 1\%$  quando o MgSO<sub>4</sub> foi utilizado e  $96 \pm 2\%$  com o emprego do CaCl<sub>2</sub>. A recuperação da rutina de  $69 \pm 6\%$  com MgSO<sub>4</sub> e  $56 \pm 4\%$  com CaCl<sub>2</sub> e para o ácido *p*-cumárico, não houve diferença na recuperação, independentemente do sal utilizado. A Figura 5 apresenta os cromatogramas referentes aos dois experimentos.

**Figura 5.** Cromatogramas da amostra de mel de melato fortificado com os padrões de ácido *p*-cumárico e coniferaldeído extraídos pelo método QuEChERS com dois tipos de sais na etapa de *clean-up*.



Legenda – 1, ácido *p*-cumárico; 2, coniferaldeído; 3, rutina.  
 Condições cromatográficas descritas no *item 2.4* do *Capítulo II*.  
 Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

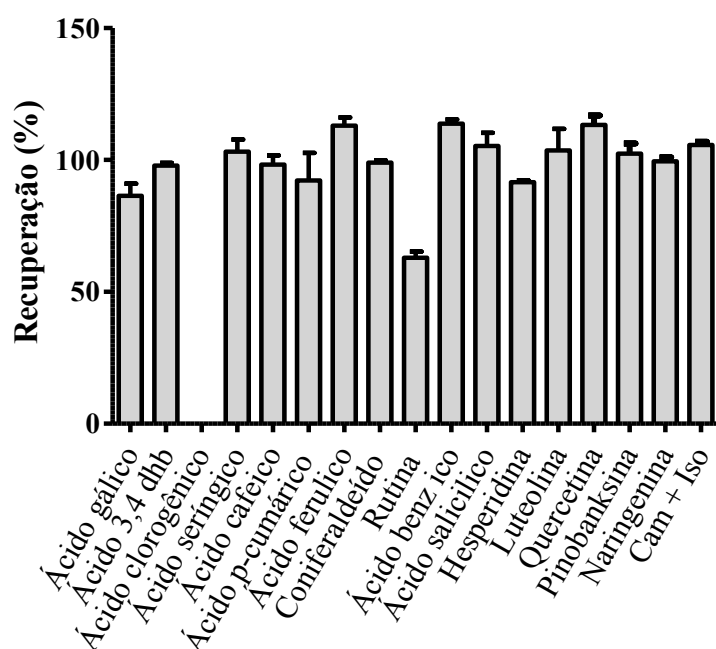
A partir da inspeção visual dos cromatogramas pode ser observada a presença de outras substâncias presentes na matriz, com características químicas semelhantes aos analitos alvo, e visualizados no cromatograma em que foi adicionado  $\text{MgSO}_4$ , sugerindo que o sal  $\text{CaCl}_2$  foi mais eficiente na remoção de interferentes. Com base nos percentuais de recuperação (Figura 4) e na análise dos cromatogramas, o  $\text{CaCl}_2$  foi escolhido como sal para a etapa de limpeza.

Mesmo após a padronização do método, o percentual de recuperação de rutina permaneceu abaixo do esperado, em torno de 60%. O método foi novamente conduzido com a dissolução dos três padrões ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada padrão) em água em substituição à fortificação da amostra de mel de melato de bracatinga a fim de verificar o comportamento do padrão sem a presença de interferência da matriz. Com a extração dos padrões a partir de uma solução aquosa, a recuperação aparente da rutina resultou em  $62 \pm 3\%$ . A baixa solubilidade da rutina em água,  $90 \text{ mg L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  (WANG et al., 2019b) deve ser considerada, uma vez que em geral, compostos fenólicos são melhor solubilizados em soluções alcoólicas. Contudo, a rutina já foi encontrada por outros autores em méis, com taxas de recuperação satisfatórias, como reportado por Zhu et al. (2019), com recuperação de 93% da rutina usando LLE com água acidificada e acetonitrila. Seraglio et al. (2016) também empregaram LLE com água deionizada em mel de melato de bracatinga e a recuperação de rutina foi de 100%, ressaltando que esta é a primeira

vez que o método QuEChERS, ou mesmo um preparo de amostras semelhante, é aplicado para extração de compostos fenólicos em mel.

O método padronizado foi aplicado à amostra de mel de melato de bracatinga fortificada com os padrões de todos os compostos fenólicos em estudo, a fim de avaliar a porcentagem de recuperação dos demais compostos. Foram adicionados  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada padrão, à exceção do campferol e isoramnetina, os quais foram adicionados em concentrações de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A Figura 6 apresenta as recuperações determinadas para os compostos fenólicos.

**Figura 6.** Recuperação dos compostos fenólicos em amostra de mel de melato de bracatinga fortificada e extraída pelo método QuEChERS.



Resultados expressos como média e desvio padrão entre as medições.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

Não foi detectada a recuperação do ácido clorogênico. As recuperações aparentes de todos os compostos fenólicos analisados variaram de  $63 \pm 4\%$  para a rutina a  $114 \pm 1\%$  para o ácido benzóico. As recuperações de 16 compostos estavam dentro dos limites aceitáveis recomendados de 70 a 120%, a depender da concentração esperada do analito, de acordo com o protocolo de validação adotado (EURACHEM, 2014), bem como os valores dos coeficientes de variação, que alcançaram valores entre 1,9 e 17,7%, dentro da faixa de 20% recomendada (EURACHEM, 2014). O ácido clorogênico e a rutina apresentaram valores de recuperação abaixo do esperado.

A sensibilidade do ácido clorogênico em temperaturas próximas a 50 °C já foi relatada (GIL; WIANOWSKA, 2017). Esta temperatura é facilmente atingida durante a execução do método de QuEChERS, na etapa de *salting out*, devido à reação exotérmica originada pela hidratação do MgSO<sub>4</sub> (ANASTASSIADES et al., 2003). A adsorção irreversível do ácido clorogênico à fase C<sub>18</sub> foi relatada por Trugo; Macrae (1984), durante a extração deste composto fenólico de amostras de café. O ácido clorogênico já foi encontrado em pequenas quantidades, da ordem de apenas 0,02 a 1,9 µg g<sup>-1</sup> em méis (MALGORZATA et al., 2020; SHEN et al., 2019; WANG et al., 2020a). Can et al. (2015) avaliaram 14 tipos de méis e não encontraram ácido clorogênico em nenhuma das amostras, submetidas a LLE com metanol. Estes relatos podem explicar por que o ácido clorogênico não foi recuperado da amostra de mel de melato de bracatinga.

Recuperações abaixo do esperado para o composto fenólico rotina foram observadas por Silva et al. (2011), com valores em torno de 60% em vinho tinto, utilizando um método de extração envolvendo o uso de adsorventes para limpeza do extrato. Os autores atribuíram o resultado à baixa polaridade do composto. Por sua vez, Rotta et al. (2019) aplicaram o método de QuEChERS para extrair compostos fenólicos em maracujá, com etapa de extração igual a do método original (ANASTASSIADES et al., 2003) e etapa de *clean-up* usando C<sub>18</sub> como adsorvente. As recuperações de rutina e ácido clorogênico foram maiores que 90% para ambos os analitos. A rutina pode ser termolábil assim como o ácido clorogênico (DAMMAK; SOBRAL, 2018), mas neste estudo apresentou maior estabilidade que este ácido provavelmente devido ao seu pKa (Apêndice A) superior e à sua polaridade, o que facilitou sua migração para a acetonitrila.

É importante salientar a importância dos resultados deste estudo, uma vez que a utilização do método de QuEChERS não é comum para extração de compostos fenólicos, sendo o primeiro estudo executado em mel, até o presente momento. A escolha dos sais e adsorventes utilizados no método QuEChERS modificado demonstrou eficiência, considerando a complexidade da composição do mel, principalmente pela concentração elevada de açúcares. Os resultados alcançados indicam a possibilidade de uso do método como rotina, uma vez que as recuperações atingidas foram aceitáveis, além de ser um método relativamente simples e de fácil execução, que demonstrou ser rápido, com o consumo de apenas 4 mL de solvente orgânico por amostra submetida à extração.

### **3.3 Aplicação do método de QuEChERS para extração de compostos fenólicos**

O método QuEChERS proposto foi aplicado para a extração de compostos fenólicos de amostras de mel de bracatinga. Os resultados estão apresentados na Tabela 4. Dezesesseis compostos fenólicos foram detectados nas amostras de mel de melato de bracatinga originadas da região sul do Brasil.



**Tabela 4.** Compostos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) presentes em amostras de mel de melato de bracatinga da região Sul do Brasil (conclusão).

	GAL	3,4-D	SIR	CAF	<i>p</i> -CU	FER	CON	RUT	SAL	HES	LUT	QUE	PIN	NAR	CAM/ ISO
31	n.d.	n.d.	15,9 ± 0,2	<LOD	<LOD	n.d.	<LOD	<LOD	n.d.	n.d.	10,4 ± 0,5	4,2 ± 0,8	n.d.	n.d.	n.d.
32	n.d.	n.d.	13,9 ± 0,3	n.d.	3,9 ± 0,2	n.d.	n.d.	9,9 ± 1,0	n.d.	n.d.	9,5 ± 0,6	<LOD	<LOD	<LOD	n.d.
33	<LOD	n.d.	n.d.	3,0 ± 0,1	<LOD	<LOD	n.d.	10,6 ± 0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	n.d.	n.d.	11,2 ± 1,6	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	17,0 ± 1,5	n.d.	n.d.
35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,0 ± 0,5	n.d.	n.d.	9,8 ± 1,7	n.d.	n.d.	14,8 ± 0,7	3,3 ± 0,6	n.d.	n.d.	9,6 ± 0,5
36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,7 ± 0,1	n.d.	n.d.	11,6 ± 1,6	n.d.	n.d.	7,4 ± 0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,7 ± 0,6	n.d.	n.d.	17,3 ± 1,0	n.d.	n.d.	23,0 ± 1,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
38	n.d.	4,3 ± 0,1	40,5 ± 2,5	n.d.	3,5 ± 0,1	n.d.	n.d.	26,2 ± 2,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD
39	n.d.	4,3 ± 0,1	11,2 ± 1,2	n.d.	<LOD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	n.d.	3,8 ± 0,2	11,5 ± 1,7	n.d.	2,8 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
41	<LOD	3,8 ± 0,8	10,1 ± 0,9	n.d.	<LOD	<LOD	n.d.	11,3 ± 0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,9 ± 0,2
42	n.d.	n.d.	14,9 ± 0,2	n.d.	<LOD	n.d.	n.d.	16,8 ± 2,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19,2 ± 0,7	n.d.	n.d.
43	<LOD	n.d.	12,5 ± 0,2	n.d.	4,8 ± 0,1	n.d.	n.d.	14,1 ± 1,4	n.d.	n.d.	8,0 ± 0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44	n.d.	n.d.	10,1 ± 0,9	n.d.	2,9 ± 0,1	n.d.	<LOD	10,9 ± 0,2	n.d.	n.d.	14,5 ± 0,4	13,2 ± 0,9	n.d.	n.d.	n.d.
45	n.d.	n.d.	36,4 ± 0,7	<LOQ	4,9 ± 0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,3 ± 0,8	5,5 ± 0,5	n.d.	n.d.	n.d.
46	n.d.	n.d.	5,2 ± 0,5	n.d.	<LOD	<LOD	n.d.	<LOD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	n.d.	n.d.	15,6 ± 0,3	n.d.	<LOD	<LOD	n.d.	10,1 ± 0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48	n.d.	n.d.	12,0 ± 0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	53,0 ± 2,7	n.d.
49	n.d.	n.d.	12,8 ± 0,9	n.d.	3,0 ± 0,1	n.d.	<LOD	8,5 ± 0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,9 ± 0,6	n.d.
50	<LOD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64,4 ± 8,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
51	<LOD	n.d.	24,3 ± 3,2	n.d.	3,9 ± 0,2	n.d.	n.d.	13,7 ± 2,6	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
52	n.d.	n.d.	35,9 ± 1,1	n.d.	6,4 ± 0,1	n.d.	n.d.	27,5 ± 1,1	n.d.	n.d.	8,7 ± 0,7	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD

Resultados expressos como média ± desvio padrão,  $n = 3$ . n.d., não detectado. <LOD, abaixo do limite de detecção. <LOQ, abaixo do limite de quantificação.

Compostos fenólicos: GAL, ácido gálico; 3,4-D, ácido 3,4-dihidroxibenzóico; SIR, ácido siríngico; CAF, ácido cafeico; *p*-CU, ácido *p*-cumárico; FER, ácido ferúlico; CON, coniferaldeído; RUT, rutina; SAL, ácido salicílico; HES, hesperidina; LUT, luteolina; QUE, quercetina; PIN, pinobanksina; NAR, naringenina; CAM, campferol e ISO, isoramnetina.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).



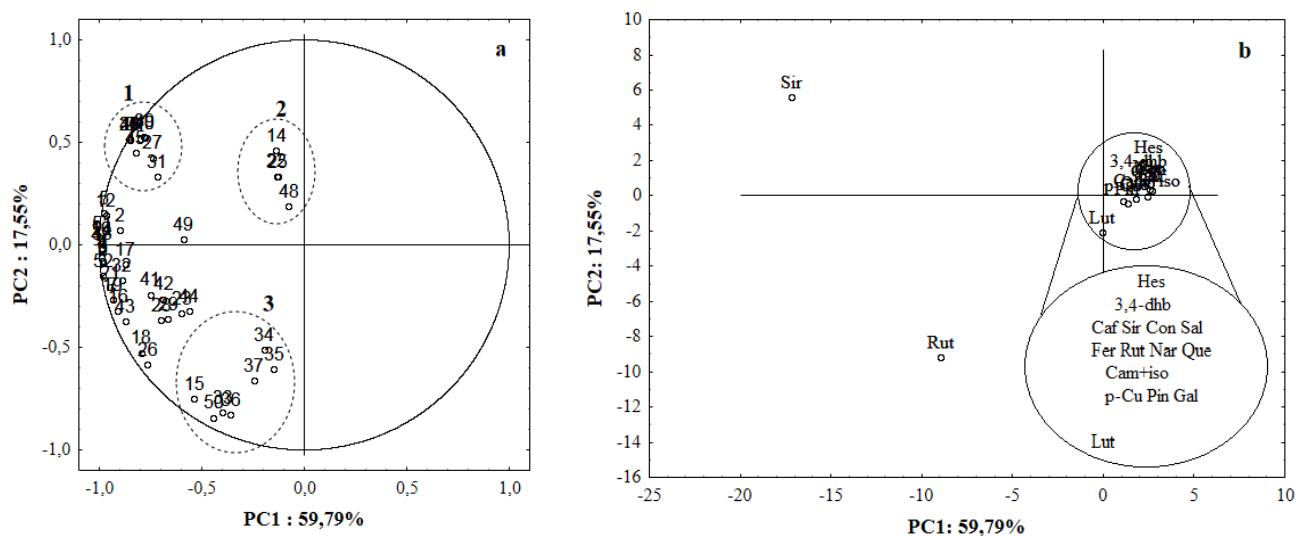
A partir dos resultados, foi observado que o ácido siríngico e a rutina foram os compostos encontrados na maioria das amostras de mel de melato de bracatinga analisadas. O ácido siríngico foi encontrado em 46 das 52 amostras, em teores variando de  $5,2 \pm 0,5$  a  $40,5 \pm 2,5 \mu\text{g g}^{-1}$  e a rutina foi encontrada em 35 amostras, variando de  $7,9 \pm 0,6$  a  $64,4 \pm 8,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Os ácidos cafeico e salicílico foram quantificados em apenas uma amostra cada. Campferol, isoramnetina e coniferaldeído foram encontrados em duas amostras cada.

A extração líquido-líquido com água deionizada já foi empregada anteriormente por Seraglio et al. (2016) para a extração de compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga, coletados em 2014, por LC-ESI-MS/MS. Os autores relataram concentrações de ácido siríngico que variaram de  $0,2 \pm 0,01$  a  $0,5 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$  e rutina de  $0,1 \pm 0,01$  a  $0,4 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Os resultados comprovam que o método QuEChERS foi eficiente para a extração de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga, devendo, porém, ser considerado que as amostras aqui avaliadas eram de diferentes colheitas daquelas analisadas por Seraglio et al. (2016), e que existem diversas fontes de variação envolvidas. As principais vantagens do método de extração proposto neste estudo foram o baixo custo, a simplicidade e a rapidez para obter recuperações aceitáveis dos compostos fenólicos.

Os resultados foram submetidos à PCA, apresentada na Figura 7, para estabelecer possíveis relações entre as amostras de mel de melato de bracatinga e confirmar se os compostos fenólicos poderiam diferenciar as amostras entre si. O componente principal 1 (PC1) explicou 59,8% da variabilidade e o componente 2 (PC2) explicou 17,6%, totalizando 77,4% de variabilidade explicada pelo modelo.

**Figura 7.** Gráficos de dispersão de PCA para (a) amostras de mel de melato de bracatinga relacionados à (b) composição de compostos fenólicos.



Legenda: Gal, ácido gálico; 3,4-dhb, ácido 3,4 dihidroxibenzóico; Caf, ácido cafeico; Sir, ácido siríngico; p-Cu, ácido *p*-cumárico; Fer, ácido ferúlico; Con, coniferaldeído; Rut, rutina; Sal, ácido salicílico; Hes, hesperidina; Que, quercetina; Nar, naringenina; Pin, pinobanksina; Lut, luteolina; Cam, campferol; Iso, isoramnetina. PC, componente principal.

Informações sobre as amostras vide Tabela 1.

Fonte: adaptado de Silva et al. (2019a).

A distribuição das amostras indicou a proximidade de amostras de mel de melato de bracatinga de acordo com a similaridade dos compostos fenólicos presentes. As amostras que se destacaram por seu conteúdo de ácido siríngico foram agrupadas no grupo 1 (Figura 7a). O grupo 3 correspondeu a amostras agrupadas por sua elevada concentração de rutina, a qual foi relacionada à PC2 (18,32% de contribuição baseada nas correlações - dados não mostrados) e a concentração de ácido siríngico relacionado à PC1 (67,8% de contribuição baseada nas correlações - dados não mostrados). O grupo 2 reuniu as três amostras com hesperidina em sua composição (14, 22 e 25) e a amostra com maior concentração de naringenina (48).

Os resultados mostraram que o ácido siríngico e os flavonoides rutina e hesperidina são potencialmente importantes para a diferenciação de amostras de mel de melato de bracatinga (Figura 7b). O ácido siríngico e a rutina já foram reportados na literatura em diversos méis florais, como acácia, trigo sarraceno, Manuka, entre outros (MALGORZATA et al., 2020; SHEN et al., 2019; TANLEQUE-ALBERTO; JUAN-BORRÁS; ESCRICHE, 2020; WANG et al., 2020b); além de já terem sido também encontrados em outros méis de melato (CAN et al., 2015; HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016). Contudo, não foi encontrado na literatura estudos que relataram a presença de hesperidina em méis, além do mel de melato de

bracatinga (SERAGLIO et al., 2016). Neste estudo, a hesperidina foi encontrada em apenas três amostras, 14, 22 e 25, sendo uma proveniente de Ibituba, SC, e as outras duas de Santa Terezinha, SC. A amostra 12 também é proveniente de Santa Terezinha, onde não foi detectada a presença de hesperidina.

Variações nas condições climáticas e de cultivo podem explicar a diferença entre o tipo e a concentração dos compostos fenólicos em amostras de diferentes cidades. Contudo, os resultados mostraram que a presença de compostos fenólicos em amostras da mesma cidade também pode estar relacionada ao genótipo da fonte de alimentação das abelhas, neste caso, o melato coletado no caule da bracatinga. Sendo assim, não foi possível separar as amostras analisadas pela origem geográfica, o que é compreensível, considerando que existem várias fontes de variação na produção do mel de melato de bracatinga.

O perfil de compostos fenólicos e a PCA já foram utilizados por alguns autores para diferenciar méis. Ávila et al. (2019) distinguiram o mel de abelha sem ferrão através da presença de hesperetina, quercetina e ácido *p*-cumárico. Wang et al. (2020) reportaram que a presença de ácido protocatecólico e ácido 4-hidroxibenzóico diferenciou méis de acácia puros de amostras adulteradas por absorção de resinas. Em seu estudo, Devi; Jangir; K.a. (2018) apontaram como marcadores os compostos fenólicos ácido homovanílico para mel de nim, zingerona para mel de gengibre, tricetina para mel de eucalipto e hesperetina e naringenina para mel de limão. Conseqüentemente, a PCA pode ser usada como uma ferramenta complementar para distinguir méis de melato de bracatinga de outros méis, com base na composição fenólica.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste estudo, um método, simples, rápido, e de baixo custo, baseado no método de extração QuEChERS, foi proposto para preparo de amostras para determinação de compostos fenólicos em amostras de mel de melato de bracatinga da região Sul do Brasil. O método adaptado consistiu na adição dos sais NaCl e MgSO<sub>4</sub> na etapa de *salting-out* e CaCl<sub>2</sub>, PSA e C<sub>18</sub> na etapa de limpeza em concentrações adaptadas a partir do método original, de forma a melhorar a eficiência do processo de extração.

As recuperações alcançadas foram satisfatórias, exceto para o ácido clorogênico, cuja recuperação não foi possível nestas condições e também pela rutina, que apresentou valores de recuperação em torno de 60%. As baixas recuperações destes compostos podem ser explicadas devido a interações com os sais e adsorventes utilizados nas etapas de extração e limpeza, além ainda da sensibilidade a temperaturas elevadas. O método QuEChERS foi empregado para a

extração de compostos fenólicos em 52 amostras de mel de melato de bracatinga. A PCA apontou que a hesperidina, a rutina e o ácido sirínico foram importantes para a separação entre as amostras e podem ser utilizados como uma ferramenta adicional na diferenciação de mel de bracatinga de outros méis, apesar de ser um resultado pontual e não conclusivo.

## CAPÍTULO IV

### **POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) FRENTE A MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR LPS**

As informações deste capítulo foram submetidas para publicação no periódico *Journal of Functional Foods* como *Effect of Mimosa scabrella Bentham honeydew honey on inflammatory mediators*.

## RESUMO

O potencial anti-inflamatório de méis de melato de bracatinga (MMB) foi avaliado considerando a modulação de mediadores inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Dezesseis amostras foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos e quanto à modulação dos parâmetros óxido nítrico e às citocinas: fator de necrose tumoral alfa; interleucina-6; proteína quimioatraente de monócitos 1; interleucina-12p70; interferon-gama; e interleucina-10. A viabilidade celular dos macrófagos não foi afetada pelo tratamento com mel e 12 das 16 amostras testadas modularam significativamente a expressão de óxido nítrico. Estas 12 amostras foram analisadas por sua capacidade de modulação das citocinas e todas mostraram significativa habilidade de regulação da expressão inflamatória. A amostra MMB 8, que apresentou maior número de compostos fenólicos determinados, seis no total, somando  $96,6 \mu\text{g g}^{-1}$ , pode ser destacada pelo potencial de modulação dos mediadores inflamatórios avaliados, em concentração de apenas  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados demonstraram que o efeito parece estar fortemente relacionado à presença de compostos fenólicos, considerando as diferenças no potencial anti-inflamatório entre as amostras consideradas. Este estudo confirmou pela primeira vez que o mel de melato de bracatinga desempenha um papel importante como alimento com propriedades funcionais, sugerindo seu uso para o tratamento auxiliar de distúrbios inflamatórios.

**Palavras-chave:** Mel de melato de bracatinga. Inflamação. Células RAW 264.7. Lipopolissacarídeos. Citocinas. Óxido nítrico. Compostos fenólicos.

## ABSTRACT

The anti-inflammatory potential of bracatinga honeydew honeys was evaluated considering the modulation of inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS. Sixteen samples were evaluated for the phenolic compounds content and the modulation of nitric oxide; tumour necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-6; monocyte chemoattractive protein 1; interleukin-12p70; interferon- $\gamma$ ; and interleukin-10. The cell viability of the macrophages was not affected by the treatment with honey and 12 of the 16 samples tested significantly modulated the expression of nitric oxide. These 12 samples were analyzed for their ability to modulate cytokines, and all showed significant ability to regulate inflammatory expression. The sample MMB 8 presented a higher concentration of determined phenolic compounds, sum  $96.6 \mu\text{g g}^{-1}$ , and can be highlighted by the potential for modulation of the inflammatory mediators evaluated, in a concentration of only  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The results showed that the effect seems to be strongly related to the presence of phenolic compounds, considering the differences in the anti-inflammatory potential between the samples considered. This study confirmed for the first time that bracatinga honeydew honey plays an important role as a functional food, suggesting its application for the auxiliary treatment of inflammatory disorders.

**Keywords:** Bracatinga honeydew honey. Inflammation. RAW 264.7 cells. Lipopolysaccharides. Cytokines. Nitric oxide. Phenolic compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

O mel tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de úlceras, feridas crônicas e queimaduras diversas (IACOPETTI et al., 2020; MAYER et al., 2014; ORYAN; ALEMZADEH; MOHAMMADI, 2019; ZELENÍKOVÁ; VYHLÍDALOVÁ, 2019), por apresentar propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, comprovadas por meio de diversos estudos (ESCUREDO et al., 2013; GASPARRINI et al., 2018; LUKASIEWICZ; KOWALSKI; MAKAREWICZ, 2015). A facilidade de inclusão de produtos naturais, como o mel, na dieta humana, tem despertado interesse na sua aplicação como atenuantes de processos inflamatórios e para prevenir doenças e lesões mais comuns, devido à comprovada eficácia, ampla disponibilidade e variedade, baixa toxicidade e baixo custo.

Os méis de melato como o de bracinga, por exemplo, já foram caracterizados por seu teor de compostos fenólicos (HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016; SILVA et al., 2019a), os quais estão frequentemente associados a atividades biológicas benéficas (FINIMUNDY et al., 2018; GASPARRINI et al., 2018; RACHED et al., 2018). Dentre as atividades biológicas, a atuação dos compostos fenólicos é sugerida como estratégia para mitigação de doenças inflamatórias crônicas (COSCO et al., 2016; HAM et al., 2016; KHAJEVAND-KHAZAEI et al., 2018), cuja incidência tem aumentado relevantemente.

O processo inflamatório crônico ocorre em nível celular quando são observados efeitos adversos de forma não controlada. Uma das características deste processo é a ativação de uma resposta imune persistente, com a presença principalmente de macrófagos no tecido inflamado. Em mamíferos, a inflamação é induzida na tentativa de defender o corpo contra patógenos e reparar danos teciduais, sendo este o mecanismo de defesa primário, também chamado de sistema imune inato. Alguns estudos têm destacado o potencial de compostos fenólicos como mediadores de processos inflamatórios desencadeados por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) (REBOLLO-HERNANZ et al., 2019; WANG et al., 2019c). Os LPS estão presentes nas paredes celulares de bactérias gram-negativas e são considerados como os mais potentes iniciadores de inflamação. Depois de ativados, os macrófagos liberam diversos mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico e algumas citocinas, que desempenham diferentes funções e fornecem diferentes respostas aos sinais de estresse do organismo (GASPARRINI et al., 2018; ZHANG; TSAO, 2016).

Alguns relatos sobre o desempenho de méis de melato contra respostas inflamatórias já foram publicados (CERNAK et al., 2012; MAJTANOVA et al., 2015; MAYER et al., 2014; VLCEKOVA et al., 2012). Os resultados são promissores e demonstram carência de estudos



mecanísticos de atividade anti-inflamatória de méis de melato, principalmente o mel de melato de bracatinga.

Estudos sobre propriedades bioativas a nível celular em mel de melato de bracatinga são inexistentes até o momento, tornando imprescindível a investigação dos reais efeitos benéficos do consumo deste mel a fim de valorizar um produto regional ainda pouco consumido no Brasil. Uma vez que estudos que exploram o potencial anti-inflamatório de méis de melato de bracatinga ainda não foram conduzidos, neste trabalho, a proposta foi avaliar o potencial de méis de melato de bracatinga contra mediadores inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. A capacidade de modular mediadores pró e anti-inflamatórios foi estudada, a fim de melhor entender os efeitos protetores desse mel.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes**

Para a quantificação de compostos fenólicos foram utilizados os padrões e os reagentes de grau HPLC descritos no *item 2.1 do Capítulo II*. Os adsorventes e sais utilizados para a extração de compostos fenólicos foram previamente descritos no *item 2.1 do Capítulo III*. O meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina foram obtidas de Gibco (Grand Island, Nova York, E.U.A.); e dexametasona e lipopolissacarídeo (LPS) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Os macrófagos RAW 264.7 foram obtidos da *American Type Cell Culture* (ATCC, Rockville, MD).

### **2.2 Amostras**

Dezesseis amostras de mel de melato de bracatinga (MMB) foram coletadas e fornecidas por apicultores do estado de Santa Catarina durante a safra de 2018, nas mesmas condições já descritas no *item 2.3 do Capítulo II*. As amostras estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Origem geográfica e data de coleta das amostras de mel de melato de bracatinga.

<b>Código</b>	<b>Cidade</b>	<b>Mês e ano de coleta</b>
MMB 1	Urubici – SC	04/2016
MMB 2	Bocaina do Sul – SC	06/2016
MMB 3	Bocaina do Sul – SC	06/2016
MMB 4	Bom Retiro – SC	05/2016
MMB 5	Bom Retiro – SC	05/2016
MMB 6	São Joaquim- SC	04/2016
MMB 7	São Joaquim- SC	04/2016
MMB 8	Urupema – SC	05/2016
MMB 9	Urupema – SC	07/2018
MMB 10	Bom Retiro – SC	07/2018
MMB 11	Água Doce – SC	07/2018
MMB 12	Monte Castelo – SC	07/2018
MMB 13	General Carneiro – PR	09/2018
MMB 14	General Carneiro – PR	09/2018
MMB 15	General Carneiro – PR	09/2018
MMB 16	Santa Terezinha – SC	07/2018

Fonte: o próprio autor (2019).

### **2.3 Determinação de compostos fenólicos nas amostras de mel**

A extração de compostos fenólicos foi realizada de acordo com o procedimento descrito no *item 2.3 do Capítulo III* e publicado por Silva et al. (2019a). A identificação e quantificação foi realizada de acordo com o método de Silva et al. (2019b) descrito no *item 2.3 do Capítulo II*.

### **2.4 Ensaio de viabilidade celular**

A viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 foi avaliada após o tratamento com mel de melato de bracatinga, pelo ensaio do sal de tetrazólio do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol) (MOSMANN, 1983). As células foram cultivadas em frascos plásticas apropriadas com o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativo, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, em incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Antes dos tratamentos, o número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão do azul de tripano. As células foram distribuídas em microplacas de cultura de 96 cavidades (1 x 10<sup>4</sup> células por cavidade) e

incubadas com MMB em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) diluídas em meio DMEM; por 24 h. Após o período de incubação, o meio foi removido e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  de MTT e as placas foram incubadas por 2 h. Após este período, o meio foi removido e o precipitado de formazan foi dissolvido em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO em cada poço. Finalmente, a absorbância da amostra foi medida em 540 nm. A absorbância obtida para o grupo branco (células não tratadas, incubadas apenas com meio de crescimento) foi considerada como 100% de células viáveis. Todos os ensaios foram realizados em triplicata de preparo.

## **2.5 Indução da inflamação em macrófagos por LPS**

Os macrófagos foram inicialmente cultivados em placas de 96 cavidades ( $2 \times 10^5$  células por cavidades) por 48 h para aderência e confluência completa. Após a adesão total dos macrófagos na placa, as células foram distribuídas em diferentes grupos ( $n = 3$  por grupo), sendo eles: (a) branco (não exposto ao LPS), células pré-tratadas apenas com o veículo (DMSO 1% em solução salina 0,9%); (b) controle negativo (inflamado com LPS), células também pré-tratadas com o veículo; (c) controle positivo (tratamento padrão), células pré-tratadas com dexametasona (7  $\mu\text{M}$ ) e (d) grupos experimentais, células pré-tratadas com MMB em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em meio DMEM). Após 1 h de incubação, as células foram estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24 h (DUARTE et al., 2017). Os sobrenadantes foram coletados para avaliação da produção de nitrito/nitrato. Finalmente, para análises posteriores da secreção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$  e IL-10), foi usada a concentração de cada amostra de mel de melato de bracatinga que proporcionou maior redução significativa dos níveis de óxido nítrico.

## **2.6 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos**

O acúmulo de nitrito no meio de cultivo celular foi quantificado como indicador da produção de óxido nítrico (NO) com base na reação de Griess (GREEN et al., 1982). Após o tratamento dos macrófagos com mel de melato de bracatinga (1, 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) seguido de estimulação com LPS (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), foram coletados 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura celular. O mesmo foi misturado com volume igual de reagente de Griess e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida a 540 nm e uma curva padrão de nitrito (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) foi construída.

## 2.7 Quantificação de citocinas em macrófagos

Os níveis das seguintes citocinas pró e anti-inflamatórias: fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), interleucina-12p70 (IL-12p70), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e interleucina-10 (IL-10) foram determinados nos sobrenadantes do meio de cultura celular por citometria de fluxo (BD Biosciences FACS Verse<sup>®</sup>, San Jose, Califórnia, E.U.A.) usando o kit comercial BD<sup>®</sup> Cytometric Bead Array (CBA) (San Jose, Califórnia, E.U.A.). Os dados foram analisados usando o *software* FCAP Array<sup>®</sup>.

## 2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em três replicatas independentes e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou erro padrão da média (EPM). O intervalo de confiança de 95% foi adotado para todas as análises. As diferenças estatísticas entre os grupos foram testadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de *Tukey*, usando o *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, E.U.A.).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Compostos fenólicos nas amostras de MMB

A concentração de compostos fenólicos encontrados nas amostras de MMB foi determinada previamente e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Compostos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de MMB.

	MMB 1	MMB 2	MMB 3	MMB 4	MMB 5	MMB 6	MMB 7	MMB 8	MMB 9	MMB 10	MMB 11	MMB 12	MMB 13	MMB 14	MMB 15	MMB 16
GAL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,9±0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	11,9±0,7	<LOD	<LOQ	4,1 ± 0,4
3,4-D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28,8±0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,4±0,1
CLO	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SIR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19,9±1,1	28,2±2,2	19,8±1,2	40,1±3,6	7,8±0,6	14,5±2,4	30,9±1,7	7,5±0,7
CAF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -CU	n.d.	n.d.	3,4±0,1	7,0±0,4	n.d.	2,8±0,1	2,8±0,2	n.d.	n.d.	2,8±0,1	<LOQ	4,2±0,4	n.d.	n.d.	2,7 ± 0,7	n.d.
FER	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	2,0±0,1	n.d.	n.d.	<LOD	3,9±0,3
CON	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	3,3±0,1	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	3,2±0,3
RUT	<LOQ	19,5±1,3	26,0±2,1	28,6±1,1	8,4±0,3	10,0±0,4	7,3±0,4	21,5±1,8	n.d.	13,7±1,5	8,8±0,6	16,8±0,7	53,8±6,7	n.d.	<LOD	n.d.
BEN	5,7±0,1	5,5±0,2	5,8±0,1	n.d.	5,8±0,2	7,0±0,3	6,8±0,4	15,2±0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SAL	<LOQ	8,0±0,3	9,6±0,4	n.d.	n.d.	n.d.	7,8±0,6	20,1±0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HES	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	n.d.	16,0±2,6
LUT	16,0±0,4	n.d.	11,2±0,6	14,8±0,4	n.d.	8,0±0,7	6,8±0,4	9,8±0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
QUE	46,4±2,4	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PIN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14,5±0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NAR	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,2±0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD
CAM/ISO	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	n.d.	n.d.	<LOD	<LOD	n.d.
Soma	68,1	33,0	56,0	50,4	16,1	17,8	31,5	96,6	19,9	59,2	31,9	63,1	73,5	14,5	33,6	41,1

Resultados expressos como média ± desvio padrão,  $n = 3$ . n.d, não detectado. <LOD, abaixo do limite de detecção. <LOQ, abaixo do limite de quantificação. LOD e LOQ determinados de acordo com Silva et al. (2019b) e descritos no *Capítulo II*.

Compostos fenólicos: GAL, ácido gálico; 3,4-D, ácido 3,4-dihidroxibenzóico; CLO, ácido clorogênico; SIR, ácido siríngico; CAF, ácido cafeico; *p*-CU, ácido *p*-cumárico; FER, ácido ferúlico; CON, coniferaldeído; RUT, rutina; BEN, ácido benzóico; SAL, ácido salicílico; HES, hesperidina; LUT, luteolina; QUE, quercetina; PIN, pinobanksina; NAR, naringenina; CAM, campferol e ISO, isoramnetina.

Fonte: o próprio autor (2019).

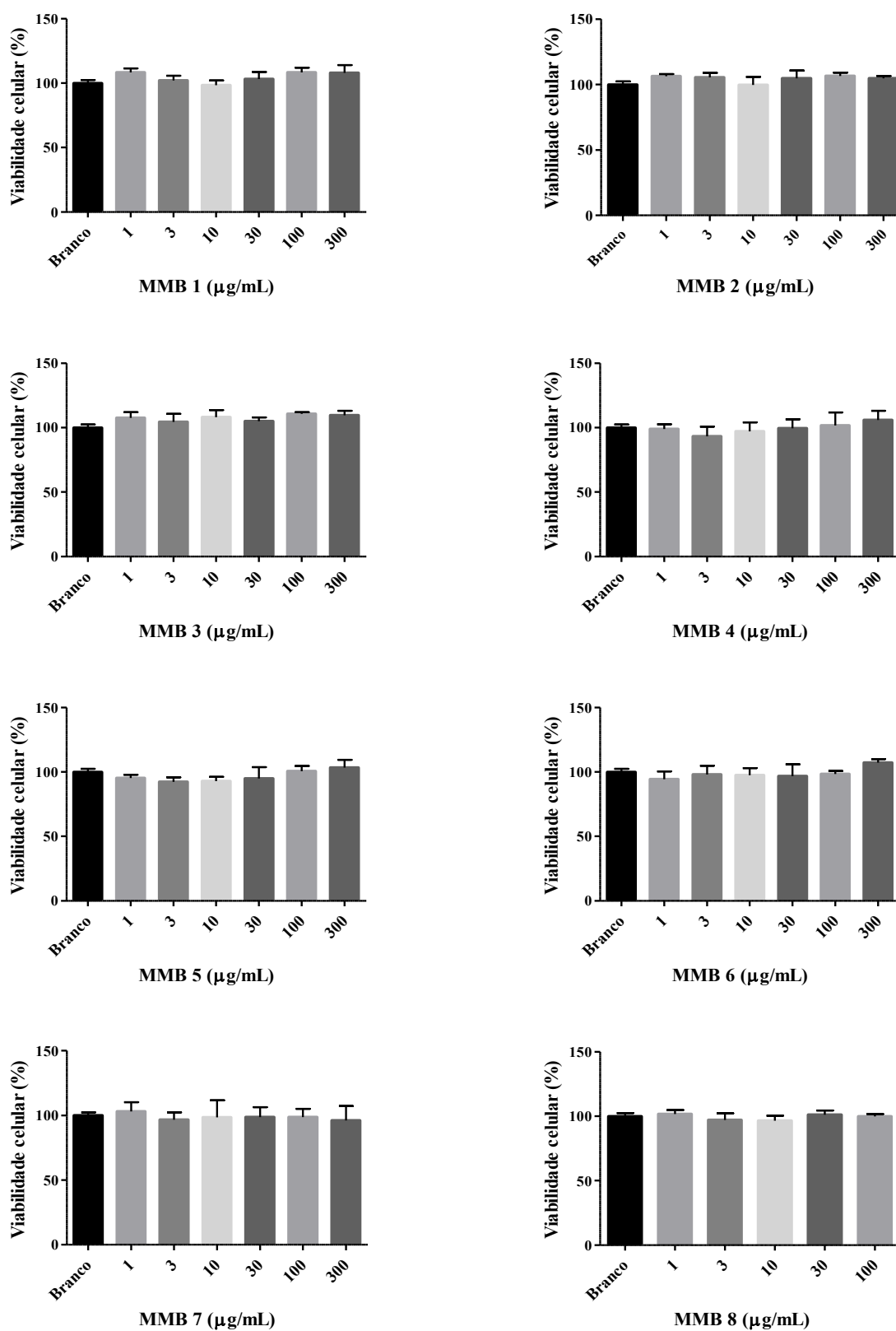
Dentre os compostos fenólicos analisados, 14 foram quantificados nas amostras de mel. Não foram quantificados os ácidos cafeico e clorogênico e os flavonoides campferol e isoramnetina. Rutina foi o composto mais abundante, quantificado em dez das 16 amostras. Além disso, o ácido sirínico foi quantificado em oito amostras, enquanto os ácidos *p*-cumárico e benzóico em sete, luteolina em seis amostras, ácido salicílico em quatro, ácido gálico em três amostras, ácido ferúlico, coniferaldeído e ácido 3,4-dihidroxibenzóico em duas amostras e finalmente, hesperidina, pinobanksina, quercetina e naringenina em apenas uma amostra. A soma dos compostos fenólicos variou de 14,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (MMB 14) a 96,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  (MMB 8). O maior número de compostos fenólicos foi quantificado na amostra MMB 8, totalizando seis compostos, e nas amostras MMB 14 e MMB 9 foi determinado somente o ácido sirínico.

Os ácidos fenólicos encontrados nas amostras avaliadas já foram identificados em outros tipos de mel de melato, como de carvalho, pinho e abeto (CAN et al., 2015; DAHER; GÜLAÇAR, 2008; HAROUN et al., 2012). Em relação aos flavonoides, até o momento, a presença de luteolina foi observada apenas em méis de melato de bracatinga (SERAGLIO et al., 2016; SILVA et al., 2019a), enquanto que a rutina e naringenina já foram encontradas em méis de melato de outras origens (CAN et al., 2015; HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016).

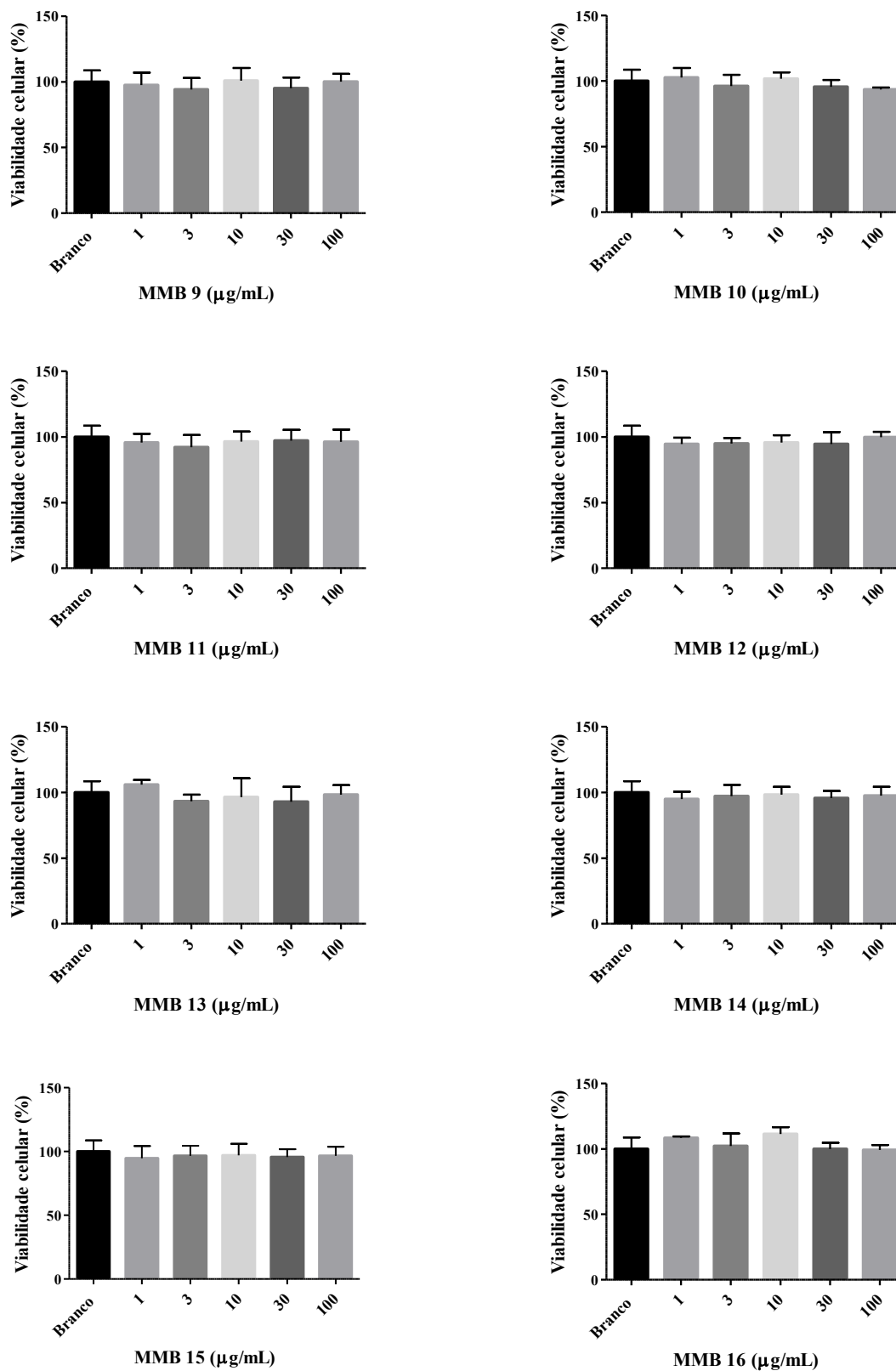
### **3.2 Efeito do MMB na viabilidade celular de macrófagos**

Foi avaliado o efeito dos méis de melato de bracatinga na viabilidade dos macrófagos RAW 264.7, conforme apresentado na Figura 1.

**Figura 1.** Viabilidade de macrófagos RAW 246.7 após tratamento com MMB (1 - 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).  
1). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (continua).



**Figura 1.** Viabilidade de macrófagos RAW 246.7 após tratamento com MMB (1 - 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )  
1). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (conclusão).



Fonte: o próprio autor (2019).



Foi possível observar a partir da Figura 1 que a viabilidade celular não foi afetada pela presença de nenhuma das amostras, independentemente da concentração empregada (1 - 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou da diferença de composição entre as amostras. A possibilidade de que o MMB possua efeito protetor para as células pode ser levada em consideração. Este efeito em macrófagos RAW 264.7 já foi verificado anteriormente por Afrin et al. (2018) empregando mel de Manuka. Os autores reportaram aumento do número de células viáveis e redução do número de células mortas, após tratamento com 8  $\text{mg mL}^{-1}$  de mel de Manuka e estimulação das células com LPS.

### **3.3 Efeito do MMB nos níveis de óxido nítrico (NO)**

Os níveis de NO nos diferentes grupos de tratamento estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Efeito do MMB na redução dos níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

Grupo		Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				
		1	3	10	30	100
Branco	$5,5 \pm 2,1$	----	----	----	----	----
Controle negativo (LPS, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	$29,4 \pm 5,6$ (###)	----	----	----	----	----
Controle positivo (Dex, $7 \mu\text{M}$ )	$12,4 \pm 1,4$	----	----	----	----	----
MMB 1	----	$22,2 \pm 1,9^*$	$18,5 \pm 0,8^*$	<b><math>14,3 \pm 1,4^{***}</math></b>	$17,9 \pm 1,6^{***}$	$12,4 \pm 1,4^{***}$
MMB 2	----	$21,9 \pm 1,2^*$	$20,4 \pm 2,3^*$	$20,2 \pm 3,6^*$	<b><math>17,2 \pm 0,8^{**}</math></b>	$15,6 \pm 0,8^{***}$
MMB 3	----	$21,8 \pm 2,1^*$	$21,4 \pm 2,3^*$	$20,3 \pm 2,6^{**}$	<b><math>19,4 \pm 2,7^{**}</math></b>	$22,9 \pm 1,3^*$
MMB 4	----	$27,6 \pm 1,8$	$28,1 \pm 0,6$	$23,3 \pm 0,8^*$	<b><math>21,4 \pm 2,9^{**}</math></b>	$22,5 \pm 2,4^*$
MMB 5	----	$27,3 \pm 1,4$	$27,5 \pm 1,3$	$27,1 \pm 2,1$	$27,7 \pm 1,5$	$26,7 \pm 1,9$
MMB 6	----	$29,7 \pm 1,3$	$27,9 \pm 1,3$	$28,7 \pm 1,4$	$27,9 \pm 2,3$	$12,4 \pm 1,4$
MMB 7	----	$28,3 \pm 2,1$	$27,3 \pm 1,4$	$23,9 \pm 2,3$	$23,1 \pm 2,3^*$	<b><math>20,5 \pm 2,7^*</math></b>
MMB 8	----	$22,4 \pm 1,2^*$	<b><math>15,1 \pm 0,4^{***}</math></b>	$15,5 \pm 1,8^{***}$	$14,7 \pm 1,4^{***}$	$18,8 \pm 1,0^{**}$
MMB 9	----	$28,7 \pm 3,7$	$25,7 \pm 2,0$	$25,4 \pm 1,2$	<b><math>21,7 \pm 0,9^*</math></b>	$21,7 \pm 0,9^*$
MMB 10	----	$19,4 \pm 1,7^*$	$19,8 \pm 1,6^*$	$20,0 \pm 4,2^*$	<b><math>18,4 \pm 2,0^{**}</math></b>	$17,6 \pm 1,5^{**}$
MMB 11	----	$24,4 \pm 2,5$	<b><math>15,4 \pm 1,3^{***}</math></b>	$15,0 \pm 2,0^{***}$	$16,2 \pm 1,1^{***}$	$19,2 \pm 1,3^*$
MMB 12	----	$22,8 \pm 3,5$	$22,3 \pm 2,4$	$22,2 \pm 1,6^*$	<b><math>19,4 \pm 1,5^{**}</math></b>	$21,7 \pm 1,7^{**}$
MMB 13	----	$21,8 \pm 2,2^*$	$20,2 \pm 3,0^*$	<b><math>17,8 \pm 2,4^{**}</math></b>	$17,9 \pm 2,6^{**}$	$17,8 \pm 2,1^{**}$
MMB 14	----	$28,1 \pm 2,2$	$23,3 \pm 1,8$	$23,0 \pm 1,0^*$	$22,3 \pm 1,8^*$	<b><math>20,4 \pm 2,5^{**}</math></b>
MMB 15	----	$34,9 \pm 1,3$	$30,5 \pm 1,6$	$27,6 \pm 1,7$	$27,0 \pm 3,0$	$22,7 \pm 3,8$
MMB 16	----	$34,9 \pm 0,6$	$33,3 \pm 1,1$	$28,4 \pm 1,0$	$28,1 \pm 2,4$	$29,0 \pm 2,2$

Branco, células pré-tratadas apenas com veículo (DMSO). Controle negativo, células pré-tratadas com veículo e estimuladas com LPS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Controle positivo, células pré-tratadas com dexametasona ( $7 \mu\text{M}$ ) e estimuladas com LPS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). MMB, células pré-tratadas com méis de melato de bracinga em diferentes concentrações ( $1-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e estimuladas com LPS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 5/\text{grupo}$ . ### $p < 0,001$  comparado ao grupo Branco; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo Controle negativo.

Resultados em negrito representam as concentrações de cada amostra que proporcionaram inibição mais eficaz de NO, ou seja, menor concentração que proporcionou maior redução significativa dos níveis de NO.

Fonte: o próprio autor (2019).

Após a incubação dos macrófagos com LPS, a produção de NO aumentou aproximadamente 5,3 vezes quando comparada às células não expostas ao LPS (branco), e os níveis de NO foram significativamente inibidos pelo tratamento com MMB. Todas as concentrações testadas foram eficientes para a inibição de NO e foi observado que a intensidade da inibição foi dependente da concentração de mel empregada.

As amostras MMB 5, 6, 15 e 16 não demonstraram efeito significativo de inibição do NO em macrófagos. As amostras MMB 1, 2, 3, 8, 10 e 13 inibiram significativamente a produção de NO, independentemente da concentração empregada. As amostras MMB 7 e 9 foram eficientes como inibidoras da produção de NO somente quando as maiores concentrações foram aplicadas (30 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Considerando as concentrações mais efetivas de cada amostra para inibição dos níveis de NO, os resultados variaram entre 26,1% (MMB 1) e 51,3% (MMB 9) de inibição. Por sua vez, o grupo controle positivo (dexametasona 7  $\mu\text{M}$ ) reduziu os níveis de NO liberados pelos macrófagos em 57,8%.

A produção de NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzível e a sua superprodução por células imunes está associada à ativação de macrófagos, resultando em várias desordens inflamatórias. Portanto, a produção de NO pode ser um indicativo do estágio da inflamação, tanto aguda quanto crônica. Como o NO tem a capacidade de adentrar nas células sem receptores celulares, é usado em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (FLORENTINO et al., 2017; LAGO et al., 2014). A inibição de NO está fortemente associada a compostos fenólicos (BILUCA et al., 2020; KARUNAKARAN et al., 2018), o que pode explicar a diferença na inibição de NO pelas amostras de mel consideradas.

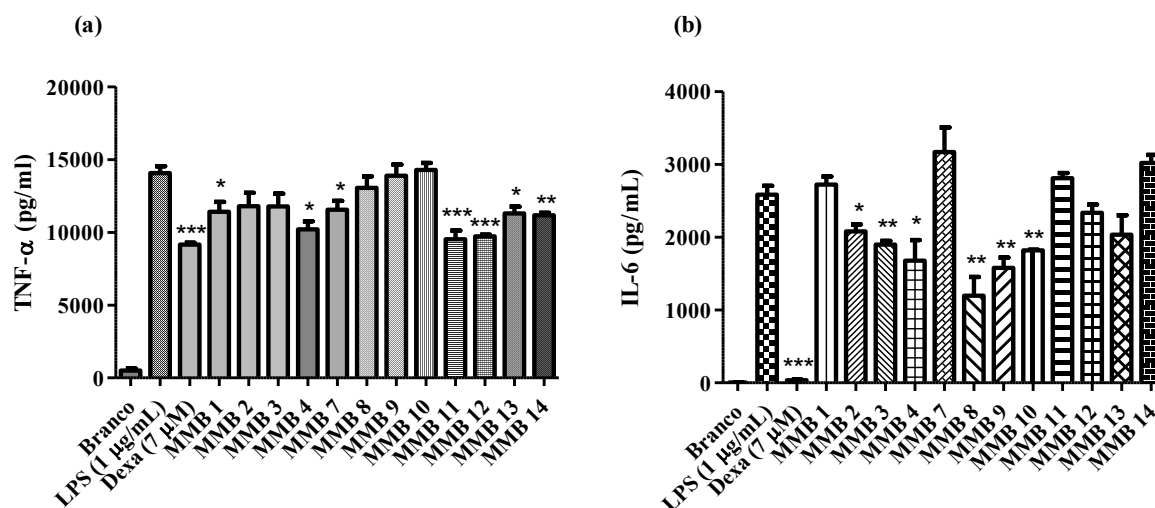
Considerando os efeitos nos ensaios de viabilidade celular e na produção de NO, foram selecionadas as concentrações de méis de melato de bracinga para os ensaios posteriores, que avaliaram os diferentes níveis de inibição de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$ , e IL-10) frente a diferentes concentrações de mel adicionadas ao sistema. As concentrações selecionadas foram destacadas em negrito na Tabela 3. Uma vez que as amostras MMB 5, 6, 15 e 16 não apresentaram capacidade de inibir a produção de NO pelas células, tampouco foram consideradas para a inibição de citocinas.

### **3.4 Efeito do MMB nos níveis das citocinas**

Em macrófagos, a estimulação com LPS induz as células a produzirem citocinas. Estas desempenham o papel de mediadores endógenos da inflamação por meio de interações com

várias células-alvo que são mediadas por receptores (DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002). A Figura 2 apresenta os resultados de inibição das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6.

**Figura 2.** Efeitos do MMB nos níveis de (a) TNF- $\alpha$  e (b) IL-6 em macrófagos tratados com LPS. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 3/\text{grupo}$ . \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle negativo (LPS), intervalo de confiança de 95%.



Concentrações empregadas: MMB 1 e MMB 13, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; MMB 2, MMB 3, MMB 4, MMB 9, MMB 10, MMB 12, 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; MMB 7 e MMB 14, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; MMB 8, e MMB 11, 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Fonte: o próprio autor (2019).

A secreção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos expostos ao LPS promoveu um aumento de 29,3 vezes em comparação com as células não expostas. O tratamento das células com as amostras de MMB 1, 4, 7, 11, 12, 13 e 14 reduziu significativamente a secreção de TNF- $\alpha$ , variando de 21,4% (MMB 7) a 35,2% (MMB 11) de inibição (Figura 2a). O uso de dexametasona inibiu esse parâmetro em 35%. A secreção de IL-6 (Figura 2b), por sua vez, foi significativamente reduzida após o tratamento com MMB 2, 3, 4, 8, 9 e 10, variando de 19,5% (MMB 2) a 53,7% (MMB 8). A dexametasona reduziu a secreção de IL-6 em 98,6%. Os macrófagos tratados com LPS produziram 680 vezes mais IL-6 quando comparados às células não expostas ao LPS.

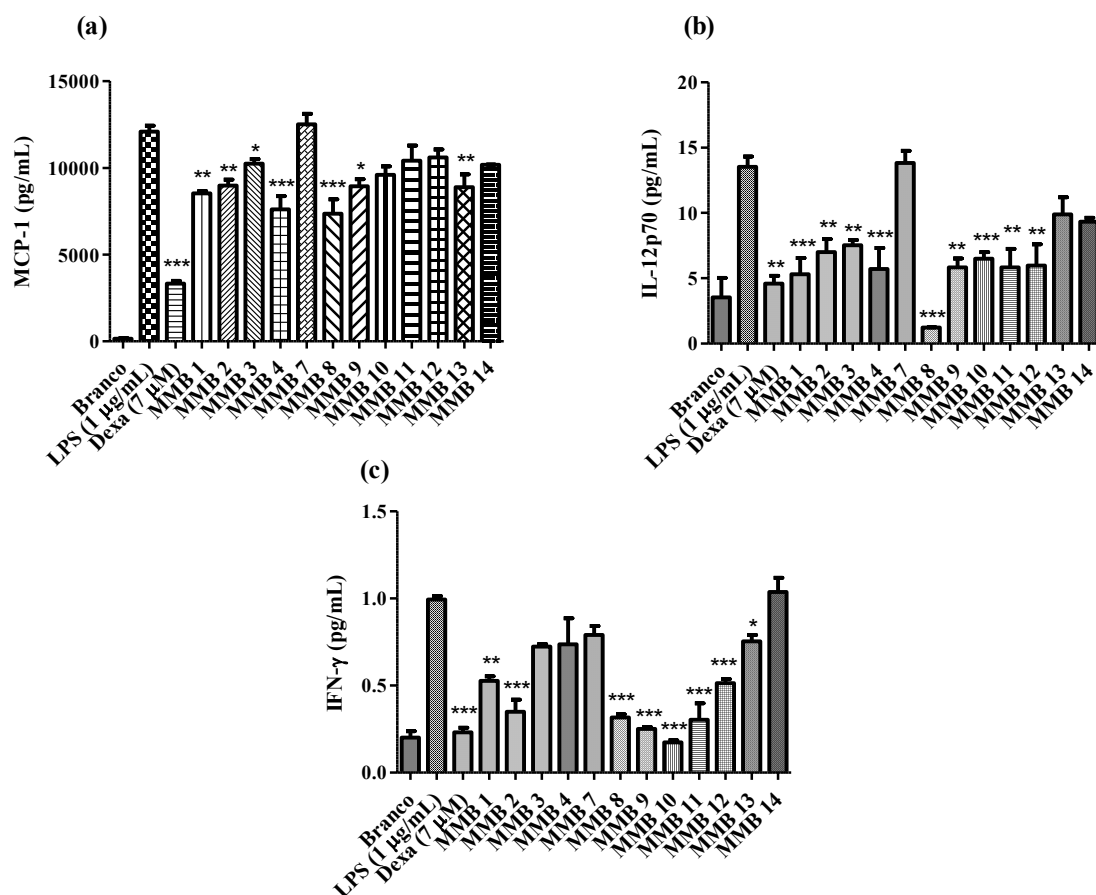
TNF- $\alpha$  e IL-6 são citocinas multifuncionais da resposta inata, sendo que o TNF- $\alpha$  regula positivamente a produção de outras citocinas pró-inflamatórias importantes, como a IL-1 $\beta$  (LAGHA; GRENIER, 2019). O TNF- $\alpha$  inicia a comunicação celular em condições patológicas, interagindo com outros mediadores, amplificando os sinais celulares e modulando a expressão do receptor na superfície celular (CANDIRACCI et al., 2012; LAGHA; GRENIER, 2019). A

inibição de 50% da produção de TNF- $\alpha$  com o uso de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de mel de Manuka foi relatada por Candiracci et al. (2012). Gasparrini et al. (2018), por sua vez, relataram inibição da expressão de TNF- $\alpha$  em 40% com o emprego de 8  $\text{mg mL}^{-1}$  de mel de Manuka em macrófagos estimulados por LPS. Os resultados aqui apresentados demonstraram que o MMB apresentou relevante ação na inibição da citocina com baixas concentrações. Existem ainda relatos de aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em células tratadas com mel de jujuba e de Manuka (MESAIK et al., 2015; TONKS et al., 2007), atribuído à presença de proteínas.

A IL-6 é produzida nos tecidos inflamados e estimula a produção de proteínas na fase aguda da inflamação. Essas proteínas refletem a presença e a intensidade da inflamação e podem ser usadas como um guia para seu diagnóstico e controle (HUSSEIN et al., 2012). Existem relatos contraditórios na literatura a respeito do efeito de méis na expressão desta citocina. Tonks et al. (2007) sugeriram que o mel de Manuka estimula a produção de IL-6, enquanto Hussein et al. (2012) sugeriram a redução da expressão usando mel de Melaleuca. Essas controvérsias podem ser explicadas pelo tipo e concentração de mel empregados, e o tipo de ensaio conduzido - *in vivo* ou *in vitro*. Os resultados relatados para o MMB são importantes considerando a capacidade de redução da expressão de IL-6 observada quando concentrações de apenas 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram empregadas.

A Figura 3 apresenta os efeitos do MMB na modulação da expressão das citocinas MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$ .

**Figura 3.** Efeitos do MMB nos níveis de (a) MCP-1e (b) IL-12p70 e (c) INF- $\gamma$  em macrófagos tratados com LPS. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 3$ /grupo. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle negativo (LPS), intervalo de confiança de 95%.



Concentrações empregadas: MMB 1 e MMB 13, 10  $\mu$ g mL $^{-1}$ ; MMB 2, MMB 3, MMB 4, MMB 8, MMB 9, MMB 10, MMB 12, 30  $\mu$ g mL $^{-1}$ ; MMB 7 e MMB 14, 100  $\mu$ g mL $^{-1}$ ; MMB 8, e MMB 11, 3  $\mu$ g mL $^{-1}$ .

Fonte: o próprio autor (2019).

Os macrófagos tratados com LPS aumentaram a secreção de MCP-1 em 76,4 vezes quando comparados às células não expostas. O tratamento com as amostras de MMB 1, 2, 3, 4, 8, 9 e 13 foi capaz de reduzir significativamente a expressão de MCP-1, entre 15,2% (MMB 3) e 39,1% (MMB 8), conforme demonstrado na Figura 3a. O fármaco de referência (dexametasona) reduziu a secreção de MCP-1 em 72,4%. MCP-1 é um membro da família das quimiocinas C-C. Embora possa ser produzido por vários tipos de células, os macrófagos representam a principal fonte de MCP-1. É um quimioatratante que atua principalmente em monócitos e macrófagos, regulando a expressão de moléculas de adesão e citocinas, além de recrutar leucócitos e células dendríticas para a área de inflamação (AHMAD et al., 2018;

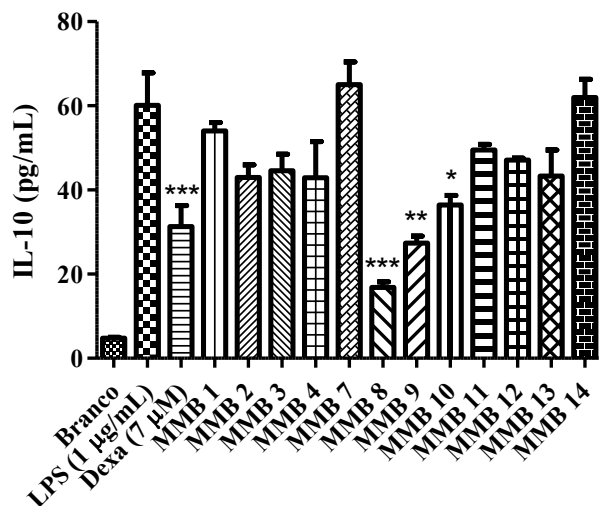
KHAJURIA et al., 2017). O mel de *Leptospermum* (falsa-érica) se mostrou capaz de modular a expressão de MCP-1 no epitélio sinonasal de pacientes com sinusite crônica, conforme relatado por Manji et al. (2019).

A citocina IL-12p70 foi fortemente inibida pelo tratamento com MMB (Figura 3b). Com exceção das amostras MMB 7, 13 e 14, todas as demais modularam a expressão da citocina, variando de 48,1% (MMB 2) a 91,1% (MMB 8) de inibição. O tratamento com MMB 8 foi capaz de reduzir a expressão de IL-12p70 em níveis ainda mais baixos que os níveis basais (branco), sendo mais eficiente que o medicamento de referência (dexametasona), que inibiu a secreção de citocinas em 65,9%. Não existem estudos demonstrando a ação de méis na modulação de IL-12p70. A IL-12p70 é uma interleucina que desempenha um papel crítico no desenvolvimento das respostas das células Th 1 e citotóxicas T, além de promover a expressão de INF- $\gamma$ , que ativa a função bactericida em macrófagos (REYES et al., 2018). Shi et al. (2018) reportaram a ação do flavonoide isoramnetina da erva *Hippophae rhamnoides* L na modulação da expressão de IL-12p70.

Outra citocina pró-inflamatória avaliada foi INF- $\gamma$ . O INF- $\gamma$  é um fator de ativação de macrófagos que se liga ao seu receptor na superfície celular dos macrófagos e reprograma a expressão gênica modulando as vias de transdução de sinal (KOTA et al., 2006). Uma das suas principais funções é recrutar leucócitos para o local da inflamação e estimular os macrófagos a eliminar bactérias (GOODBURN; DIDCOCK; RANDALL, 2019). Os resultados apresentados na Figura 3c mostram que a estimulação dos macrófagos com LPS aumentou a produção de INF- $\gamma$  em 4,5 vezes. O tratamento com as amostras de MMB 1, 2, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 reduziu a secreção de INF- $\gamma$  em até 77,7% (MMB 10). Alguns compostos fenólicos isolados como campferol (MILES; ZOUBOULI; CALDER, 2005) e ácido siríngico (CHERNG; CHIANG; CHIANG, 2007) já demonstraram efeito de modulação no INF- $\gamma$ .

Vale ressaltar que todas as citocinas pró-inflamatórias acima mencionadas estão principalmente envolvidas na regulação da resposta imune, o que significa que sua superprodução pode levar à manifestação de doenças autoimunes. O efeito do MMB na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 também foi avaliado, e os resultados estão apresentados na Figura 4.

**Figura 4.** Efeitos do MMB nos níveis de IL-10 em macrófagos tratados com LPS. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 3/\text{grupo}$ . \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle negativo (LPS), intervalo de confiança de 95%.



Concentrações empregadas: MMB 1 e MMB 13,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; MMB 2, MMB 3, MMB 4, MMB 9, MMB 10, MMB 12,  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; MMB 7 e MMB 14,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; MMB 8, e MMB 11,  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Fonte: o próprio autor (2019).

Quando o processo inflamatório é desencadeado, as células do tecido inflamado também produzem e secretam citocinas com perfil imunomodulador, como a IL10. Os resultados mostraram que a estimulação dos macrófagos com LPS provocou aumento da produção de IL-10 pelas células em 12,5 vezes. O tratamento dos macrófagos com MMB 8, 9 e 10 reduziu significativamente a secreção de IL-10 em até 71,2% (MMB 8). A citocina IL-10 é anti-inflamatória e impede a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 e IFN- $\gamma$  (SAIKI et al., 2018).

Compostos que sejam capazes de inibir citocinas pró-inflamatórias e, simultaneamente, aumentar a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 configuram uma importante opção natural para a prevenção de várias doenças inflamatórias como artrite reumatoide, cirrose hepática, diabetes e asma. Segundo Comalada et al. (2006), quercetina e luteolina aumentaram os níveis de IL-10 quando os macrófagos isolados de camundongos foram pré-tratados com estes compostos antes da estimulação com LPS. O tratamento com MMB resultou em níveis de IL-10 inferiores ao grupo controle negativo (LPS), porém, os resultados foram significativamente maiores que os do grupo basal (branco, células não estimuladas com LPS). Estes resultados podem ser atribuídos à presença de determinados compostos fenólicos nas amostras de MMB, como os flavonoides por exemplo.



Os resultados deste estudo mostraram que as amostras de MMB apresentaram comportamento diferente frente aos mediadores inflamatórios avaliados, sendo possível destacar a amostra MMB 8, que significativamente inibiu a expressão de 4 das 6 citocinas avaliadas, na concentração de apenas 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esse efeito pode estar associado ao perfil de compostos fenólicos encontrados nesta amostra, sendo eles os ácidos 3,4 dihidroxibenzoico, salicílico e benzoico e os flavonoides rutina, luteolina e naringenina.

Relatos de alguns dos compostos fenólicos avaliados neste estudo a respeito da supressão de respostas inflamatórias suportam esta hipótese. O ácido 3,4-di-hidroxibenzoico, majoritário na amostra MMB 8, já foi relatado como supressor da inflamação em ratos diabéticos (ADEDARA et al., 2019) e redutor da expressão de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no cérebro de camundongos tratados com D-galactose (TSAI; YIN, 2012). Em ensaios *in vivo* usando ratos, o ácido siríngico mostrou ser capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e MCP-1 (HAM et al., 2016). A rutina (10  $\mu\text{M}$ ), foi capaz de inibir a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 (39 e 43% de inibição, respectivamente); de acordo com Cosco et al. (2016). López-Posadas et al. (2008) compararam o efeito de diferentes flavonoides (50  $\mu\text{M}$ ) na modulação da inflamação de esplenócitos de ratos, que são células do sistema imune localizadas no baço. A naringenina inibiu parcialmente a secreção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 em 30, 40 e 23%, respectivamente. A luteolina inibiu completamente a produção das três citocinas avaliadas. Todos estes fatores destacam a forte relação entre a estrutura do composto e o espectro de ação frente a mediadores inflamatórios.

Estudos em ratos com o uso de compostos fenólicos isolados também foram encontrados na literatura. O ácido 3,4-dihidroxibenzoico foi estudado em doses de 0,5 a 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso corpóreo (ADEDARA et al., 2019; TSAI; YIN, 2012), ácido siríngico em dose de 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso corpóreo (HAM et al., 2016), rutina de 100 a 300  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso corpóreo (KHAJEVAND-KHAZAEI et al., 2018; ZHENG et al., 2017) e naringenina de 5 a 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso corpóreo (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008). Todos os compostos citados foram encontrados nas amostras de MMB em concentrações menores do que as administradas aos animais.

Neste contexto, é possível afirmar que o MMB proporcionou resultados satisfatórios como modulador de inflamação considerando as baixas concentrações testadas. A atuação das amostras frente aos mediadores inflamatórios avaliados não demonstrou associação com a origem geográfica das mesmas, visto que amostras provenientes da mesma cidade não apresentaram efeito semelhante em alguns casos (proveniência das amostras vide Tabela 1). Desta maneira, foi possível fazer uma associação dos efeitos apenas com a composição fenólica

das amostras, que se mostrou variável, como esperado em méis. De forma similar, as amostras que não foram consideradas para o estudo completo dada a sua atuação insatisfatória na modulação de óxido nítrico, não apresentaram semelhança entre si quanto a origem geográfica, proximidade de locais de coleta ou a composição fenólica. Os resultados sugerem que o MMB pode ser considerado um alimento com propriedades funcionais devido ao seu potencial anti-inflamatório em baixas concentrações, demonstrados neste estudo.

#### 4. CONCLUSÃO

Dezesseis amostras de mel de melato de bracatinga foram avaliadas quanto à composição fenólica e o potencial anti-inflamatório *in vitro*. O perfil e a concentração fenólica das amostras foram diversificados e alguns dos compostos encontrados foram previamente descritos como mediadores de inflamação *in vitro* e *in vivo*. Quatro das dezesseis amostras analisadas não apresentaram habilidade de modular significativamente a expressão de óxido nítrico e, estas amostras não apresentaram relação entre si quanto à composição fenólica ou à origem geográfica.

Doze das dezesseis amostras de mel de melato de bracatinga avaliadas demonstraram capacidade de atenuar as cascatas inflamatórias estimuladas por LPS em macrófagos RAW 264.7, reduzindo a expressão de mediadores inflamatórios importantes como óxido nítrico e algumas das citocinas pró-inflamatórias em até aproximadamente 90%, para a amostra MMB 8. O efeito desta amostra demonstrou destaque frente a inibição da secreção de quatro das seis citocinas avaliadas. Os efeitos anti-inflamatórios observados podem estar associados aos compostos fenólicos presentes nas amostras. Com base nos resultados encontrados, foi possível afirmar que o mel de melato de bracatinga pode ser importante tanto no tratamento auxiliar quanto na prevenção de desordens inflamatórias, podendo ser considerado um alimento com propriedades funcionais, dada sua atuação anti-inflamatória mesmo em baixas concentrações para algumas amostras. Estudos futuros são necessários considerando os compostos fenólicos presentes nas amostras que se destacaram no efeito anti-inflamatório, para avaliação de seu efeito isolado e sinérgico. A avaliação do potencial anti-inflamatório *in vivo* do MMB também pode fornecer dados relevantes a respeito da ingestão do mesmo.

## CAPÍTULO V

### **ANÁLISE PROTEÔMICA DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) USANDO PEPTÍDEOS MARCADORES E ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO**

As informações deste capítulo foram submetidas para publicação no periódico *Food Chemistry* como *Authenticity of bracatinga (Mimosa scabrella Bentham) honeydew honey using targeted peptide markers identified by high-resolution mass spectrometry*.

## RESUMO

A rastreabilidade dos alimentos é considerada um tema emergente, e pode ser conveniente quando se trata de mel de melato, um produto tipicamente regional, de características particulares, com grande notoriedade no mercado europeu, e, portanto, de alto valor agregado, o que revela a incidência de adulterações. Frente ao exposto, existe uma necessidade significativa em preencher as lacunas de conhecimento científico relacionadas à determinação de parâmetros que comprovem a autenticidade dos méis de melato, com destaque ao mel de melato de bracatinga (MMB). Para tal, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com alta especificidade que permitam o estabelecimento de um marcador ou marcadores característicos que comprovem sua identidade, minimizando possíveis adulterações com méis de menor valor comercial, o que resultaria em diversos benefícios não só para o mercado consumidor, mas para o mercado apícola, dentre os quais uma maior segurança relacionada a este produto e um aumento do seu valor agregado. Neste estudo, uma estratégia proteômica direcionada para identificar peptídeos marcadores do mel de melato de bracatinga foi desenvolvida. O uso de espectrometria de massas de alta resolução (LC-Triple TOF-MS/MS) proporcionou a verificação rápida das proteínas, previamente digeridas, presentes nas amostras, sendo que as proteínas identificadas foram reconhecidas como pertencentes ao grupo das proteínas da geleia real (MRJP). Os peptídeos seletivos para quantificação de MRJP 1 (EALPHVPIFDR), 2 (ILGANVK), 3 (TFVTIER), 4 (QNIDVVAR), 5 (FINNDYNFNEVNFR) e 7 (LLQPYPDWSWTK) foram, portanto, escolhidos com o emprego do algoritmo *BLAST* e o *software Skyline*. A quantificação dos peptídeos marcadores selecionados por LC-MS/MS demonstrou especificidade satisfatória do método e revelou que o peptídeo QNIDVVAR da MRJP 4 pode ser usado para diferenciar méis de melato de bracatinga de méis florais. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que relata a caracterização de proteínas em um mel de melato. O peptídeo QNIDVVAR foi considerado um potencial marcador para determinação da autenticidade dos méis de melato de *Mimosa scabrella* Bentham (bracatinga).

**Palavras-chave:** Proteômica. Mel de melato. Método SRM. Proteínas de geleia real. Autenticidade. LC-MS/MS.

## ABSTRACT

Food traceability is considered an emerging subject, and it can be more important when it comes to honeydew honeys. This typically local product has particular characteristics, great notoriety in the European market, and therefore high commercial value, which reveals the incidence of adulteration. Given the above, there is a significant need to fill the gaps in scientific knowledge related to the determination of parameters that prove the authenticity of honeydew honeys, highlighting bracatinga honeydew honey. For this, it is necessary to develop analytical methods with high specificity that allow the establishment of a marker or characteristic markers that prove their identity. It will minimize adulterations with other honeys, resulting in several benefits not only for the consumer but also for the beekeeping market. Besides that, greater security related to this product and an increase in its commercial value. In this study, a proteomic strategy aimed at identifying peptide markers for bracatinga honeydew honey was developed. High-resolution mass spectrometry (LC-Triple TOF-MS/MS) provided a quick check of the proteins, previously digested, present in the samples. The identified proteins were recognized as belonging to the major royal jelly proteins (MRJP) group. The selective peptides for quantification of MRJP 1 (EALPHVPIFDR), 2 (ILGANVK), 3 (TFVTIER), 4 (QNIDVVAR), 5 (FINNDYNFNEVNFR) and 7 (LLQPYPDWSWTK) were therefore chosen using the BLAST algorithm and the Skyline software. The method for quantification of the marker peptides selected by LC-MS/MS showed satisfactory specificity. It revealed that the QNIDVVAR peptide from MRJP 4 could be used to differentiate bracatinga honeydew honeys from floral honeys. It is the first work that reports the characterization of proteins in honeydew honey. The QNIDVVAR peptide was considered a potential marker for determining the authenticity of *Mimosa scabrella* Bentham (bracatinga) honeydew honeys.

**Keywords:** Proteomics. Honeydew honey. SRM method. Major royal jelly proteins. Authenticity. LC-MS/MS.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse em méis de melato tem aumentado ao longo dos últimos anos, principalmente devido à atrativa composição química e nutricional demonstrada em diversos estudos, especialmente com destaque para o mel de melato de bracatinga (MMB) (AZEVEDO et al., 2017a; BERGAMO et al., 2018b; BRUGNEROTTO et al., 2019; SERAGLIO et al., 2017; SILVA et al., 2019a). O maior interesse por méis de melato tem aumentado sua valorização e seu preço de venda. Aliado ao interesse de importação do mel de melato de bracatinga por outros países, principalmente pelo mercado europeu, onde é muito apreciado, existe a necessidade de diferenciação deste mel como uma resposta ao mercado consumidor (BERGAMO et al., 2018a), permitindo maior controle de origem, rastreabilidade e comprovação de autenticidade.

Méis tem sido adulterados de diferentes maneiras e, para os méis de melato, a ocorrência de adulterações pode ser ainda maior considerando o preço mais elevado em comparação aos méis florais (MAZUCHOWSKI et al., 2014). Além da adição de substâncias, outros fatores como condições climáticas, práticas apícolas, manipulação, embalagem e tempo de armazenamento podem alterar a composição do mel. Embora diversos estudos já tenham abordado adulterações em méis florais (KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2020; RODRÍGUEZ et al., 2019; SCHIEVANO et al., 2019; STANEK et al., 2019), existem poucos relatos disponíveis ou estudos sobre a autenticidade de méis de melato.

Diversas estratégias tem sido utilizadas com frequência para determinar a origem botânica de diversos tipos de méis, contemplando a identificação de minerais e fenólicos; a determinação de parâmetros físico-químicos; além do uso de espectroscopia Raman, infravermelho com transformada de Fourier e RMN (ALIAÑO-GONZÁLEZ et al., 2019; BERGAMO et al., 2018a; KARABAGIAS et al., 2014; KASPRZYK et al., 2018; LATORRE et al., 2013; ZUCCATO et al., 2017). A determinação de prolina também é considerada um bom parâmetro para a diferenciação de méis (INTERNATIONAL HONEY COMMISSION, 2009) e já foi avaliada em mel de melato de bracatinga (AZEVEDO et al., 2017a). Alguns estudos exploratórios visando a diferenciação de mel de melato de bracatinga usando o perfil mineral (BERGAMO et al., 2018a), parâmetros de cor (BERGAMO et al., 2019) e perfil eletroforético de proteínas (AZEVEDO et al., 2017b) já foram conduzidos, necessitando de estudos que identifiquem um marcador mais específico.

Em geral, pouco se sabe sobre a concentração e a constituição peptídica de proteínas em méis. Alguns autores relataram teores de em torno de 0,04 a 1,6 g 100 g<sup>-1</sup> de proteínas (WANG

et al., 2009; WON et al., 2008). Em relação à composição proteica, em méis florais, o grupo das proteínas da geleia real (MRJP do inglês *major royal jelly proteins*) é destacado em alguns trabalhos publicados (BILAL; AZIM, 2018; GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012; WON et al., 2008; ZHANG et al., 2019), no entanto, a caracterização proteica e peptídica em méis de melato é inédita, até o presente momento.

Estratégias proteômicas têm sido empregadas para caracterização e confirmação de autenticidade de várias matrizes alimentares (BÖNICK; HUSCHEK; RAWEL, 2017; HUSCHEK et al., 2018; XIAO; LI; MA, 2019). As abordagens de identificação de peptídeos marcadores são importantes, considerando a falta de dados proteômicos disponíveis para diversos alimentos, incluindo méis (KORTE; BROCKMEYER, 2017). O monitoramento de reação selecionada (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*), em análise proteômica direcionada, possibilita acompanhar quantitativamente alvos específicos de proteínas em um experimento orientado por hipóteses e é caracterizado por alta seletividade, empregando o analisador de massa triplo quadrupolo (QqQ) para fornecer reprodutibilidade, sensibilidade e seletividade na quantificação de proteínas (VIDOVA; SPACIL, 2017).

É clara a necessidade de criação de banco de informações científicas que possam contribuir para a diferenciação de matrizes como mel, em especial méis de melato, que possuem alto valor agregado, mas que de uma maneira geral sofrem adulterações nas mesmas proporções que os méis florais; e ainda possibilitar o aprofundamento do conhecimento relacionado às proteínas presentes em méis. Frente ao exposto, neste estudo, uma abordagem proteômica baseada no método SRM foi desenvolvida e aplicada para seleção e quantificação de peptídeos marcadores em amostras de mel de melato de bracatinga do Sul do Brasil, utilizando espectrometria de massas de alta resolução. É importante enfatizar que foi o primeiro estudo com abordagem proteômica direcionada empregada para caracterizar proteínas e peptídeos em amostras de mel.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi conduzido durante o período de doutorado sanduíche (Edital CAPES/DAAD nº 22/2018), realizado na Universidade de Potsdam, Alemanha, junto ao grupo de Análise Instrumental em Ciências Nutricionais liderado pelo professor Harshadrai Rawel.

### **2.1 Reagentes e soluções padrão**

Bicarbonato de amônio, 1,4-ditiotreitol, ureia, ácido tricloroacético, hidróxido de amônio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio e acetonitrila e ácido fórmico grau LC-MS foram adquiridos da Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Alemanha). Iodoacetamida, polivinilpolipirrolidona (PVPP), tartarato de sódio e potássio, sulfato de cobre, Folin-Ciocalteu 2 M, albumina de soro bovino e tripsina do pâncreas bovino para digestão enzimática foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.). Metanol,  $\beta$ -mercaptoetanol, acetona e ácido acético foram adquiridos na VWR International GmbH (Darmstadt, Alemanha). Coomassie Blue R 250 foi obtido da GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Suíça). O padrão interno (PI) aplicado foi um peptídeo sintetizado (LLGFGINADENQR) derivado da  $\beta$ -conglutina (*Lupinus albus*; entrada no banco de dados *UniProt*, <https://www.uniprot.org/>; Q6EBC1 CONB2\_LUPAL), cuja solução de trabalho foi fixada em  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  em solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v:v).

## 2.2 Amostras

Seis amostras de MMB foram coletadas e fornecidas por apicultores dos estados de Santa Catarina e Paraná durante a safra de 2018, nas mesmas condições já descritas no *Capítulo II*, sendo estas amostras consideradas puras por terem sido drenadas dos favos no Laboratório de Química de Alimentos da UFSC. Para comparação, 6 amostras de MMB embalados (amostras comerciais) e 6 amostras de méis florais provenientes das mesmas localidades, foram analisadas, conforme Tabela 1.



**Tabela 1.** Origem geográfica e botânica e data de coleta das amostras de mel estudadas.

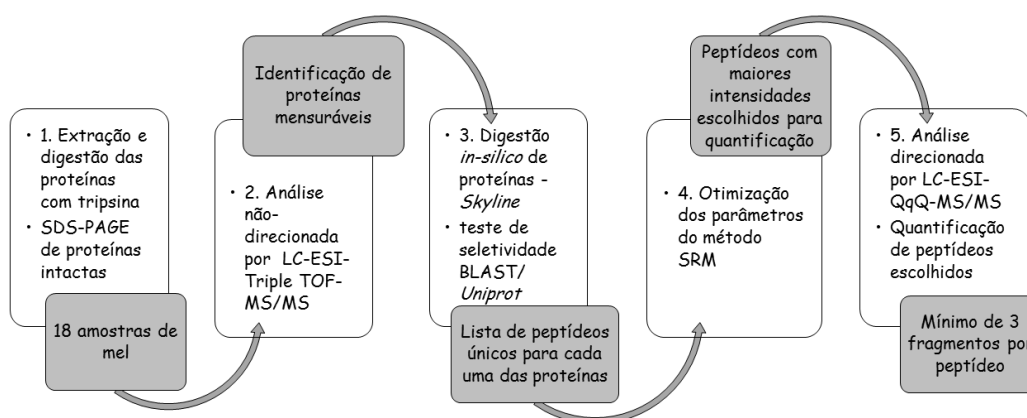
Código	Cidade	Mês e ano de coleta	Origem botânica
MMBp 1	Bom Retiro – SC	07/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBp 2	Santa Terezinha – SC	07/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBp 3	Água Doce – SC	07/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBp 4	Urupema – SC	07/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBp 5	Monte Castelo – SC	07/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBp 6	General Carneiro – PR	09/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBc 7	Bom Retiro – SC	06/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBc 8	Santa Terezinha – SC	05/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBc 9	Água Doce – SC	04/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBc 10	Urupema – SC	06/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBc 11	Monte Castelo – SC	05/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MMBc 12	General Carneiro – PR	03/2018	<i>Mimosa scabrella</i> Bentham
MF 13	Bom Retiro – SC	02/2019	<i>Scoparia dulcis</i>
MF 14	Santa Terezinha – SC	02/2019	Multifloral
MF 15	Água Doce – SC	01/2019	<i>Myrcia</i> sp. e <i>Lamanonia speciosa</i>
MF 16	Urupema – SC	01/2019	Multifloral
MF 17	Monte Castelo – SC	11/2018	<i>Piptocarpha angustifolia</i> e <i>Campomanesia xanthocarpa</i>
MF 18	General Carneiro – PR	12/2018	Multifloral

MMBp, mel de melato de bracinga puro; MMBc, mel de melato de bracinga comercial; MF, mel floral.

Fonte: o próprio autor (2019).

### 2.3 Estratégia de análise proteômica

O fluxograma de trabalho para a identificação (item 2.4) e quantificação (item 2.5) de proteínas e peptídeos marcadores de MMB é apresentado na Figura 1 e descrito nas seções que seguem.

**Figura 1.** Fluxo de trabalho de análise proteômica de MMB.

SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*; LC-ESI-Triple TOF-MS, do inglês *Liquid Chromatography-Triple-Time of Flight Mass Spectrometry*; BLAST, do

inglês *Basic Local Alignment Search Tool*; SRM, do inglês *selected reaction monitoring*; LC-ESI-QqQ-MS/MS *Liquid Chromatography-Triple quadrupole-Mass Spectrometry*.

Fonte: adaptado de HUSCHEK et al. (2018).

## 2.4 Análise proteômica não-direcionada – identificação de proteínas

A identificação de proteínas nas amostras de mel foi realizada por eletroforese em gel e análise não-direcionada por LC-MS/MS, descritos a seguir.

### 2.4.1 Eletroforese em gel

#### 2.4.1.1 Extração de proteínas

O procedimento de extração de proteínas foi adaptado de Damerval et al. (1986). Os méis ( $0,2 \pm 0,01$  g) foram misturados com 0,01 g de PVPP e tratados com 1 mL de ácido tricloroacético 10% (m:v) diluído em acetona com  $\beta$ -mercaptoetanol 0,07% (v:v). Em seguida a mistura foi incubada por 2 h a  $-20$  °C ( $\pm 2$  °C). Após centrifugação (28700 g, 4 °C, 10 min), os sobrenadantes foram descartados. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de metanol 80% para remover açúcares e outros compostos interferentes, seguindo de incubação por 1 h a  $-20 \pm 2$  °C e centrifugação (28700 g, 4 °C, 10 min). Esta etapa foi repetida três vezes. A lavagem final do precipitado foi realizada com ácido tricloroacético 10% em acetona com  $\beta$ -mercaptoetanol 0,07% com incubação *overnight* a  $-20 \pm 2$  °C seguida de centrifugação e remoção do sobrenadante. Após a secagem do precipitado à temperatura ambiente (20 °C), as proteínas foram ressuspensas em 0,2 mL de hidróxido de amônio 5% em água (m:v).

#### 2.4.1.2 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) foi realizado de acordo com Laemmli (1970). Inicialmente, 40  $\mu$ L do extrato de proteínas foram incubados com 8  $\mu$ L de tampão (tampão Tris-HCl 0,106 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,5, contendo 0,51 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 2% de dodecilsulfato de lítio, 10% de glicerol, 0,22 mmol L<sup>-1</sup> de Coomassie Blue G 250 e 0,175 mmol L<sup>-1</sup> de Phenol Red, Thermo Fischer Scientific, Waltham, E.U.A.) a 90 °C por 5 minutos. Depois disso, 20  $\mu$ L da solução e 5  $\mu$ L do padrão (PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–250 kDa), Thermo Fischer Scientific, Waltham, E.U.A.) foram separados por SDS-PAGE (NuPAGE™ 12% Bis-Tris Gel,

Thermo Fischer Scientific, Waltham, E.U.A.). Os géis foram corados com Coomassie Blue R 250 (em 10% de ácido acético) e o mesmo foi removido dos géis por meio de lavagens com solução aquosa de ácido acético 10% (v:v). Os géis foram escaneados, a intensidade das bandas e a massa molecular relativa das proteínas foram estimados usando o *software* Image Lab (versão 6.0.1.34, Bio-Rad Laboratories, Hercules, E.U.A.).

Para comparação quantitativa dos resultados, a intensidade das bandas foi normalizada (intensidade da banda de proteína/ intensidade da banda padrão) considerando a intensidade da respectiva banda padrão com massa molecular semelhante ao das bandas de proteínas correspondentes.

## **2.4.2 Análise não-direcionada de proteínas por espectrometria de massas**

### **2.4.2.1 Extração e digestão de proteínas**

Amostras de mel ( $1,0 \pm 0,2$  g) foram misturadas com 10 mL de tampão de extração (bicarbonato de amônio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , ditiotreititol  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  e ureia  $4 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,2). A solução foi agitada por 1 h em temperatura ambiente (HUSCHEK et al., 2016). A extração foi realizada em triplicata e a concentração de proteínas em cada extrato foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Em seguida, conforme realizado por Rogniaux et al. (2015) os três extratos foram combinados para a realização das etapas posteriores.

Após duas etapas de centrifugação (5 min a 4000 g e 5 min a 7000 g), foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  (concentração final de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) do peptídeo padrão (LLGFGINADENQR, peptídeo da  $\beta$ -conglutina). Um ensaio em branco (onde nenhuma amostra foi adicionada) foi igualmente preparado e submetido ao protocolo de digestão. A etapa de alquilação foi realizada adicionando 100  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e incubando o extrato por 20 min em um termo agitador a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  no escuro.

Para a digestão, foram adicionados 1640  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão (18% (v:v) acetonitrila:  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de bicarbonato de amônio) e 200  $\mu\text{L}$  de tripsina ( $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) seguido por incubação *overnight* a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, a digestão foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de ácido fórmico 40% (v:v).

Para purificar o extrato e isolar os peptídeos de outros compostos presentes no mel, foi realizada SPE (do inglês *Solid-Phase Extraction*) usando cartuchos  $\text{C}_{18}$  (Chromabond, Machery Nagel, Düren, Alemanha). Os peptídeos foram eluídos com 6 mL de uma solução aquosa contendo 50% de acetonitrila (v:v) e 0,1% de ácido fórmico (v:v). O eluato foi evaporado sob

corrente de nitrogênio e ressuspensão com 450 µL da solução eluente (solução aquosa contendo 50% de acetonitrila (v:v) e 0,1% de ácido fórmico (v:v)) e 50 µL de ácido fórmico 0,1% (HUSCHEK et al., 2016).

#### 2.4.2.2 Identificação de proteínas por LC-MS/MS

Após a digestão as proteínas foram analisadas usando um sistema LC-MS/MS de alta resolução, composto pelo sistema *eksigent micro* UHPLC 200 e um ESI-TripleTOF 5600<sup>®</sup> MS/MS (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canadá), com amostrador automático PAL HTS xt (CTC Analytics, Zwingen, Suíça) com aquisição dependente de dados (DDA, do inglês *data dependent acquisition*) situado no Instituto de Processamento de Grãos de Potsdam, Alemanha. A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna C<sub>18</sub> Halo<sup>®</sup> *fused-core* (2,7 µm, 90 Å, 0,5 x 50 mm) com vazão de 15 µL min<sup>-1</sup> e temperatura do forno ajustada em 35 °C. O volume de injeção de 7 µL foi adotado. A fase móvel foi constituída pelo eluente A (ácido fórmico 0,1%) e eluente B (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%). O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: 95 – 70% A (v/v) de 0 a 36 min, 70 – 40% A (v/v) de 36 a 41 min, 40 – 10% A (v/v) de 41 a 42 min, 10% A (v/v) de 42 a 46 min, 10 – 95% A (v/v) de 46 a 47 min. O tempo de equilíbrio da coluna entre corridas foi de 4 min. A ionização foi realizada no modo positivo. O modo DDA foi usado para coletar dados do MS. O DDA permite massas de TOF de 400 a 1200 Da para íons precursores e de 200 a 1200 Da para íons produtos em alta resolução. Os critérios adotados para DDA consideraram íons com carga entre 2 e 5 que excede 150 pontos de aquisição por segundo. Os dados foram adquiridos e processados pelo *software* SCIEX Protein Pilot Software (HUSCHEK et al., 2018).

#### 2.4.3 Seleção de peptídeos teóricos – digestão *in silico*

A digestão *in silico* com tripsina foi realizada usando o *software Skyline* (MacCoss Lab Software, Universidade de Washington; <https://skyline.gs.washington.edu>). As configurações foram selecionadas no *software* para limitar o comprimento dos peptídeos de 5 a 20 aminoácidos, e aminoácidos N-terminais e peptídeos contendo metionina e cisteína foram excluídos para evitar modificações como alquilação e oxidação. Os resíduos de cisteína foram reduzidos e carbamidometilados (BÖNICK; HUSCHEK; RAWEL, 2017).

Para as configurações de transição, apenas os íons *y* foram considerados e as cargas foram definidas em 2<sup>+</sup> (BÖNICK; HUSCHEK; RAWEL, 2017). De 2 a 5 transições foram

selecionadas para cada peptídeo. A seletividade dos peptídeos selecionados foi estabelecida com o algoritmo *BLAST* (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool* do banco de dados *UniProt*, <http://www.uniprot.org/>). Apenas os candidatos a peptídeos marcadores que confirmaram 100% de identidade foram selecionados para quantificação.

## 2.5 Análise proteômica direcionada – quantificação de proteínas

### 2.5.1 Quantificação dos peptídeos selecionados

Os peptídeos foram analisados usando um sistema Agilent Infinity 1260 com bomba binária, termostato multicolumnas e amostrador automático equipado com um Agilent G6470A Series Triplo Quadrupolo LC/MS (ambos da Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Alemanha) acoplado a uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operando no modo positivo. Os peptídeos foram separados usando uma coluna analítica Kinetex C<sub>8</sub> (2,6 µm, 100 Å, 150 x 4,60 mm; Phenomenex, Torrance, CA, E.U.A.), mantida a uma temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída por eluente A (ácido fórmico 0,1%) e eluente B (acetonitrila), a uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

As condições de gradiente de fase móvel foram previamente otimizadas, visando obter melhor separação entre os peptídeos. Dois gradientes foram definidos; para MRJP 1 e 4, analisadas primeiro, o gradiente foi programado da seguinte forma: 95% A de 0 a 5 min, 95–5% A de 5 a 15 min, 5% A de 15 a 18 min, 5–95% A de 18 a 18,01 min, 95% A de 18,01 a 21 min. Para MRJP 2, 3, 5 e 7, analisadas em um segundo momento, o gradiente foi de 95% A de 0 a 5 min, 95–50% A de 5 a 15 min, 50–5% A de 15 a 16 min, 5% A de 16 a 19 min, 5–95% A de 19,01 a 21 min. O tempo de equilíbrio da coluna entre corridas foi de 4 min para ambos os gradientes. Foram injetados 0,3 µL de amostra. A temperatura do gás de dessolvatação na fonte de ionização foi ajustada em 275 °C. O fluxo de gás foi de 11 L min<sup>-1</sup>, a pressão do nebulizador foi de 35 psi e a tensão capilar foi de 5425 nA. A detecção foi realizada no modo SRM, no qual cada transição específica foi monitorada em um tempo específico, de acordo com o tempo de retenção do respectivo peptídeo.

Após a aplicação do método SRM, os tempos de retenção e as energias de colisão para as transições identificadas foram determinados usando o *software Skyline*. Foram selecionadas pelo menos as três transições mais intensas no espectro dos íons produto dos respectivos peptídeos marcadores. Após, a abundância relativa de cada peptídeo de quantificação foi avaliada considerando a área total de todas as transições analisadas.

### 2.5.2 Validação do método

Para a validação do método, a quantificação das MRJPs selecionadas foi realizada de forma relativa, comumente empregada em estudos semelhantes, uma vez que a quantificação absoluta exigiria a síntese dos peptídeos e, de preferência, padrões marcados com isótopos, que não eram financeiramente viáveis neste estudo. Para a quantificação relativa os cálculos são feitos a partir de pelo menos duas amostras diferentes, fortificadas e não fortificadas com o padrão, como neste estudo.

Para determinar a linearidade, de acordo com Rogniaux et al. (2015), foram empregadas diferentes quantidades do peptídeo padrão (LLGFGINADENQR), tanto para o ensaio branco quanto para a amostra MMBp 3 (de 0,05 a 6 ng foram injetados em 6 níveis). Esta amostra foi selecionada por representar a quantidade média dos peptídeos para quantificação. A linearidade também foi determinada para os peptídeos de quantificação das proteínas MRJP 1, 2, 3, 4, 5 e 7 na amostra MMBp 3 (de 0,1 a 14 µg foram injetados em 6 níveis). As determinações foram realizadas em triplicata e, em seguida, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das curvas de calibração foi calculado. Para uma validação bem-sucedida, o coeficiente de determinação mínimo foi definido em 0,95 (ROGNIAUX et al., 2015).

O LOD e o LOQ foram determinados utilizando as curvas de calibração, seguindo as equações:  $LOD = (3,3 \times \sigma) / \text{coeficiente angular da curva de calibração}$  e  $LOQ = (10,0 \times \sigma) / \text{coeficiente angular da curva de calibração}$ ; onde  $\sigma$  é o desvio padrão da menor concentração da curva (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

Para avaliar a especificidade, inicialmente, um branco foi empregado e as áreas foram usadas a partir dos dados obtidos para a menor concentração mensurável. A especificidade foi calculada usando a razão entre a área do peptídeo de quantificação (para todas as MRJPs) em um tempo de retenção correspondente na matriz em branco e a área do mesmo peptídeo em amostras de mel na concentração correspondente ao LOQ. Quando o percentual foi inferior a 30%, a especificidade foi considerada como comprovada (ICH, 2005).

A recuperação foi avaliada pela determinação da recuperação aparente do PI (LLGFGINADENQR) nas diferentes amostras ( $n = 18$ ) de mel em comparação com o branco, em dois dias diferentes. A quantidade injetada foi de 0,3 ng do PI (LLGFGINADENQR). A repetibilidade (precisão intra-ensaio) foi realizada pela determinação do coeficiente de variação ( $n = 18$ ) para a determinação da recuperação (ICH, 2005).

## 2.6 Análise estatística

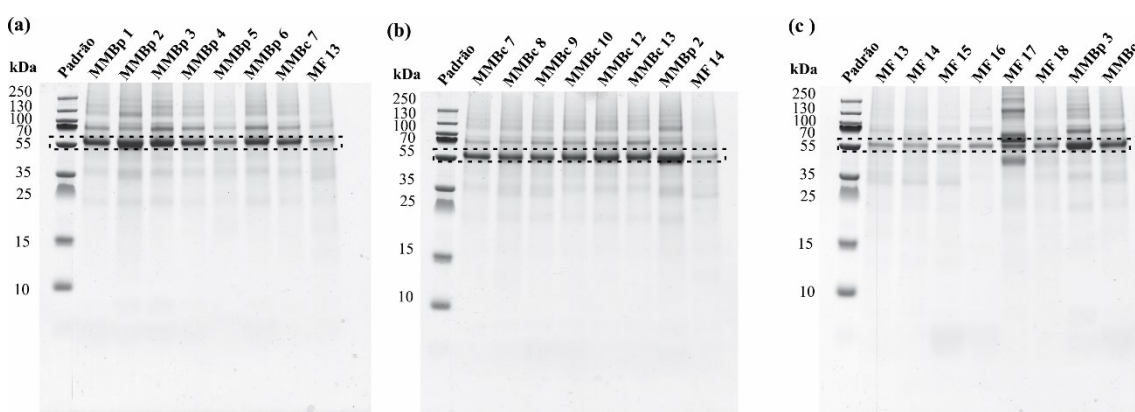
Os experimentos foram realizados em três replicatas independentes de preparo. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A ANOVA seguida do teste de *Tukey* para comparação das médias foi realizada usando o *software* GraphPad Prism 6 (versão 6.01, GraphPad Inc. CA, E.U.A.). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando as médias dos resultados comparados diferiram ao nível de significância de 5%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Identificação e seleção de proteínas e peptídeos

Preliminarmente, as análises de espectrometria de massas não-direcionada e SDS-PAGE foram realizadas para identificar as proteínas nas amostras de mel. A separação das proteínas do mel usando SDS-PAGE foi realizada para determinar as massas molares relativas, por comparação das bandas migradas com as massas molares padrão. A Figura 2 mostra os géis dos três grupos de amostras analisadas. Cada gel contém duas amostras dos outros dois diferentes tipos de méis para melhor comparação visual das bandas.

**Figura 2.** SDS-PAGE de (a) MMBp (b) MMBc e (c) MF. Padrão PageRuler™ Prestained Protein Ladder.



MMBp, mel de melato de bracatinga puro; MMBc, mel de melato de bracatinga comercial; MF, mel floral.

Fonte: o próprio autor (2019).

A principal banda observada em todos os géis corresponde a 55 kDa, e a segunda principal banda é de aproximadamente 70 kDa. Estas massas molares correspondem as massas

das MRJPs (identificadas por LC-MS/MS, conforme discutido a seguir), de acordo com a busca de informações sobre proteínas produzidas por abelhas *Apis mellifera* no banco de dados *UniProt*, apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** MRJPs encontradas em busca na base de dados *UniProt*.

<b>Proteína</b>	<b>Código de acesso <i>UniProt</i></b>	<b>pI</b>	<b>Massa molar (Da)</b>	<b>Aminoácidos</b>
MRJP 1	O18330 (MRJP1_APIME)	5,10	48886,09	20 – 432
MRJP 2	O77061 (MRJP2_APIME)	6,83	51073,52	18 – 452
MRJP 3	Q17060 (MRJP3_APIME)	6,47	61661,79	21 – 544
MRJP 4	Q17061 (MRJP4_APIME)	5,89	52915,46	16 – 464
MRJP 5	O97432 (MRJP5_APIME)	5,95	70235,97	18 – 598
MRJP 6	Q6W3E3 (Q6W3E3_APIME)	5,89	49786,32	21 – 437
MRJP 7	Q6IMJ9 (Q6IMJ9_APIME)	4,90	50540,92	18 – 443
MRJP 8	Q6TGR0 (Q6TGR0_APIME)	6,00	46956,41	17 – 416
MRJP 9	(Q4ZJX1_APIME)	8,70	48687,94	21 – 423

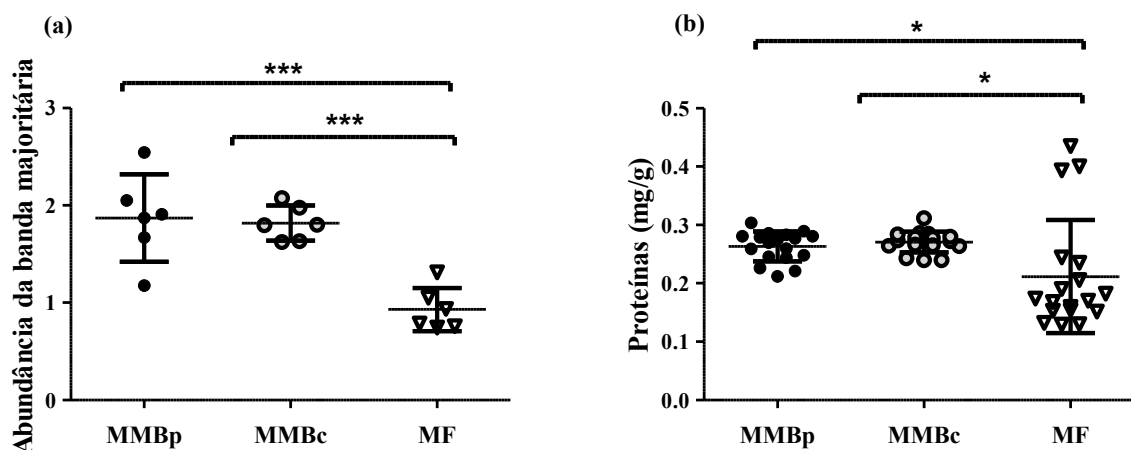
pI, ponto isoelétrico.

Fonte: o próprio autor (2019).

A análise dos géis demonstrou que a intensidade das bandas é mais alta para as amostras de MMB (Figuras 2a e 2b) do que para as amostras de MF (Figura 2c). A comparação quantitativa entre os géis foi realizada pela normalização da intensidade das bandas de acordo com os dados obtidos do *software* Image Lab. A Figura 3a apresenta a comparação em relação à banda principal (aproximadamente 55 kDa). A abundância da banda proteica principal é significativamente ( $p < 0,05$ ) maior para MMB puros e comerciais em comparação com os méis florais. A eficiência da extração de proteínas de méis pode ser estimada com base na análise do perfil de proteínas intactas por SDS-PAGE e, também, na determinação concentração total de proteínas, para analisar possíveis alterações.



**Figura 3.** Gráficos de comparação entre (a) abundância da proteína majoritária por SDS-PAGE e o (b) conteúdo de proteínas para os diferentes grupos de amostras de mel. MMBp, mel de melato de bracatinga puro, MMBc, mel de melato de bracatinga comercial, MF, mel floral. \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$ , pelo teste de *Tukey*, intervalo de confiança de 95%.



MMBp, mel de melato de bracatinga puro; MMBc, mel de melato de bracatinga comercial; MF, mel floral.

Fonte: o próprio autor (2019).

O teor total de proteínas das amostras também foi determinado e está apresentado mostrado na Figura 3b. Uma tabela com os valores de proteína total das amostras de mel analisadas está disponível no Apêndice F. Em concordância com os resultados de SDS-PAGE, o conteúdo de proteínas total foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior para os méis de melato de bracatinga puros e comerciais.

As proteínas identificadas por LC-MS/MS não-direcionada são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Identificação de proteínas em mel por LC-MS/MS não-direcionada e número correspondente de peptídeos.

	MRJP 1	MRJP 2	MRJP 3	MRJP 4	MRJP 5	MRJP 7
	Peptídeos (95%)*					
MMBp 1	31	9	9	3	8	4
MMBp 2	55	25	17	6	10	6
MMBp 3	49	21	14	4	9	8
MMBp 4	21	6	8	2	3	0
MMBp 5	33	4	6	-	-	-
MMBp 6	33	6	9	-	-	-
MMBc 7	38	10	9	2	-	3
MMBc 8	30	8	9	1	5	-
MMBc 9	32	7	7	-	6	-
MMBc 10	38	11	9	-	7	4
MMBc 11	37	9	8	-	6	3
MMBc 12	33	7	7	1	5	2
MF 13	25	7	5	-	4	-
MF 14	24	5	4	-	-	-
MF 15	39	11	8	-	6	-
MF 16	38	11	10	-	-	-
MF 17	21	5	4	-	-	-
MF 18	34	8	8	-	-	2

MMBp, mel de melato de bracinga puro; MMBc, mel de melato de bracinga comercial; MF, mel floral.

\*número de peptídeos diferentes com pelo menos 95% de confiança, incluindo também peptídeos parcialmente digeridos.

Fonte: o próprio autor (2019).

As seis proteínas mensuráveis pertencem ao grupo de proteínas da geleia real (MRJP). Entre 1 e 55 peptídeos foram identificados nessas proteínas. As MRJP 1, 2 e 3 foram identificadas em todas as amostras de mel e a MRJP 4 foi identificada apenas em méis de melato de bracinga, puros e comerciais, sendo, portanto, inicialmente considerada como possível marcador de MMB. No entanto, todas as MRJPs previamente identificadas foram posteriormente analisadas a fim de obter a caracterização completa das proteínas encontradas nas amostras de mel foco desse estudo.

O alinhamento das sequências das MRJPs no banco de dados *UniProt*, apresentado na Figura 4 mostrou que todas as nove MRJPs são essencialmente diferentes em sua sequência, de modo que é possível diferenciá-las com base na análise de seus peptídeos.

**Figura 4.** Alinhamento dos dados disponíveis para MRJPs na base de dados *UniProt* (acesso em 20-05-2019).

sp O18330 MRJP1_APIME/1-432	1	MTRLFMLVCLGIVCQGGTGNILRGESLNKSLPILHEWKFFDYDFGSDERRQDAILSGEYDYKNNYPSDIDQWHDKIFVTMLRYNGVPSLNLVISKVGDGGPLLQPPYDWSFAKYDDCSGIV	122
sp Q17060 MRJP3_APIME/1-544	1	MTKWL L L V V C L G I A C Q D V T S A A V N H Q R K S A N N L A H S M K V I Y E W K H I D F D F G S D E R R D A A I K S G E F D H T K N Y P F D V D R W R D K T F V T I E R N N G V P S L N V V T N K K G K G G P L L R P Y P D W S F A K Y E	122
sp Q17061 MRJP2_APIME/1-452	1	MTRWLFMVAACLGACQGAIVRENSPRNLEKSLNVIHEWKYFDYDFGSEERRQAAIQSGEYDHTKNYPFDVDQWRDKTFVTILRYDGVPSLNLVISEKTKGGKGRLLKPYPDWSFAEFKDCSKI	122
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	1	MTKWL L L M V C L G I A C Q N I R G G V V R E N S S G K N L T N T L N V I H K W K Y L D Y D F D N D E R R Q A A I Q S G E Y D R T K N Y P L D V D Q W H N K T F L A V I R Y N G V P S L N V V S D K T G N G G R L L Q P Y P D W S F A K Y E D	122
sp Q97432 MRJP5_APIME/1-598	1	MTTWL L L V V C L G I A C Q G I T S V T V R E N S P R K L A N S M N V I H E W K Y L D Y D F G S D E R R Q A A M O S G E Y D H T K N Y P F D V D Q W R G M T F V T V P R Y K G V P S L N V I S E K I G N G G R L L Q P Y P D W S W A K N Y K D C	122
tl Q4ZJX1 MRJP9_APIME/1-423	1	MSFN I W W L I L Y F S I V C Q A K A H Y S L R D F K A N I F Q V K Y Q W K Y F D Y N F G S D E K R Q A A I Q S G E Y M Y K N N V P I D V D R W N G K T F V T I L R N D G V P S S L N V I S N K I G N G G P L L E P Y P N W S W A K N Q N C S G I	122
tl Q6TGRQ MRJP8_APIME/1-416	1	MIRW L L L M Y L G I T C Q G V T D I H S R N L T N S L K V I Y E W K Y I D Y D F G S D E K R Q A A I Q S G D Y N T Y M N Y L L D T D Q W G D K T F V I I M K F N G V P S S L N V I T N K T G N G G P L L A P Y P D W T W A K N E C S G I T S A	122
tl Q6IMJ9 MRJP7_APIME/1-443	1	MTRWLFMVAACLGACQGAIVRENSARNLKNLSKVMHEWKYIDYDFGSEKRRQAAIQSDEYDHTKNYPFDVDQWRDKTFVTILRYDGVPSLNLVISEKTKGGKGRLLKPYPDWSWTKYKDCSKI	122
tl Q6W3E3 MRJP6_APIME/1-437	1	MTNWLLLVCLSLACQDVTSAIHQRKSSKNLEHSMNVIHEWKYIDYDFGSDSEKRRQAAIQSGEYDYTKNYPFDVDQWHNKTFLAVIRYDGVPSLNLVISEKIGNGGCLLQPPYDWSWANYKDC	122
sp O18330 MRJP1_APIME/1-432	123	SASKLAIDKCDRLWVLD SGLVNNTQPMCSPKLLTDFLTTSQLLKKQVEIPHDAVNATGKGRLLS LA VQSLDCNTNSDTMVI ADEKGEGLIVYHNSDDSFHRLTSNTFDYDPKFTKMTIDG	244
sp Q17060 MRJP3_APIME/1-544	123	DCSGIVSAFKIAVDKFDRLWVLD SGLVNNQPMCSPKLLTDFLTKTSKLVKQVEIPHNAVNATTGMGELVSLAVQAIDRTNTMVI ADEKGEGLIMYQNSDDSFHRLTSNTFDYDPRYTKLT	244
sp Q17061 MRJP2_APIME/1-452	123	VSAFKIAIDKFDRLWVLD SGLVNRTVPVCAKPLKVFDFLKTSHNLKQIEIPHDAVNATTGKGGVSLAVQAIDLANTLVYMDHKGDALIVYQNAADSFHRLTSNTFDYDPRYAKMTIDGES	244
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	123	CSGIVSAHKIAIDEYERLWVLD SGLVNNTQPMCSPKLFAFDLNTSQLKQVEIPHDAVATTGKGLVSLTVAQMDSTNTMVMYVDNKNTLIIYQNAADSFHRLSSHLLNHNSDKMSDQENLT	244
sp Q97432 MRJP5_APIME/1-598	123	SGIVSAYKIAIDKFDRLWLD SGLINNTQPMCSPKLHVDFDLNTSHQLKQVMPHDAVNATTGNGGLVSLVQAMDPVNTIYVMADDKGDALIVYQNSDES F H R L T S N T F D Y D P K Y I K M M D A	244
tl Q4ZJX1 MRJP9_APIME/1-423	123	TSVYRIADDEWDRWVLD SGLNNGSGETSVCPSQIVVFDLKNKSLKQVKIPHDAINSTTGKRNVTPIVQSFDYNTMVIADVEGYALIIYNNADDSFQRLTSSTFVYDPRYTKYINDES	244
tl Q6TGRQ MRJP8_APIME/1-416	123	YKIEIDMCDRLWVLD SGLINNVRSVCPMLLVDFDLNTSQLKQVKIPHDAVNATTGKALVTLVQLLSCVYNGSTLVYIDGNEGFALIIYNNSDS F Q R L T S S T F A S D P R Y T T F T I N G E S	244
tl Q6IMJ9 MRJP7_APIME/1-443	123	VSAFKIAIDKFDRLWVLD SGLVNNTQPMCFKLLAFDLNTSKLLKQIEIPHNAVNASTGMGGVSLVQAMDPMNTVYIADDRGDALIIYQNSDDSFHRLTSKTFDNDLRYSELAVA	244
tl Q6W3E3 MRJP6_APIME/1-437	123	SGIVSAYKIAIDKFDRLWVLD SGLINNIQLMCSPKLLAFDLNTSKLLKQIEIPHNAVNASTGMGGVSLVQAMDPMNTVYIADDRGDALIIYQNSDDSFHRLTSKTFDNDLRYSELAVA	244
sp O18330 MRJP1_APIME/1-432	245	ESYTAQDGISGMALSPMTNNLYYSPVASTSLYYVNT EQFRSDYQQNDIHYEGVQNLDTQSSAKVVS KSGV LFFGLVGD S A L G C W N E H R T L E R H N I R T V A Q S D E T L Q M I A S M K I K E A L P H V	366
sp Q17060 MRJP3_APIME/1-544	245	VAGESFTVKNGIYGIASLPVTNNLYYSP LASHGLYVDTEQFSNPQY EENN VQYEGSQDILNTQSFGKVVSKNGVLFGLVGN SGIACVNEHQVLQRESFDVVAQNEETLQMIIVSMKIMENL	366
sp Q17061 MRJP2_APIME/1-452	245	FTLKNGICGMALSPVTNNLYYSP LASHGLYVNTAPFMKSQFGENNVQYQGSSEILNTQSLAKAVSKNGVLFVGLVGN S A V G C W N E H Q S L Q R Q N L E M V A Q N D R T L Q M I A G M K I K E E L P H F V G	366
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	245	LKEVDNKVYGMALSPVTHNLYYNSPSENLYYVNTESLMKSENGQVDQYERVDVFD S Q L T V K A V S K N G V L F L G L A N N T L S C W N E H Q S L D R Q N I D V V A R N E D T L Q M V V S M K I K Q N V P Q S G R	366
sp Q97432 MRJP5_APIME/1-598	245	GESFTAQDGI FGMALSPMTNNLYYSP LSSRSLLYVNTKPFMKSEYGANNVQYQGVQDIFNTESI AKIMSKNGV L F F G L M N N S A I G C W N E H Q P L Q R E N M D M V A Q N E E T L Q T V V A M K M M H L P S	366
tl Q4ZJX1 MRJP9_APIME/1-423	245	S L Q D G I L G M A L S H K T Q N L Y Y S A M S S H N L N Y V N T K Q F T Q G K F Q A N D I Q Y Q G A S D I L W T Q A S A K A I S E T G A L F F G L V S D T A L G C W N E N R P L K R R N I E I V A K N N D T L Q F I S G I K I K Q I S S N I Y E	366
tl Q6TGRQ MRJP8_APIME/1-416	245	FTLQSGIFGMALSP L T Q N L Y Y S A L S S H N L N Y V N T E Q F V K S Q Y A N N V H Y Q G K E N I L W T Q A S A K G I S D N G V L F F G L V G D T S L A C W N E N R L L D R R N I E V V A K N K E T L Q A I T G L K V K R R I S F I L V	366
tl Q6IMJ9 MRJP7_APIME/1-443	245	FTVQDGIYGMALSPMTNNLYYSP LARSRLYVNTKPFIKSEYGENKVQYNGVQDVFNTQTAKAVSKNGILFFGLVNTAVGCWNEHQLQRENTDMVAQNEETLQMIIVGMKIKQLLPHIVI	366
tl Q6W3E3 MRJP6_APIME/1-437	245	GESFTVHDGIFGMALSPVTNNLYYSP L T S H S L Y V N M E P F M K S Q Y E E N N I E Y E G I Q D I F N T Q S S A K V M S K N G V L F F G L V N N S A I G C W N E H Q P L Q R Q N M D M V A Q N E K T L Q M I I S V K I I Q N L A Y	366
sp O18330 MRJP1_APIME/1-432	367	PIFDRYINREYILVLSNKMQMKNVND FNFDDVNFRI M N A N V N E L I N T R C E N P D N D R T P F K I S I H L	432
sp Q17060 MRJP3_APIME/1-544	367	PQSGRINDPEGNEYMLALSNRMQKINND FNFDFNFRILGANVDDL M R N T R C G R Y H N Q A G N Q A D N Q N A D N Q N A N N Q N A D N Q N A N K Q N G N R Q N D N R Q N D N K Q N G N R Q N D N	488
sp Q17061 MRJP2_APIME/1-452	367	SNKPVKDEYMLVLSNRMQKILVND FNFDDVNFRI LGANVKELIRNTHCVNNQNDNIQNTNNQNDNNQKNNKKNANNQKNNQNDN	452
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	367	VNNTQRNEYLLALSDRNQNLVNDLLEHVN FQILGANVNDLIRNSRCANFDNQNDNNYHNNHNQARHSSKSDNNQNNQNDQAHS SKSNRRHNNND	464
sp Q97432 MRJP5_APIME/1-598	367	NKMMRMRMNRVNRVNRMDRMDRIDRMDRMDRMDTMDTMDRIDRMDRMDRIDRMDRMDTMDTMDRDKMS SMDRMDRMDRVD TMDTMDTMDRMDR	488
tl Q4ZJX1 MRJP9_APIME/1-423	367	RQNNNEYIWI VSNKYQKIANGDLNFNEVNFRI LNA PVNQLIRYTRCENPKTNFFSIFL	423
tl Q6TGRQ MRJP8_APIME/1-416	367	HGFPLEYEYVLAVSNRIQKVIYGFDFNDVNFRI L I A N V N D L I K N T R C I S P	416
tl Q6IMJ9 MRJP7_APIME/1-443	367	IDIDNIINDEYMLVLTNRMQKILNLDLNFNDINFRILIGVSDLLENTRCTNFNIQNDSDENNDDSI RITIDASFN	443
tl Q6W3E3 MRJP6_APIME/1-437	367	SGRMNRHKNEYMLALSNRMQKILVND FNFDEVNFRILGANVNLLIKNTRCAKSNQNNQNNQKYNQAHL	437
sp O18330 MRJP1_APIME/1-432	489	KQNGNRQNGNKQNDNKQNGNRQNDNKRNGNRQNDNQNNDNRRNDNQVHSSKLH	544
sp Q17060 MRJP3_APIME/1-544	489	MDRMDRMDRMDRMDTMDRDKMSRIDRMDKIDRMDRMDRNRMDRMRMNRQMEYMMALSMKLQKFINDYFNFEVNFRI LGANVNDLIMNTRCANS DNQNNQNNKHN	598
sp Q17061 MRJP2_APIME/1-452			
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464			
sp Q97432 MRJP5_APIME/1-598			
tl Q4ZJX1 MRJP9_APIME/1-423			
tl Q6TGRQ MRJP8_APIME/1-416			
tl Q6IMJ9 MRJP7_APIME/1-443			
tl Q6W3E3 MRJP6_APIME/1-437			

MRJP, major royal jelly protein. Extraído de <https://www.uniprot.org/>.

Fonte: o próprio autor (2019).

Os peptídeos identificados foram testados quanto à sua adequação como marcadores por meio de digestão *in silico* empregando o *software Skyline*. Somente peptídeos presentes em todas as entradas da mesma MRJP produzida por abelhas *Apis mellifera* foram considerados para verificar a exclusividade, usando as sequências de proteínas importadas do banco de dados *UniProt*. Um teste preliminar para detecção dos possíveis marcadores por LC-QqQ-MS/MS foi realizado e então alguns peptídeos foram selecionados para cada MRJP. Dezenove peptídeos (para identificação e quantificação) representantes das 6 MRJPs (1, 2, 3, 4, 5 e 7) identificadas nas amostras de mel foram monitorados.

As sequências de aminoácidos geradas foram comparadas com as entradas de MRJPs no banco de dados *UniProt* usando o algoritmo de busca *BLAST*. A pesquisa considerou todas as MRJPs de todas as espécies de abelhas para tornar a pesquisa mais robusta possível. A análise *BLAST* mostrou que dos 19 peptídeos monitorados, 6 eram específicos para as MRJPs analisadas. Isso significa que os demais peptídeos estavam presentes em mais de uma MRJP ou mesmo estavam presentes em outras proteínas e enzimas. Os peptídeos selecionados como marcadores foram confirmados por LC-MS/MS no modo SRM.

O fluxo de trabalho para a seleção dos peptídeos pode ser resumido como: digestão *in silico* e verificação de exclusividade (*Skyline*) → teste preliminar de detecção por LC-MS/MS → otimização do tempo de retenção e da energia de colisão → pesquisa *BLAST*. Ao fim destas etapas, os melhores peptídeos com maiores intensidades de massa de cada proteína foram selecionados para quantificação. Estes peptídeos também apresentaram especificidade e baixa suscetibilidade à modificação.

### **3.2 Otimização do método de quantificação de peptídeos**

Considerando as proteínas digeridas, os peptídeos identificados *in silico* e os fragmentos de massa correspondentes, foram selecionados peptídeos específicos e pelo menos três fragmentos relevantes para cada MRJP. Para a quantificação por LC-MS/MS, o tempo de retenção e a energia de colisão foram otimizados. Os resultados da otimização para os peptídeos selecionados e suas transições, bem como para o padrão interno são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Peptídeos selecionados como marcadores de MMB e suas respectivas transições, tempos de retenção e energia de colisão otimizados.

Proteína	Peptídeo	Tr (min)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Ec
MRJP 1	SLPILHEWK	10,7	561,8 (2+)	922,5/712,4/599,3/333,2	18,4/24,4/24,2/21,4
	LLTFDLTTSQLLK	11,5	746,9 (2+)	790,5/689,4/588,4/590,3	24,2/24,2/24,2/24,2
	EALPHVPIFDR*	10,8	647,3 (2+)	980,5/883,5/746,4/548,3	27,1/27,1/27,1/27,1
MRJP 2	SLNVIHEWK	11,9	563,3 (2+)	712,4/599,3/462,2/333,2	21,5/21,5/21,5/21,5
	TFVTILR	12,9	425,3 (2+)	601,4/502,3/401,3/288,2	11,2/11,2/11,2/11,2
	LHVFDLK*	12,2	436,3 (2+)	621,4/522,3/375,2/260,2	14,5/14,5/14,5/14,5
	ILGANVK	10,9	357,7 (2+)	488,3/431,3/360,2/246,2	9,1/9,1/9,1/9,1
MRJP 3	VIYEWK	12,1	419,2 (2+)	625,3/462,2/333,2	14,0/14,0/14,0
	NYPFDVDR	12,1	513,2 (2+)	748,4/651,3/504,2/389,2	19,9/19,9/19,9/19,9
	TFVTIER*	11,8	433,2 (2+)	617,4/518,3/417,4/304,2	14,4/14,4/14,4/14,4
	LLTFDLK	13,3	425,3 (2+)	623,3/522,3/375,2/260,2	14,2/14,2/14,2/14,2
MRJP 4	QAAIQSGEYDR	9,7	619,3 (2+)	639,3/582,3/453,2/512,3	20,2/17,2/17,2/23,2
	QNIDVVAR*	10,0	457,8 (2+)	559,3/444,3/345,2	15,2/21,2/15,2
	NEYLLALSDR	10,9	597,3 (2+)	950,5/787,5/674,4/407,2	16,5/19,5/16,5/16,5
MRJP 5	YLDYDFGSDER	12,4	690,3 (2+)	710,3/563,2/506,2	31,4/31,4/19,4
	FINNDYFNNEVNFR*	13,0	903,4 (2+)	1039,5/92,5/778,4	32,0/35,0/35,0
MRJP 7	LLQPYPDWSWTK*	13,6	767,4 (2+)	1179,5/1082,5/919,4	21,8/30,8/21,8
	LLVFDLNSSQLIK	14,2	745,4 (2+)	1164,6/789,4/675,4/588,4	21,1/27,1/30,1/21,1
	ILNNDLNFNDINFR	13,4	861,4 (2+)	1039,5/925,5/549,3/322,2	33,7/33,7/33,7/33,7
PI <sup>a</sup>	LLGFGINADENQR	11,00	723,9 (2+)	846,4/661,3/546,3	29,4/26,4/32,4

MRJP, *major royal jelly protein*; Tr, tempo de retenção; Ec, energia de colisão; Q1, relação massa/carga do íon precursor; Q3, relação massa/carga do íon produto.

<sup>a</sup>PI, padrão interno, peptídeo da  $\beta$ -conglutina.

\*Peptídeos selecionados para quantificação.

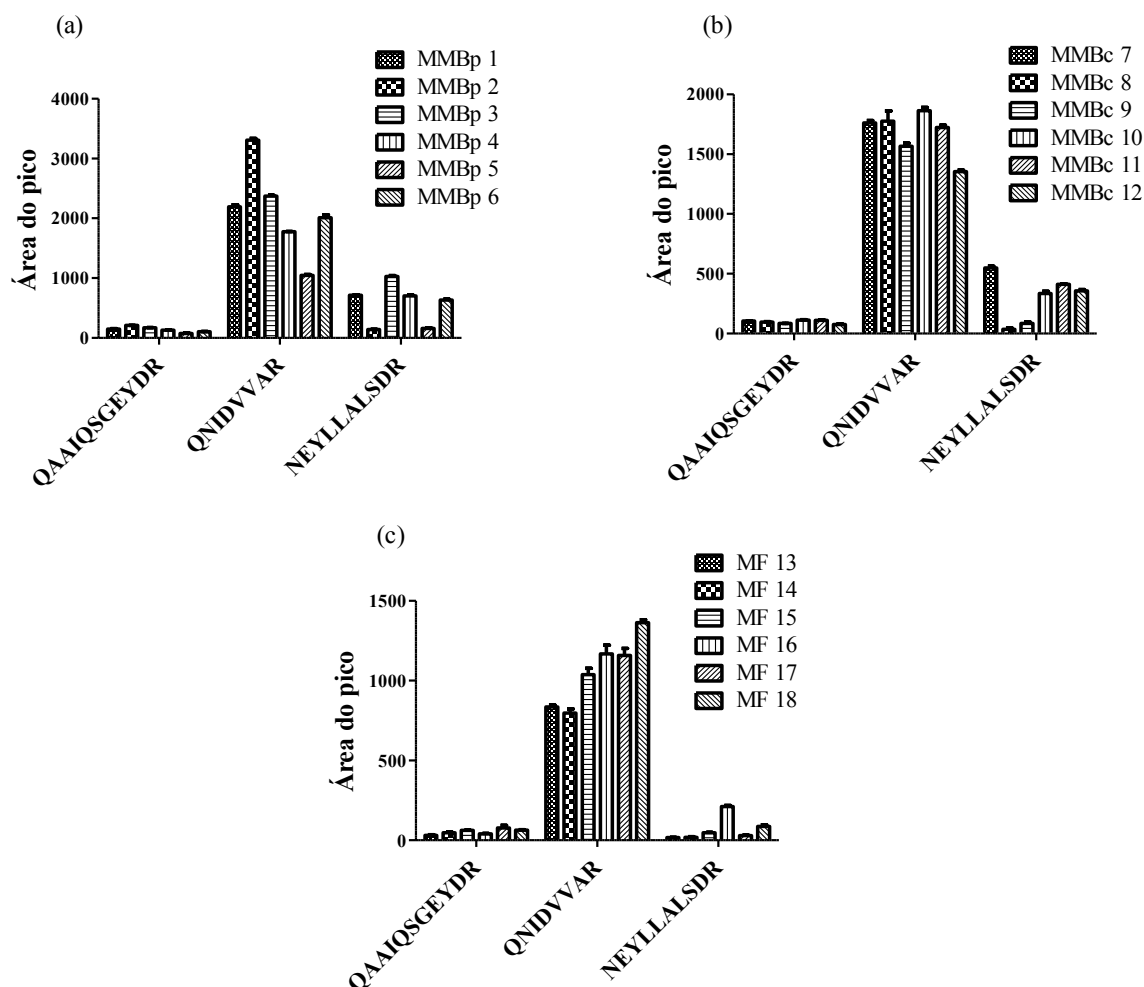
Fonte: o próprio autor (2019).

Posteriormente, a abundância relativa de cada peptídeo de quantificação foi mensurada considerando a área total de todas as transições analisadas. Para todas as MRJPs, um peptídeo foi selecionado para quantificação. Além disso, para as MRJPs 1, 4 e 7, dois peptídeos foram selecionados para confirmação da identidade, para MRJPs 2 e 3, três peptídeos de confirmação foram selecionados e para MRJP 5 apenas um peptídeo foi escolhido para confirmação.

A seleção de peptídeos é uma etapa crítica na otimização do método, uma vez que é importante selecionar peptídeos que não sofreram modificações como alquilação e oxidação. Diferenças no rendimento da extração e digestão e a modificação de peptídeos podem causar respostas diferentes de peptídeos originários da mesma proteína. Em méis, a modificação dos peptídeos pode ocorrer devido à reação de Maillard, entre as cadeias laterais de lisina ou arginina das proteínas e os açúcares redutores (glicose, frutose) (BRUDZYNSKI; MIOTTO, 2011). A modificação do peptídeo também pode ser dependente das condições de processamento e armazenamento, que são inclusive fatores críticos para a qualidade dos méis (KORTE; BROCKMEYER, 2017).

A MRJP 4, foi escolhida como principal candidata a marcador de MMB, e os respectivos peptídeos escolhidos para identificação desta proteína demonstraram claramente a importância da seleção criteriosa. A Figura 5 mostra a área dos picos dos 3 peptídeos selecionados para caracterização de MRJP 4 nas amostras de mel.

**Figura 5.** Intensidades dos peptídeos para identificação (QAAIQSGEYDR e NEYLLALSDR) e quantificação (QNIDVVAR) da MRJP 4, em amostras de (a) MMBp, (b) MMBc e (c) MF. Resultados expressos como média e coeficiente de variação ( $n = 3$ ) para cada amostra de mel.



Fonte: o próprio autor (2019).

A intensidade do peptídeo NEYLLALSDR mostra que a arginina na posição 371 da MRJP 4 (sequência disponível como Apêndice G) foi provavelmente modificada. As áreas dos picos para este peptídeo não refletem o padrão das proteínas presentes nas amostras analisadas, que pode ser observado nos resultados do SDS-PAGE (Figura 2) e no conteúdo total de proteínas, estimado pelo método Lowry (Figura 3b e Apêndice F). Um efeito semelhante foi observado para o peptídeo QAAIQSGEYDR.

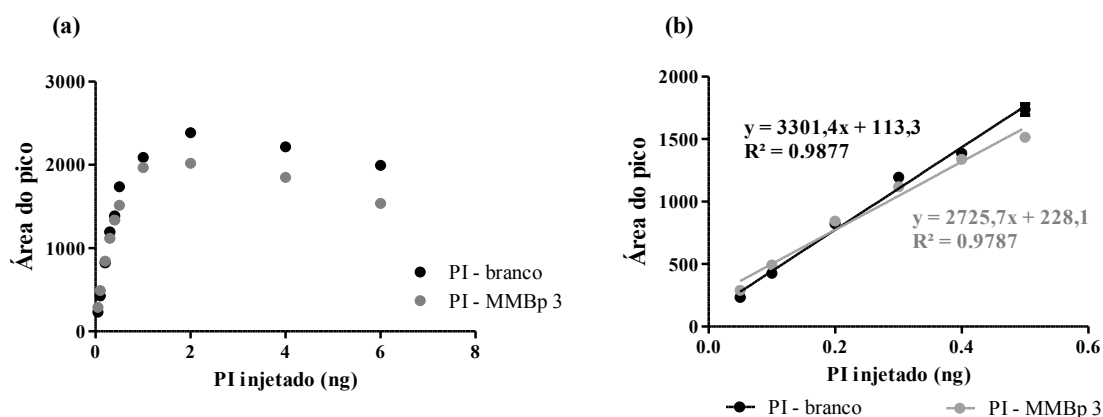
O conteúdo de proteínas da amostra MMBp 2 foi o maior dentre as amostras de MMBp, conforme tabela apresentada como Apêndice F. Este resultado também foi observado na área do pico do peptídeo escolhido para a quantificação QNIDVVAR. O mesmo comportamento foi observado para os outros tipos de mel (MMBc e MF), onde a intensidade do peptídeo

QNIDVVAR corroborou com os teores totais de proteína (Figura 3b e APÊNDICE F) e os resultados de SDS-PAGE (Figura 2) para cada amostra de mel, o que não ocorreu com os peptídeos de identificação (NEYLLALSDR e QAAIQSGEYDR), demonstrando a importância da seleção criteriosa dos peptídeos marcadores, para evitar aqueles que foram modificados.

### 3.3 Validação do método

O método otimizado foi validado para garantir a quantificação relativa precisa dos peptídeos. A linearidade foi mensurada para o padrão interno em um ensaio branco (sem a presença de qualquer amostra de mel) e na amostra de mel MMBp 3, conforme apresentado na Figura 6.

**Figura 6.** Linearidade determinada para (a, b) o padrão interno na matriz, em branco e na amostra MMBp 3.



PI, padrão interno.

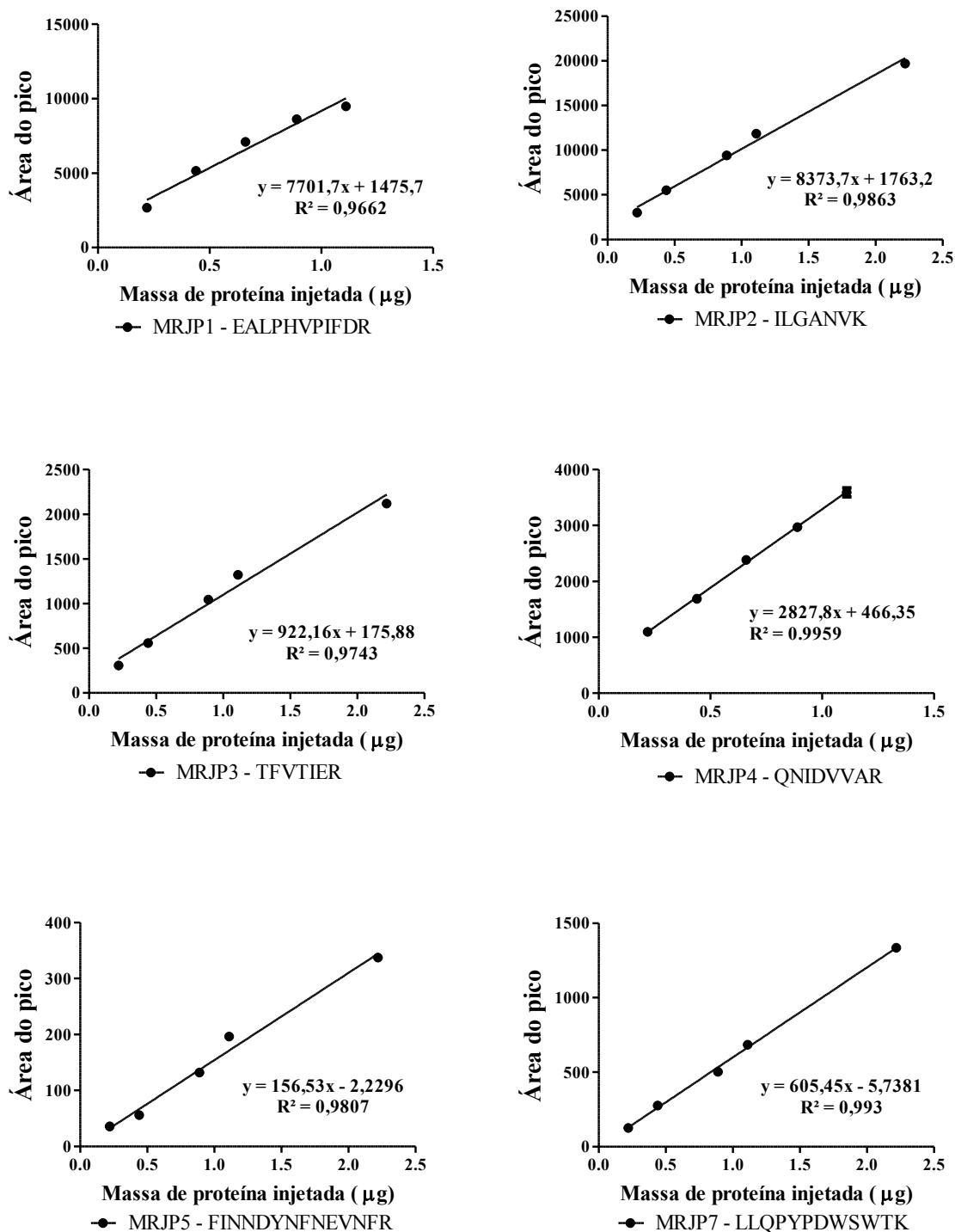
Fonte: o próprio autor (2019).

A Figura 6a demonstrou que uma resposta linear foi observada até a quantidade de 2 ng de PI injetada. Quando menos de 0,2 ng foram injetados, o sinal do PI foi insuficiente e quando grandes quantidades ( $> 1$  ng de PI) foram injetadas, o sinal apresentou-se saturado. Sendo assim, as curvas de linearidade foram construídas considerando o intervalo em torno de 0,3 ng, como mostrado na Figura 6b.

A linearidade também foi mensurada para os peptídeos de quantificação de cada MRJP e os gráficos estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7.** Curvas de linearidade para os peptídeos de quantificação das MRJPs em amostras de mel.



Fonte: o próprio autor (2019).

Para os peptídeos de quantificação 0,1 a 14 µg de massa de proteína foram injetados. A resposta linear foi alcançada até 2 µg, de modo que as curvas de linearidade foram construídas considerando essa quantidade. Todas as curvas de linearidade dos peptídeos de quantificação apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,97.

A especificidade foi comprovada para a quantificação de todas as MRJPs. Os resultados são apresentados na Tabela 5. A porcentagem de área variou de 0,6% para MRJP1 a 19,1% para MRJP 7. Os limites de detecção variaram de 0,001 ng (MRJP 1) a 0,136 ng (MRJP 2) e também são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Avaliação da especificidade e dos limites de detecção e quantificação dos peptídeos de quantificação para as MRJPs.

Proteína	Peptídeo	Especificidade				LOD <sup>c</sup>	LOQ <sup>d</sup>
		AP branco	Menor AP <sup>a</sup>	Amostra <sup>b</sup>	% Área		
MRJP1	EALPHVPIFDR	13	2238.6	MF 14	0,6	0,001	0,002
MRJP2	ILGANVK	11	1662.3	MF 15	0,6	0,136	0,412
MRJP3	TFVTIER	12	296.1	MF 15	4,1	0,096	0,291
MRJP4	QNIDVVAR	6	814.0	MF 13	0,7	0,026	0,077
MRJP5	FINNDYNFNEVNFR	1	35.7	MMBp 3	2,8	0,100	0,303
MRJP7	LLQPYPDWSWTK	24	125.3	MMBp 3	19,1	0,049	0,150
PI (branco)	LLGFGINADENQR					0,020	0,000
PI (MMBp 3)	LLGFGINADENQR					0,080	0,000

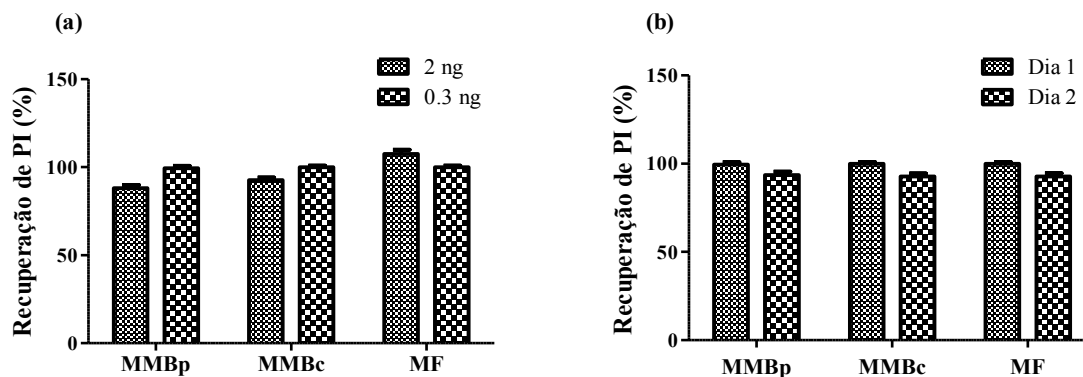
AP, área do pico. MRJP, *major royal jelly protein*. PI, padrão interno.

<sup>a</sup>menor área de pico medida; <sup>b</sup>amostras escolhidas por apresentarem conteúdo médio do respectivo peptídeo; <sup>c</sup>expressos em ng; <sup>d</sup>expressos em ng.

Fonte: o próprio autor (2019).

A recuperação foi realizada em diferentes concentrações (considerando os resultados de linearidade) do PI injetado nas diferentes amostras de mel, conforme apresentado na Figura 8.

**Figura 8.** Gráficos de (a) quantidades testadas para recuperação e (b) recuperação e repetibilidade do PI (LLGFGINADENQR) nos diferentes tipos de amostras de mel. Resultados expressos como média e coeficiente de variação ( $n = 18$ ) para cada amostra de mel.



Fonte: o próprio autor (2019).

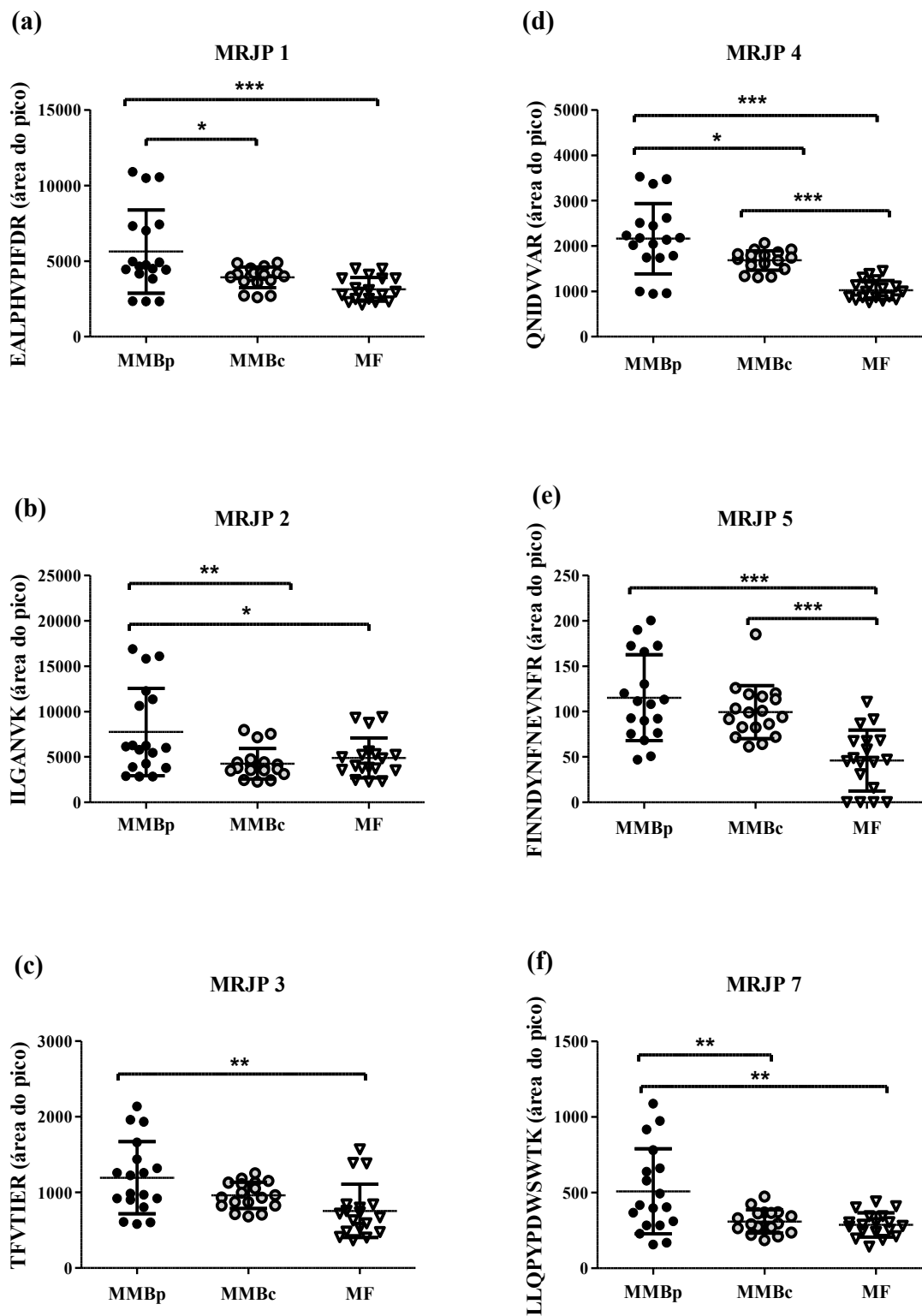
A quantidade injetada 0,3 ng do PI (LLGFGINADENQR) foi escolhida para avaliação da recuperação por apresentar melhores resultados ( $p < 0,05$ ) (Figura 8a). A Figura 8b ilustra a porcentagem de recuperação do PI nas amostras de mel, variando de 92 a 100%. Os coeficientes de variação entre 4,4 e 10,2% demonstraram a satisfatória repetibilidade do método.

### 3.4 Quantificação relativa de peptídeos em mel

Para quantificar os peptídeos selecionados em amostras de mel, a espectrometria de massas de alta resolução no modo SRM foi realizada. Um peptídeo foi utilizado para quantificação de cada MRJP, enquanto os demais peptídeos foram utilizados para identificação, garantindo a identidade da proteína.

A pesquisa com o algoritmo *BLAST* mostrou que peptídeos específicos de MRJPs foram encontrados em três proteínas, MRJP 1 (EALPHVPIFDR), MRJP 3 (TFVTIER e LLTFDLK) e MRJP 4 (QNIDVVAR). Informações sobre a pesquisa *BLAST* estão disponíveis como Apêndice G. No entanto, além da singularidade, as intensidades e a detecção em amostras de mel também devem ser consideradas para decidir qual candidato é o melhor para ser considerado como marcador, neste caso, de MMB. A quantificação relativa dos peptídeos em mel de melato de bracinga é apresentada na Figura 9.

**Figura 9.** Quantificação de peptídeos de MRJP (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5 e (f) 7 em amostras de mel e comparação entre os diferentes grupos de mel. MMBp, mel de melato de bracatinga puro, MMBc, mel de melato de bracatinga comercial, MF, mel floral. \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*  $p < 0,05$  pelo teste de *Tukey*, intervalo de confiança de 95%.



O peptídeo de quantificação QNIDVVAR (MRJP 4) foi encontrado em todas as amostras, contrariando os resultados preliminares de identificação de proteínas por LC-MS/MS que mostraram a presença desta proteína somente nas amostras de MMB. A sensibilidade do instrumento e o modo de detecção devem ser considerados, o que explica por que a análise direcionada por LC-QqQ-MS/MS mostrou que o conteúdo de MRJP 4 foi significativamente maior nas amostras de MMB, como demonstra a Figura 9d. Portanto, a MRJP 4 foi escolhida como marcador de MMB, considerando que a resposta para a quantificação do peptídeo QNIDVVAR foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em comparação com todos os outros méis.

Exceto pelo peptídeo EALPHVPIFDR (MRJP 1), os outros peptídeos selecionados apresentaram maiores teores em MMB (puros e comerciais) quando comparados aos méis florais. Esse resultado foi importante pois demonstrou que a concentração de algumas proteínas específicas foi maior em méis de melato. Considerando a comparação entre MMBp e MMBc, os peptídeos selecionados apresentaram maior conteúdo em MMBp para as MRJPs 1, 2, 4 e 7.

A pureza das amostras comerciais de MMB não pode ser garantida porque elas não foram drenadas dos favos de mel em condições controladas, não eximindo tal amostra de uma possível contaminação cruzada de outros méis que porventura possam ter sido processados no mesmo local. A presença de cristais de açúcar em algumas amostras comerciais de MMB poderia indicar a adição de mel floral, uma vez que os méis de melato usualmente não cristalizam devido à relação frutose/glicose característica destes méis (BERGAMO et al., 2018b). No entanto, o mel de melato também pode ser naturalmente contaminado com mel floral, uma vez que não é possível controlar a trajetória de voo e a alimentação natural das abelhas. Estes fatores conduzem a novas perspectivas de estudos que possibilitem alcançar resultados procedentes do monitoramento do perfil desses peptídeos a partir de misturas controladas com diferentes proporções de méis florais, semelhante ao estudo publicado por Bergamo et al. (2018a).

Independentemente de quais hipóteses são verdadeiras para explicar a diferença na quantidade de proteínas entre as amostras de MMB puras e comerciais, o resultado obtido mostra a importância da abordagem proteômica escolhida neste trabalho para a diferenciação deste mel ou para identificar um marcador específico, proveniente da geleia real, uma vez que a fraude de méis de melato seria inviabilizada pelo alto custo e disponibilidade de geleia real.

Este é o primeiro estudo que compila um conjunto abrangente de marcadores de peptídeos de mel para o desenvolvimento do método SRM, apesar da complexidade dessa matriz alimentar. A análise quantitativa de peptídeos de mel também é importante, uma vez que

a bioatividade destes também está diretamente associado à quantidade ingerida. Ademais, o estabelecimento de marcadores pode tornar o MMB um produto mais atraente para o mercado nacional e internacional, com vistas ao estabelecimento de um sistema de rastreabilidade e, conseqüentemente, maior garantia de autenticidade.

#### 4. CONCLUSÃO

A abordagem proteômica utilizada, com base na identificação não-direcionada de proteínas do mel por LC-ESI-Triple-TOF-MS/MS, seguida pela seleção de peptídeos marcadores por *BLAST* e *Skyline* e a quantificação direcionada por LC-QqQ-MS/MS, proporcionaram a seleção e quantificação satisfatória dos peptídeos marcadores de MMB.

Os resultados apresentados neste estudo revelaram que o peptídeo QNIDVVAR para quantificação da MRJP 4 pode ser usado para diferenciar méis de melato de bracinga de méis florais. Experimentos adicionais usando o isótopo do peptídeo marcador identificado permitiriam uma quantificação absoluta dessa proteína em diferentes tipos de mel. Essa estratégia, por sua vez, pode ser utilizada para estabelecer um intervalo de confiança para a presença desta proteína em MMB, que é importante para garantir sua autenticidade. Para este propósito, se faz necessário analisar uma quantidade de amostras mais abrangente, considerando diferentes origens, práticas de manejo e processamento, entre outras variáveis.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou dados inéditos quanto ao potencial anti-inflamatório e à diferenciação do mel de melato de bracatinga a partir da determinação de um marcador proteico.

O desenvolvimento e validação dos métodos de extração de compostos fenólicos por QuEChERS e quantificação por HPLC-DAD permitiu estabelecer um procedimento de rotina para determinação destes compostos, com confiabilidade, etapas mais simples de extração, menor geração de resíduos e maior rendimento em comparação aos métodos previamente empregados. Ainda, possibilitou o emprego de diferentes estratégias quimiométricas que contribuem tanto para a caracterização do mel de melato de bracatinga quanto para a área de ciência de alimentos, em outras determinações em que muitos analitos devem ser considerados.

O potencial anti-inflamatório do mel de melato de bracatinga foi demonstrado frente a linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7. Algumas amostras foram mais eficientes na inibição de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos, quando estes foram estimulados por LPS, e esse efeito foi associado a composição fenólica das mesmas. A modulação de óxido nítrico e das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-12p70, INF- $\gamma$  por amostras de mel de melato de bracatinga mostrou pela primeira vez o potencial deste produto de combater processos inflamatórios, mesmo quando empregado em baixas concentrações, de 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A diferenciação do mel de melato de bracatinga se tornou uma necessidade latente durante a realização deste trabalho, e por tal motivo, a autenticidade do mesmo foi estudada por meio de análise proteômica, realizada junto ao Grupo de Análise Instrumental em Ciências Nutricionais da Universidade de Potsdam, Alemanha, liderado pelo professor Harshadrai Rawel, durante o período de doutorado sanduíche. Esta estratégia permitiu inicialmente identificar todas as proteínas do mel de melato de bracatinga e em um segundo momento, desenvolver um método do tipo SRM para análise direcionada de peptídeos marcadores deste produto. Dezenove peptídeos foram identificados como exclusivos em proteínas de mel de melato de bracatinga e utilizados para identificação e quantificação destas proteínas. O peptídeo QNIDVVAR da MRJP 4 pode ser utilizado como marcador de mel de melato de bracatinga.

Espera-se que a divulgação dos resultados obtidos a partir deste estudo possibilite fornecer apoio técnico ao setor de apicultura e órgãos de apoio e controle, permitindo uma maior valorização do mel de melato de bracatinga, tanto em nível nacional, quanto internacional, considerando que foi desenvolvida uma estratégia para determinação da autenticidade e que outros resultados foram gerados, reafirmando seus benefícios à saúde e

ampliando o conhecimento científico a respeito. A publicação destes resultados aumenta a visibilidade e o interesse pelo produto, e fomenta a cadeia produtiva, tanto pelo aumento da demanda quanto pela possibilidade de contribuição com o processo de denominação de origem do mel de melato de bracatinga.

Estudos futuros devem considerar diferentes amostras de mel de melato de bracatinga, dada a relação entre a constituição do mel e o efeito biológico, neste caso, anti-inflamatório. Estudos de sinergismo entre compostos fenólicos também devem ser realizados para entender se o mel obtido pode modular um ou mais alvos inflamatórios, sugerindo informações sobre a potência anti-inflamatória ou espectro de ação. Visando tornar o método de identificação de peptídeos marcadores de mel de melato de bracatinga ainda mais robusto, a síntese do peptídeo marcador permitiria a quantificação absoluta da proteína MRJP 4 em diferentes tipos de mel. Essa estratégia, por sua vez, poderia ser usada para estabelecer um intervalo de confiança para essa proteína em méis de melato de bracatinga. Para isso, será necessário analisar uma população maior de amostras, considerando as diferentes origens de ocorrência, as práticas de manejo e processamento, entre outras variáveis. A possibilidade de quantificação dos peptídeos em mel empregando outras técnicas analíticas também deve ser considerada. Finalmente, a possibilidade de avaliação do efeito anti-inflamatório dos peptídeos marcadores também é uma questão a ser considerada.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIERNO, V. et al. Making cocoa origin traceable: Fingerprints of chocolates using Flow Infusion - Electro Spray Ionization - Mass Spectrometry. **Food Control**, v. 2018, p. 245–252, 2018.

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods , a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.

ADEDARA, I. A. et al. Protocatechuic acid ameliorates neurobehavioral deficits via suppression of oxidative damage , inflammation , caspase-3 and acetylcholinesterase activities in diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, n. December 2018, p. 170–181, 2019.

AFRIN, S. et al. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 1: Enhancement of cellular viability, regulation of cellular apoptosis and improvement of mitochondrial functionality. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, n. August, p. 203–213, 2018.

AHMAD, W. et al. Immunomodulatory effects of *Tinospora crispa* extract and its major compounds on the immune functions of RAW 264 .7 macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 60, n. February, p. 141–151, 2018.

ALCÁNTARA-DURÁN, J. et al. Use of a modified QuEChERS method for the determination of mycotoxin residues in edible nuts by nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 279, p. 144–149, 2019.

ALCÁNTARA, D. B. et al. Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. **Food Chemistry**, v. 298, p. 124958, 2019.

ALDA-GARCILOPE, C. et al. Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin “miel de Granada” according to their mineral content. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1785–1788, 2012.

ALFIERI, F. The Role of Omic Sciences in Food Security and Sustainability. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, v. 1, p. 44–49, 2019.

ALIAÑO-GONZÁLEZ, M. J. et al. A screening method based on Visible-NIR spectroscopy for the identification and quantification of different adulterants in high-quality honey. **Talanta**, v. 203, n. January, p. 235–241, 2019.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1508–1516, 2012.

AN, N. et al. Metabolic profiling of organic acids in honey by stable isotope labeling assisted liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 87, n. November 2019, 2020.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Determination of Ochratoxin A in wine by packed in-

tube solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1493, p. 41–48, 2017.

ANJOS, O. et al. Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. **Food Chemistry**, v. 169, p. 218–223, 2015.

AOAC INTERNATIONAL. AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 17–26, 2011.

ÁVILA, S. et al. Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, p. 1–10, 2019.

AZEVEDO, M. S. et al. Free amino acid determination by GC-MS combined with a chemometric approach for geographical classification of bracatinga honeydew honey (*Mimosa scabrella* Benth). **Food Control**, v. 78, p. 383–392, 2017a.

AZEVEDO, M. S. et al. Proteome comparison for discrimination between honeydew and floral honeys from botanical species *Mimosa scabrella* Benth by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 13, p. 4515–4519, 2017b.

BAHADI, M. et al. Optimization of response surface methodology by D-optimal design for synthesis of food-grade palm kernel based biolubricant. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111452, 2019.

BALLUS, C. A. et al. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 83, n. 4, p. 1181–1187, 2011.

BALLUS, C. A. et al. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 558–568, 2014.

BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.; NAMIESNIK, J. Determination of pesticide residues in honeybees using modified QUEChERS sample work-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2911–2924, 2014.

BERGAMO, G. et al. Mineral profile as a potential parameter for verifying the authenticity of bracatinga honeydew honeys. **Lwt**, v. 97, n. June, p. 390–395, 2018a.

BERGAMO, G. et al. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. **Food Research International**, v. 116, p. 745–754, set. 2018b.

BERGAMO, G. et al. Differentiation of honeydew honeys and blossom honeys: a new model based on colour parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 2771–2777, 2019.

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, n. 1, p. 296–302, 2011.

BIESAGA, M.; PYRZYŃSKA, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during

different extraction methods. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 46–54, 2013.

BILAL, B.; AZIM, M. K. Nematicidal activity of ‘major royal jelly protein’-containing glycoproteins from Acacia honey. **Experimental Parasitology**, v. 192, n. July, p. 52–59, 2018.

BILUCA, F. C. et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). **Food Research International**, v. 129, p. 108576, 2020.

BÖHME, K. et al. Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 221–232, 2019.

BÖNICK, J.; HUSCHEK, G.; RAWEL, H. M. Determination of wheat, rye and spelt authenticity in bread by targeted peptide biomarkers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 82–91, 2017.

BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Le miel: origine et composition. **Actualités Pharmaceutiques**, v. 52, n. 531, p. 18–21, 2013.

BORGES, C. N. et al. Mixture-mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia sinensis*. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 28–37, 2007.

BORGES, E. M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 4, p. 945–953, 2010.

BOURGUIGNON, B.; MASSART, D. L. Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer’s desirability function. **Journal of Chromatography A**, v. 586, n. 1, p. 11–20, 1991.

BOYACI, E. et al. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 14–30, 2015.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 11, DE 20 DE OUTUBRO DE 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**, v. 6, n. 2, p. 103, 2000.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 95, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2018. **Condições para o registro das Indicações Geográficas**, v. 15, n. 4, p. 2046–2069, 2018.

BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 9, p. 1439–1449, 2009.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v. 128, n. 1–2, p. 93–106, 1998.

BRUDZYNSKI, K.; MIOTTO, D. The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 869–874, 2011.

BRUGNEROTTO, P. et al. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey. **Journal of Food Composition and**

**Analysis**, v. 82, n. June, p. 103243, 2019.

BUENO-COSTA, F. M. et al. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 333–340, 2016.

BURIN, V. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155–163, 2014.

CAI, M. et al. Behavior and rejection mechanisms of fruit juice phenolic compounds in model solution during nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 195, p. 97–104, 2017.

CAMPONE, L. et al. Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1334, p. 9–15, 2014.

CAMPOS, G. et al. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 1–5, 2003.

CAN, Z. et al. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, v. 180, p. 133–141, 2015.

CANDIRACCI, M. et al. Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 50, p. 12304–12311, 2012.

CARON, B. O. et al. Movimentação de *Trigona spinipes* (Fabricius) na *Mimosa scabrella* (Bentham) em função de fatores climáticos. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 3, p. 270–276, 2013.

CASTRO-PUYANA, M.; HERRERO, M. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 74–87, 2013.

CEBRERO, G. et al. Relationship among the minor constituents, antibacterial activity and geographical origin of honey: A multifactor perspective. **Food Chemistry**, v. 315, p. 126296, 2020.

CERNAK, M. et al. Honey prophylaxis reduces the risk of endophthalmitis during perioperative period of eye surgery. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 4, p. 613–616, 2012.

CHAMORRO, F. J.; NATES-PARRA, G.; KONDO, T. Mielato de *Stigmatococcus asper* (Hemiptera: Stigmatococcidae): recurso melífero de bosques de roble en Colombia. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 39, n. August 2015, p. 61–70, 2013.

CHAN, M. W. Y.; VISWANATHAN, S. Recent progress on developing exogenous monocyte/macrophage-based therapies for inflammatory and degenerative diseases. **Cytotherapy**, v. 21, n. 4, p. 393–415, 2019.

CHANPUT, W.; KRUEYOS, N.; RITTHIRUANGDEJ, P. Anti-oxidative assays as markers for anti-inflammatory activity of flavonoids. **International Immunopharmacology**, v. 40, p. 170–175, 2016.

CHEN, P. X. et al. Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food**

**chemistry**, v. 185, p. 298–308, 2015.

CHEN, S. et al. Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 242, n. August 2017, p. 1–8, 2018.

CHEN, X. et al. Double salting-out effect assisted heat-shrinkable tubing liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1603, p. 44–50, 2019.

CHERNG, J.; CHIANG, W.; CHIANG, L. Immunomodulatory activities of edible beans and related constituents from soybean. **Food Chemistry**, v. 104, p. 613–618, 2007.

CHISTÉ, R. C. et al. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 1, p. 57–63, 2011.

CIULU, M. et al. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. **Talanta**, v. 83, n. 3, p. 924–929, 2011.

COCHRAN, B. Y. W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 1941.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia**. Campinas, Brazil: Editora da Unicamp, 2006.

COMALADA, M. et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 1010–1021, 2006.

COSCO, D. et al. Rutin-loaded chitosan microspheres : Characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 583–591, 2016.

DAHER, S.; GÜLAÇAR, F. O. Analysis of Phenolic and Other Aromatic Compounds in Honeys by Solid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5775–5780, 2008.

DAMERVAL, C. et al. Technical improvements in two- dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat- seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52–54, 1986.

DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. DO A. Investigation into the physicochemical stability and rheological properties of rutin emulsions stabilized by chitosan and lecithin. **Journal of Food Engineering**, v. 229, p. 12–20, 2018.

DELGADO-ZAMARREÑO, M. M. et al. A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 100, p. 320–328, 2012.

DEMIAN, F. D.; MAKRIS, D. P. Factorial design optimisation of hydrocaffeic acid removal from an aqueous matrix by the use of a crude potato polyphenol oxidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 305–310, 2013.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1 out. 1980.

DEVI, A.; JANGIR, J.; K.A., A. A. Chemical characterization complemented with chemometrics for the botanical origin identification of unifloral and multifloral honeys from India. **Food Research International**, v. 107, p. 216–226, 2018.

DI BENEDETTO, P. et al. Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 18, n. 10, p. 102369, 2019.

DIAS, M. I. et al. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9–22, 2016.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 903–914, 2002.

DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J. et al. Programed nebulizing-gas pressure mode for quantitative capillary electrophoresis-mass spectrometry analysis of endocrine disruptors in honey. **Electrophoresis**, v. 33, n. 15, p. 2374–2381, 2012.

DUARTE, L. J. et al. Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. **Food Chemistry**, v. 247, n. July, p. 56–65, 2017.

DURAK, B. Y. et al. Validation of ultrasonic-assisted switchable solvent liquid phase microextraction for trace determination of hormones and organochlorine pesticides by GC–MS and combination with QuEChERS. **Food Chemistry**, v. 305, p. 125487, 2020.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Biometrika Trust Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. **Biometrika**, v. 38, n. 1, p. 159–177, 1971.

ESCRICHE, I. et al. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 142, p. 135–143, 2014.

ESCUREDO, O. et al. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 851–856, 2013.

EU. Commission Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. . 2002, p. 10–47.

EU. European Commission, Council N.o 510/2006. **Official Journal of the European Communities**, v. L 93/12, p. 12–25, 2006.

EU. Foods of plant origin — Determination of pesticide residues using GC-MS and / or LC-MS / MS following acetonitrile extraction / partitioning and cleanup by dispersive SPE — QuEChERS-method. **European Committee for Standardization**, v. 24, p. 1–83, 2007.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem Guide**, 2014. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>

EUROPEAN COMMISSION. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and

the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, p. 29, 2002.

FAN, R. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF- $\kappa$ B and activation of the heme oxygenase. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 5, p. 1021–1029, 2017.

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

FERREIRA, J. A. et al. Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 213, p. 616–624, 2016.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in food analysis – A review. **Food Chemistry**, v. 273, p. 3–8, 2019.

FINIMUNDY, T. C. et al. Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: A highly nutritious food and a source for bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 245, p. 150–158, 2018.

FLORENTINO, I. F. et al. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 69, p. 35–44, 2017.

FLORES, M. S. R.; ESCUREDO, O.; SEIJO, M. C. Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. **Food Chemistry**, v. 166, p. 101–106, 2015.

FONTANA, A. R.; BOTTINI, R. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1342, p. 44–53, 2014.

FONTANA, A. R.; CAMARGO, A. B.; ALTAMIRANO, J. C. Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 41, p. 6334–6341, 2010.

FROST-MEYER, N. J.; LOGOMARSINO, J. V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 819–830, 2012.

GALLARDO, J. M.; ORTEA, I.; CARRERA, M. Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 135–141, 2013.

GAO, M. et al. Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid-liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food. **Food Chemistry**, v. 175, p. 181–188, 2015.

GAO, M. Z. et al. A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent. **Microchemical Journal**, v. 154, p. 104598, 2020.

GARAI, L. Improving HPLC Analysis of Vitamin A and E: Use of Statistical Experimental

Design. **Procedia Computer Science**, v. 108, n. June, p. 1500–1511, 2017.

GARRIDO-DELGADO, R.; EUGENIA MUÑOZ-PÉREZ, M.; ARCE, L. Detection of adulteration in extra virgin olive oils by using UV-IMS and chemometric analysis. **Food Control**, v. 85, p. 292–299, 2018.

GAŠIĆ, U. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**, v. 145, p. 599–607, 2014.

GASPARRINI, M. et al. Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 102, p. 1–10, 2017.

GASPARRINI, M. et al. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2 : Control of oxidative stress induced damage , increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, n. August, p. 578–587, 2018.

GEANA, E.-I.; CIUCURE, C. T. Establishing authenticity of honey via comprehensive Romanian honey analysis. **Food Chemistry**, v. 306, n. October 2019, p. 125595, 2019.

GERHARDT, N. et al. Volatile-Compound Fingerprinting by Headspace-Gas-Chromatography Ion-Mobility Spectrometry (HS-GC-IMS) as a Benchtop Alternative to <sup>1</sup>H NMR Profiling for Assessment of the Authenticity of Honey. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3, p. 1777–1785, 2018.

GIL, M.; WIANOWSKA, D. Chlorogenic acids – their properties , occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin-Polonica**, v. LXXII, n. Section AA, p. 61–104, 2017.

GIROLAMO, F. DI; D'AMATO, A.; RIGHETTI, P. G. Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 12, p. 3688–3693, jun. 2012.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1220–1234, 2006.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015.

GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M. et al. A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. **Food Chemistry**, v. 275, p. 703–710, 2019.

GOODBOURN, S.; DIDCOCK, L.; RANDALL, R. E. Interferons : cell signalling , immune modulation , antiviral responses and virus countermeasures. **Journal of General Virology**, n. 2000, p. 2341–2364, 2019.

GRANATO, D. et al. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v. 72, n. October 2017, p. 83–90, 2018.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, n. December 2016, p. 13–22, 2017.



GREEN, L. C. et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 138, p. 131–138, 1982.

GROSSO, C. et al. Box-Behnken factorial design to obtain a phenolic-rich extract from the aerial parts of *Chelidonium majus* L. **Talanta**, v. 130, p. 128–136, 2014.

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

GUIZELLINI, F. C. et al. PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprint investigation of reference and crossed coffees. **Food Research International**, v. 113, p. 9–17, 2018.

GUO, B. et al. Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 29, p. 4796–4807, 2010.

HADAGALI, M. D.; CHUA, L. S. The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 6, p. 1003–1014, 2014.

HALOUZKA, R.; TARKOWSKI, P.; ZELJKOVIĆ, S. Ć. Characterisation of phenolics and other quality parameters of different types of honey. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 34, n. No. 3, p. 244–253, 2016.

HAM, J. R. et al. Anti-steatotic and anti-inflammatory roles of syringic acid in high-fat diet-induced obese mice. **Food & function**, v. 7, p. 689–697, 2016.

HAROUN, M. I. et al. Phenolic acids and flavonoids profiles of some Turkish honeydew and floral honeys. **Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 39–45, 2012.

HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

HIJAZ, F.; LU, Z.; KILLINY, N. Effect of host-plant and infection with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” on honeydew chemical composition of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, n. 1, p. 34–43, 2016.

HILBIG, J. et al. Ultrasonic-assisted extraction combined with sample preparation and analysis using LC-ESI-MS/MS allowed the identification of 24 new phenolic compounds in pecan nut shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] extracts. **Food Research International**, v. 106, p. 549–557, 2018.

HUI, B. Y. et al. Poly(cyclodextrin-ionic liquid) based ferrofluid: A new class of magnetic colloid for dispersive liquid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from food samples prior to GC-FID analysis. **Food Chemistry**, v. 314, p. 126214, 2020.

HUSCHEK, G. et al. Quantification of allergenic plant traces in baked products by targeted proteomics using isotope marked peptides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, n. 1169, p. 286–293, 2016.

HUSCHEK, G. et al. Authentication of leguminous-based products by targeted biomarkers using high resolution time of flight mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. October 2017, p. 164–171, 2018.

HUSSEIN, S. Z. et al. Gelam Honey Inhibits the Production of Proinflammatory , Mediators NO , PGE 2 , TNF-  $\alpha$  , and IL-6 in Carrageenan-Induced Acute Paw Edema in Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–13, 2012.

IACOPETTI, I. et al. Hyaluronic acid, Manuka honey and Acemannan gel: Wound-specific applications for skin lesions. **Research in Veterinary Science**, v. 129, p. 82–89, 2020.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2017. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 1–9, 2019.

ICH, G. **Validation of analytical procedures: Text and methodology**, 2005.

INMETRO. (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, p. 20, 2011.

INTERNATIONAL HONEY COMMISSION. Harmonised Methods of the International Honey Commission. **Bee Product Science**, p. 1–63, 2009.

JAIN, A.; GUPTA, M.; VERMA, K. K. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 142, p. 60–72, 2015.

JÁNOŠKOVÁ, N.; VYVIURSKA, O.; ŠPÁNIK, I. Identification of volatile organic compounds in honeydew honeys using comprehensive gas chromatography. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 53, n. 4, p. 353–362, 2014.

JERKOVIC, I.; MARIJANOVIC, Z. Oak (*quercus frainetto ten.*) honeydew honey-Approach to screening of volatile organic composition and antioxidant capacity (DPPH and FRAP assay). **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3744–3756, 2010.

JIMIDAR, M.; BOURGUIGNON, B.; MASSART, D. L. Application of Derringer's desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 740, n. 1, p. 109–117, 1996.

JULL, A. B. et al. Honey as a topical treatment for wounds. **Cochrane Library**, n. 3, p. 1–133, 2015.

KAMEL, A. Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5926–5931, 2010.

KARABAGIAS, I. K. et al. Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. **Food Chemistry**, v. 165, p. 181–190, 2014.

KARABAGIAS, I. K. et al. Palynological, physico-chemical and bioactivity parameters determination, of a less common Greek honeydew honey: “dryomelo”. **Food Control**, v. 109, p. 106940, 2020.

KARABAGIAS, I. K.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. A decisive strategy for monofloral honey authentication using analysis of volatile compounds and pattern recognition techniques. **Microchemical Journal**, v. 152, n. September 2019, p. 104263, 2020.

KARUNAKARAN, T. et al. Nitric oxide inhibitory and anti-Bacillus activity of phenolic compounds and plant extracts from Mesua species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 231–234, 2018.

KASPRZYK, I. et al. FTIR-ATR spectroscopy of pollen and honey as a tool for unifloral honey authentication. The case study of rape honey. **Food Control**, v. 84, p. 33–40, 2018.

KASSIM, M. et al. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1196–1201, 2010a.

KASSIM, M. et al. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. **Nutrition Research**, v. 30, n. 9, p. 650–659, 2010b.

KHAJEVAND-KHAZAEI, M.-R. et al. Rutin, a quercetin glycoside, alleviates acute endotoxemic kidney injury in C57BL/6. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 307–312, 2018.

KHAJURIA, V. et al. Anti-inflammatory potential of hentriacontane in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 92, p. 175–186, 2017.

KHATTREE, R.; NAIK, D. N. Basic Concepts for Multivariate Statistics. In: **Multivariate Data Reduction and Discrimination with SAS Software order**. [s.l: s.n.]. p. 1–24.

KOLTSAKIDOU, A.; ZACHARIS, C. K.; FYTIANOS, K. A validated liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey after homogeneous liquid-liquid extraction using hydrophilic acetonitrile and sodium chloride as mass separating agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1377, p. 46–54, 2015.

KORTE, R.; BROCKMEYER, J. Novel mass spectrometry approaches in food proteomics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 96, p. 99–106, 2017.

KOTA, R. S. et al. Regulation of gene expression in RAW 264.7 macrophage cell line by interferon- $\gamma$ . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 1137–1146, 2006.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.

KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Principal components analysis: an innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food chemistry**, v. 177, p. 354–60, 2015.

LACHMAN, J. et al. Contents of major phenolic and flavonoid antioxidants in selected Czech honey. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 5, p. 412–426, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 228, n. October 17th, p. 227–231, 1970.

LAGHA, A. BEN; GRENIER, D. Tea polyphenols protect gingival keratinocytes against TNF- $\alpha$  -induced tight junction barrier dysfunction and attenuate the inflammatory response of monocytes / macrophages. **Cytokine**, v. 115, n. May 2018, p. 64–75, 2019.

LAGO, J. H. G. et al. Structure-Activity association of flavonoids in lung diseases. **Molecules**,

v. 19, n. 3, p. 3570–3595, 2014.

LATORRE, C. H. et al. A fast chemometric procedure based on NIR data for authentication of honey with protected geographical indication. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3559–3565, 2013.

LAUR, L. M.; TIAN, L. Provitamin A and vitamin C contents in selected California-grown cantaloupe and honeydew melons and imported melons. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 194–201, 2011.

LIMA, I. B. **Mimosa scabrella**. Disponível em: <<http://biogeo.inct.florabrasil.net/proj/38951?region=11>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

LIU, H. et al. Solid-phase extraction of flavonoids in honey samples using carbamate-embedded triacontyl-modified silica sorbent. **Food Chemistry**, v. 204, p. 56–61, 2016.

LÓPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495–506, 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LUKASIEWICZ, M.; KOWALSKI, S.; MAKAREWICZ, M. Antimicrobial and antioxidant activity of selected Polish herbhoney. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 547–553, 2015.

MACHADO, A. P. D. F. et al. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. **Food Chemistry**, v. 231, p. 1–10, 2017.

MAHNE OPATIĆ, A. et al. Determination of geographical origin of commercial tomato through analysis of stable isotopes, elemental composition and chemical markers. **Food Control**, v. 89, p. 133–141, 2018.

MAJTAN, J. et al. Honeydew honey as a potent antibacterial agent in eradication of multi-drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cancer patients. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 4, p. 584–587, 2011.

MAJTAN, J. et al. Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: A new action of honey in wound healing. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, n. 7, p. 619–627, 2013a.

MAJTAN, J. et al. Anti-biofilm Effects of Honey Against Wound Pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. v. 75, n. November 2012, p. 69–75, 2013b.

MAJTANOVA, N. et al. Complementary treatment of contact lens-induced corneal ulcer using honey: A case report. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 38, n. 1, p. 61–63, 2015.

MALGORZATA, D. et al. Physicochemical quality parameters, antibacterial properties and cellular antioxidant activity of Polish buckwheat honey. **Food Bioscience**, v. 34, p. 100538, 2020.

MANJI, J. et al. The association of *Leptospermum* honey with cytokine expression in the sinonasal epithelium of chronic rhinosinusitis patients. **World Journal of**

**Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 5, n. 1, p. 19–25, 2019.

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

MARENDA, T. A. et al. Desenvolvimento de um sistema para classificação do mel em floral e melato por parâmetros físico químicos combinados com redes neurais artificiais. **Evidência**, v. 11, n. 1, p. 61–74, 2011.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41–50, 2016.

MAYER, A. et al. Treatment of non-healing leg ulcers with honeydew honey. **Journal of Tissue Viability**, v. 23, n. 3, p. 94–97, 2014.

MAZUCHOWSKI, J. Z. et al. Atributos alternativos da bracatinga. In: **Bracatinga (Mimosa scabrella Bentham): Cultivo, manejo e usos da espécie**. 1ª ed. [s.l.] Epagri, 2014. p. 365p.

MENDES, C. DE G. et al. As Análises De Mel: Revisão. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 7–14, 2009.

MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 19–25, 2007.

MESAIK, M. A. et al. Characterization of Immunomodulatory Activities of Honey Glycoproteins and Glycopeptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 177–184, 2015.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. [s.l: s.n.].

MILES, E. A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P. C. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. **Clinical Nutrition**, p. 780–784, 2005.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Assessment of dispersive liquid-liquid microextraction conditions for gas chromatography time-of-flight mass spectrometry identification of organic compounds in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 26–36, 2014.

MONROY, Y. M. et al. Optimization of the extraction of phenolic compounds from purple corn cob (*Zea mays* L.) by sequential extraction using supercritical carbon dioxide, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 10–19, 2016.

MORAS, B. et al. Pressurized water extraction of isoflavones by experimental design from soybean flour and Soybean Protein Isolate. **Food Chemistry**, v. 214, p. 9–15, 2017.

MOREIRA, G. C.; DIAS, F. DE S. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 247–252, 2018.

MORELLI, L. L. L.; PRADO, M. A. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1144–1149, 2012.

- MORENO-VILET, L. et al. Size-exclusion chromatography (HPLC-SEC) technique optimization by simplex method to estimate molecular weight distribution of agave fructans. **Food Chemistry**, 2017.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- NABAVI, S. M. et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 38, p. 107316, 2020.
- NANO, R. M. W. et al. Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. **Talanta**, v. 80, p. 559–564, 2009.
- NASCIMENTO, K. S. DO et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, n. August 2017, p. 85–94, 2018.
- NAYIK, G. A.; NANDA, V. A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 504–513, 2016.
- NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 2017.
- NI, C. et al. Simple column-switching ion chromatography method for determining eight monosaccharides and oligosaccharides in honeydew and nectar. **Food Chemistry**, v. 194, p. 555–560, 2016.
- NOOH, H. Z.; NOUR-ELDIEN, N. M. The dual anti-inflammatory and antioxidant activities of natural honey promote cell proliferation and neural regeneration in a rat model of colitis. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 6, p. 588–595, 2016.
- NUNES, C. A. et al. The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. **Food Research International**, v. 75, p. 270–280, 2015.
- NUNES, D. B. Rotinas para a otimização experimental d e misturas. In: **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998**. [s.l: s.n.]. p. 163.
- OLIVEIRA, R. C. et al. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. **Chemosphere**, v. 163, p. 525–534, 2016.
- OROIAN, M.; ROPCIUC, S. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 138, p. 148–156, 2017.
- OROIAN, M.; ROPCIUC, S. Romanian honey authentication using voltammetric electronic tongue. Correlation of voltammetric data with physico-chemical parameters and phenolic compounds. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 157, p. 371–379, 2019.
- ORTEA, I.; O’CONNOR, G.; MAQUET, A. Review on proteomics for food authentication. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 212–225, 2016.

- ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOHAMMADI, A. A. Application of honey as a protective material in maintaining the viability of adipose stem cells in burn wound healing: A histological, molecular and biochemical study. **Tissue and Cell**, v. 61, p. 89–97, 2019.
- OSÉS, S. M. et al. Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 78, p. 29–33, 2016.
- OUCHEMOUKH, S. et al. Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, n. 2017, p. 460–469, 2017.
- PADILHA, C. V. DA S. et al. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106–115, 2017.
- PANDEY, R. P. et al. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 634–662, 2016.
- PASIAS, I. N.; KIRIAKOU, I. K.; PROESTOS, C. HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. **Food Chemistry**, v. 229, p. 425–431, 2017.
- PETROPOULOS, S. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Cichorium spinosum* L. leaves in relation to developmental stage. **Food Chemistry**, v. 239, p. 946–952, 2018.
- PIRES, T. C. S. P. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese apple variety (*Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe). **Food Chemistry**, v. 240, p. 701–706, 2018a.
- PIRES, T. C. S. P. et al. Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. **Food Research International**, v. 105, n. November 2017, p. 580–588, 2018b.
- PITA-CALVO, C.; VÁZQUEZ, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 59, p. 79–87, 2017.
- PRIMIERY, S. et al. Variability in symbiotic effectiveness of N<sub>2</sub> fixing bacteria in *Mimosa scabrella*. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 19–25, 2016.
- PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 893–902, 2009.
- QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.
- RACHED, W. et al. Phytochemical analysis and assessment of antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and cytotoxic properties of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. December 2017, p. 460–466, 2018.
- RAMANAUSKIENE, K. et al. The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1544–1548, 2012.
- REBOLLO-HERNANZ, M. et al. Phenolic compounds from coffee by-products modulate

adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, n. June, p. 110672, 2019.

REIS, A.; TRÊS, D. R.; SIMINSKI, A. **Restauração De Áreas Degradadas – Imitando a Natureza**. [s.l: s.n.].

REIS, C.; ANDRADE, J. DE. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel. **Quim. Nova**, v. 19, n. 3, p. 313–319, 1996.

REYES, A. W. B. et al. Effects of gallic acid on signaling kinases in murine macrophages and immune modulation against *Brucella abortus* 544 infection in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, n. April, p. 255–259, 2018.

RIBEIRO, F. A. DE L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de método na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

RICIPUTI, Y. et al. Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 269, p. 258–263, 2018.

RODRÍGUEZ, I. et al. Spanish avocado (*Persea americana* Mill.)honey: Authentication based on its composition criteria, mineral content and sensory attributes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, n. May, p. 561–572, 2019.

ROGNIAUX, H. et al. Allergen relative abundance in several wheat varieties as revealed via a targeted quantitative approach using MS. **Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 1736–1745, 2015.

ROTTA, E. M. et al. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, n. October 2018, p. 397–403, 2019.

SAIKI, P. et al. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264 .7 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 2–7, 2018.

SAJID, M. et al. Comparative study of physio-chemical analysis of fresh and branded honeys from Pakistan. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 173–176, 2020.

SAK-BOSNAR, M.; SAKAČ, N. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 827–831, 2012.

SALOMÉ, J. A. POLINIZAÇÃO DIRIGIDA EM POMARES DE MACIEIRAS (*Malus x domestica* Borkh) COM O USO DE COLMEIAS DE *Apis mellifera*. In: **Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014**. [s.l: s.n.]. p. 137.

SANTOS, K. C. B. DA S.; GONÇALVES, A. B.; CEREDA, M. P. Polens importantes na flora apícola em uma região de Cerrado em Campo Grande – MS. **Rev. Biol. Neotrop.**, v. 12, n. February, p. 81–85, 2015.

SATO, A. et al. Antiallergic activities of eleven onions (*Allium cepa*) were attributed to quercetin 4'-glucoside using QuEChERS method and Pearson's correlation coefficient. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 581–589, 2015.



SCHEFFE, H. The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 25, n. 2, p. 235–263, 1963.

SCHIEVANO, E. et al. NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity. **Food Chemistry**, p. 125788, 2019.

SCHMIDT, M. L.; SNOW, N. H. Making the case for QuEChERS-gas chromatography of drugs. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 49–56, 2016.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 76, p. 76–83, 2017.

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

SERAGLIO, S. K. T. et al. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of Mimosa scabrella Bentham honeydew honeys. **Food Research International**, v. 1, n. April, p. 670–678, 2017.

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

SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 145, p. 404–408, 2014.

SEZERINO, A. A.; ORTH, A. I. Limitações ao uso de Apis mellifera ( Hymenoptera : Apidae ) para a polinização dirigida de cultivares : um estudo de caso com a pereira-portuguesa ( Pyrus communis L . cv . Rocha ). v. 28, n. 2, p. 73–86, 2015.

SHEN, S. et al. Evaluation of cellular antioxidant components of honeys using UPLC-MS/MS and HPLC-FLD based on the quantitative composition-activity relationship. **Food Chemistry**, v. 293, p. 169–177, 2019.

SHI, H. et al. Isorhamnetin, the active constituent of a Chinese herb Hippophae rhamnoides L, is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking. **International Immunopharmacology**, v. 55, p. 216–222, 2018.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p. 21, 2011.

SILICI, S. Determination of volatile compounds of pine honeys. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 641–645, 2011.

SILICI, S.; SARIOGLU, K.; KARAMAN, K. Determination of Polyphenols of Some Turkish Honeydew and Nectar Honeys Using Hplc-Dad. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. July 2014, p. 2330–2341, 2013.

SILVA, B. et al. Improved strategy based on QuEChERS method followed by HPLC/DAD for the quantification of phenolic compounds from Mimosa scabrella Bentham honeydew honeys.

**LWT - Food Science and Technology**, v. 116, n. July, p. 108471, 2019a.

SILVA, B. et al. Simplex-centroid design and Derringer's desirability function approach for simultaneous separation of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys by HPLC/DAD. **Journal of Chromatography A**, v. 1585, p. 182–191, 2019b.

SILVA, C. L. et al. A fast method using a new hydrophilic-lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. **Talanta**, v. 86, n. 1, p. 82–90, 2011.

SILVA, C. L.; HAESSEN, N.; CÂMARA, J. S. A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra high pressure liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1260, n. 20 12, p. 154–163, 2012.

SILVA, L. C. R. et al. Evolução Estrutural De Bracatingais Da Região Metropolitana De Curitiba, Paraná, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 171–179, 2016a.

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

SIMOVA, S. et al. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1706–1710, 2012.

SIVAKUMAR, T. et al. Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 5, p. 1842–1848, 2007.

SKENDI, A.; IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 62–69, 2017.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. [s.l: s.n.].

SNYDER, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatography**, v. 92, p. 223–230, 1974.

SOBRAL, F. et al. Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in Northeast Portugal. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–12, 2017.

SOCHA, R. et al. Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 528–534, 2011.

SOMARRIBA, E.; KASS, D. Estimates of above-ground biomass and nutrient accumulation in *Mimosa scabrella* fallows in southern Brazil. **Agroforestry Systems**, v. 2, p. 77–84, 2001.

SONG, N. E. et al. Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 298, p. 125050, 2019.

STANEK, N. et al. Authentication of phacelia honeys (*Phacelia tanacetifolia*) based on a combination of HPLC and HPTLC analyses as well as spectrophotometric measurements. **Lwt**, v. 107, n. September 2018, p. 199–207, 2019.

SVOBODOVA, B. et al. Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. **Industrial Crops and Products**, v. 95,

p. 365–373, 2017.

TANLEQUE-ALBERTO, F.; JUAN-BORRÁS, M.; ESCRICHE, I. Antioxidant characteristics of honey from Mozambique based on specific flavonoids and phenolic acid compounds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 86, n. November 2019, p. 103377, 2020.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

TETTE, P. A. S. et al. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. **Food chemistry**, v. 211, p. 130–9, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TONKS, A. J. et al. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. November, p. 1147–1155, 2007.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. **Analyst**, v. 109, n. March, p. 263–266, 1984.

TSAI, S.; YIN, M. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of protocatechuic acid in brain of mice treated by D -galactose. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3198–3205, 2012.

VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 58–62, 2013.

VARELA-MARTÍNEZ, D. A. et al. Analysis of multiclass pesticides in dried fruits using QuEChERS-gas chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124961, 2019.

VASIĆ, V. et al. Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 274, n. August 2018, p. 629–641, 2019.

VIDOVA, V.; SPACIL, Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. **Analytica Chimica Acta**, v. 964, p. 7–23, 2017.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H. et al. The influence of electron beam radiation in the nutritional value, chemical composition and bioactivities of edible flowers of *Bauhinia variegata* L. var. *candida alba* Buch.-Ham from Brazil. **Food Chemistry**, v. 241, n. July 2017, p. 163–170, 2018.

VLCEKOVA, P. et al. Alternative treatment of gluteofemoral fistulas using honey: A case report. **International Wound Journal**, v. 9, n. 1, p. 100–103, 2012.

WANG, J. et al. Rapid Determination of the Geographical Origin of Honey Based on Protein Fingerprinting and Barcoding Using MALDI TOF MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10081–10088, nov. 2009.

WANG, J. et al. Isolation and bioactive evaluation of flavonoid glycosides from *Lobelia chinensis* Lour using two-dimensional liquid chromatography combined with label-free cell phenotypic assays. **Journal of Chromatography A**, 2019a.

- WANG, Q. et al. Development and characterization of a new non-aqueous self-double-emulsifying drug delivery system for topical application of rutin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2019b.
- WANG, Q. et al. Identification of acacia honey treated with macroporous adsorption resins using HPLC-ECD and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 30, p. 125656, 2020a.
- WANG, Q. et al. Method for identifying acacia honey adulterated by resin absorption: HPLC-ECD coupled with chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, p. 108863, 2020b.
- WANG, W. et al. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. **Food chemistry**, v. 171, p. 40–9, 2015.
- WANG, Y. et al. Identification of phenolic compounds from a unique citrus species, finger lime (*Citrus australasica*) and their inhibition of LPS-induced NO-releasing in BV-2 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, n. April, p. 54–63, 2019c.
- WIEST, L. et al. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 34, p. 5743–5756, 2011.
- WOLFF, V. R. DOS S.; WITTER, S.; LISBOA, B. B. Reporte de *Stigmatococcus paranaensis* Foldi (Hemiptera, Stigmatococcidae), insecto escama asociado con la producción de miel de mielato en Rio Grande do Sul, Brasil Vera. **Insecta Mundi**, v. 0434, p. 1–7, 2015.
- WON, S. R. et al. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 952–956, 2008.
- XIAO, R.; LI, L.; MA, Y. A label-free proteomic approach differentiates between conventional and organic rice. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 80, n. March, p. 51–61, 2019.
- XING, Y. et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 21 mycotoxins in *Radix Paeoniae Alba* by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. **Journal of Chromatography B**, v. 1031, p. 202–213, 2016.
- XU, X. et al. Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 276, p. 419–426, 2019.
- YEO, J. D.; SHAHIDI, F. Effect of hydrothermal processing on changes of insoluble-bound phenolics of lentils. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 716–722, 2017.
- YU, P.; LOW, M. Y.; ZHOU, W. Design of experiments and regression modelling in food flavour and sensory analysis: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 202–215, 2018.
- ZELENÍKOVÁ, R.; VYHLÍDALOVÁ, D. Applying honey dressings to non-healing wounds in elderly persons receiving home care. **Journal of Tissue Viability**, v. 28, p. 139–143, 2019.
- ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 2016.

ZHANG, Y. Z. et al. Discrimination of the entomological origin of honey according to the secretions of the bee (*Apis cerana* or *Apis mellifera*). **Food Research International**, v. 116, n. 866, p. 362–369, 2019.

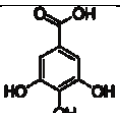
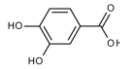
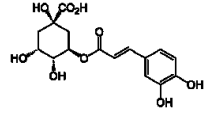
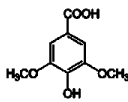

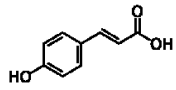
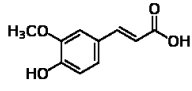
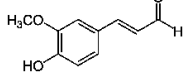



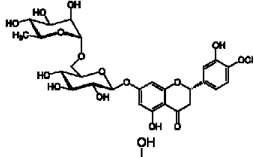
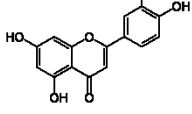
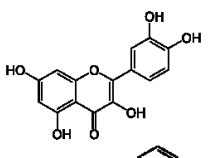
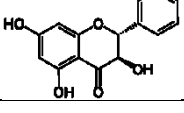
ZHENG, Y. et al. Fish & Shell fish Immunology Dietary supplementation with rutin has pro-/anti-inflammatory effects in the liver of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 64, p. 49–55, 2017.

ZHU, Z. et al. Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction coupled with high performance liquid chromatography-electrochemical detection for the determination of 17 phenolic compounds in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1601, p. 104–114, 2019.

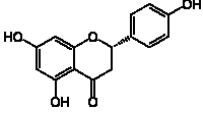
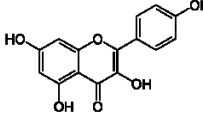
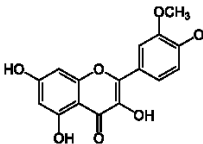
ZOCOLO, G. J. Princípios e aplicações da cromatografia líquida. **Conselho Regional de Química**, p. 1–106, 2012.

ZUCCATO, V. et al. Entomological authentication of stingless bee honey by <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics approach. **Food Control**, v. 82, p. 145–153, 2017.

**APÊNDICE A** – Nomes, estruturas, classes químicas e pKa dos compostos fenólicos encontrados em mel de melato de bracatinga (continua).

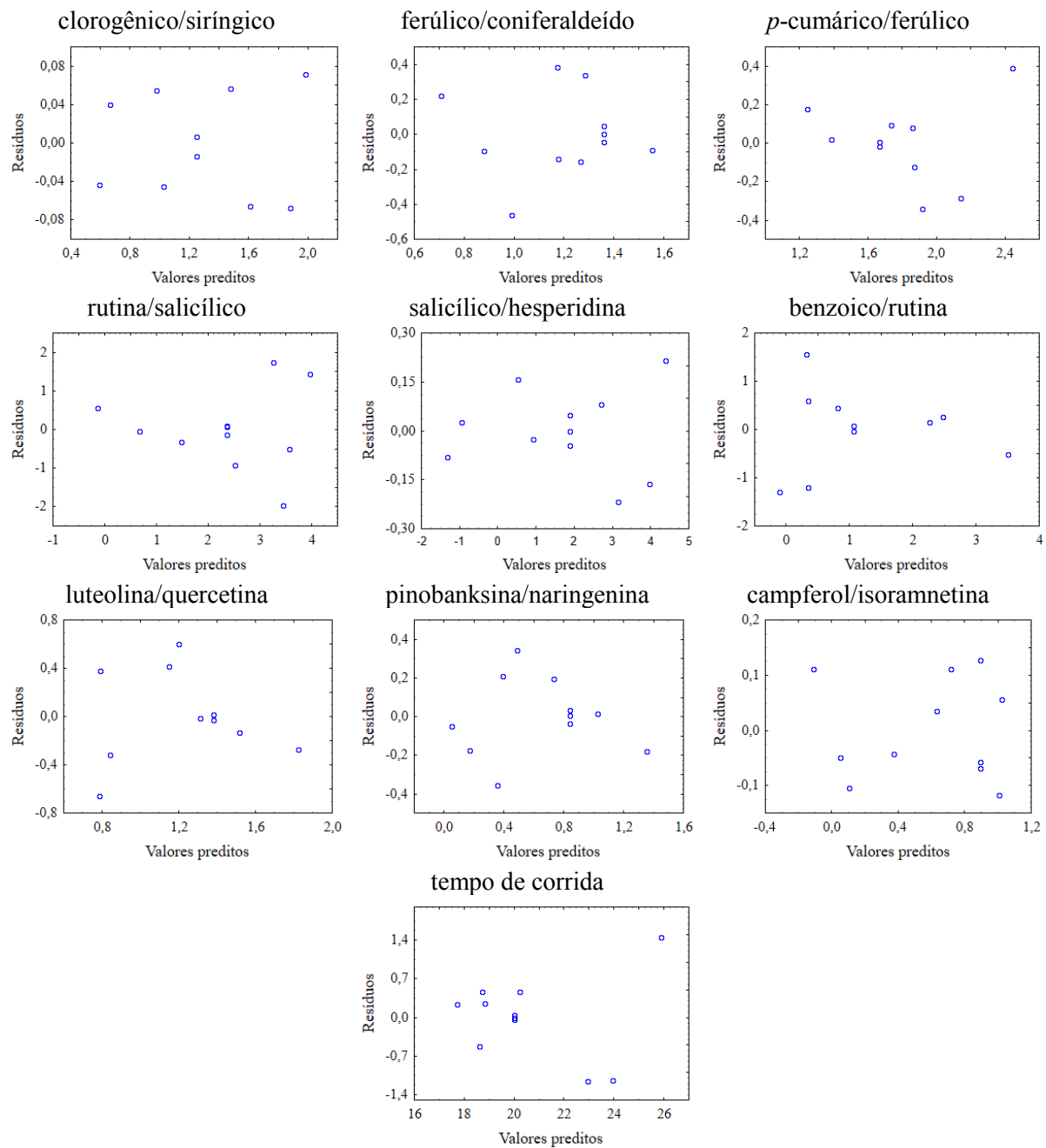
Composto	Estrutura	Classe	pKa
Ácido gálico		Ácido hidroxibenzóico	4,5
Ácido 3,4 dihidroxibenzóico		Ácido hidroxibenzóico	4,5
Ácido clorogênico		Ácido hidroxicinâmico	3,3
Ácido siríngico		Ácido hidroxibenzóico	4,3
Ácido cafeico		Ácido hidroxicinâmico	4,4
Ácido <i>p</i> -cumárico		Ácido hidroxicinâmico	4,1
Ácido ferúlico		Ácido hidroxicinâmico	4,0
Coniferaldeído		Aldeído fenólico	9,5
Ácido benzoico		Ácido hidroxibenzóico	4,2
Rutina		Flavonol	7
Ácido salicílico		Ácido hidroxibenzóico	3,0
Hesperidina		Flavanona	9,8
Luteolina		Flavona	6,9
Quercetina		Flavonol	7,1
Pinobanksina		Flavanona	7,8

**APÊNDICE A** – Nomes, estruturas, classes químicas e pKa dos compostos fenólicos encontrados em mel de melato de bracatinga (conclusão).

<b>Composto</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Classe</b>	<b>pKa</b>
Naringenina		Flavanona	7,9
Campferol		Flavonol	6,4
Isoramnetina		Flavonol	6,4

Fonte: Cai et al. (2017) e Fontana; Bottini (2014).

**APÊNDICE B** - Gráficos dos resíduos das respostas do delineamento composto central rotacional.



Fonte: o próprio autor (2019).

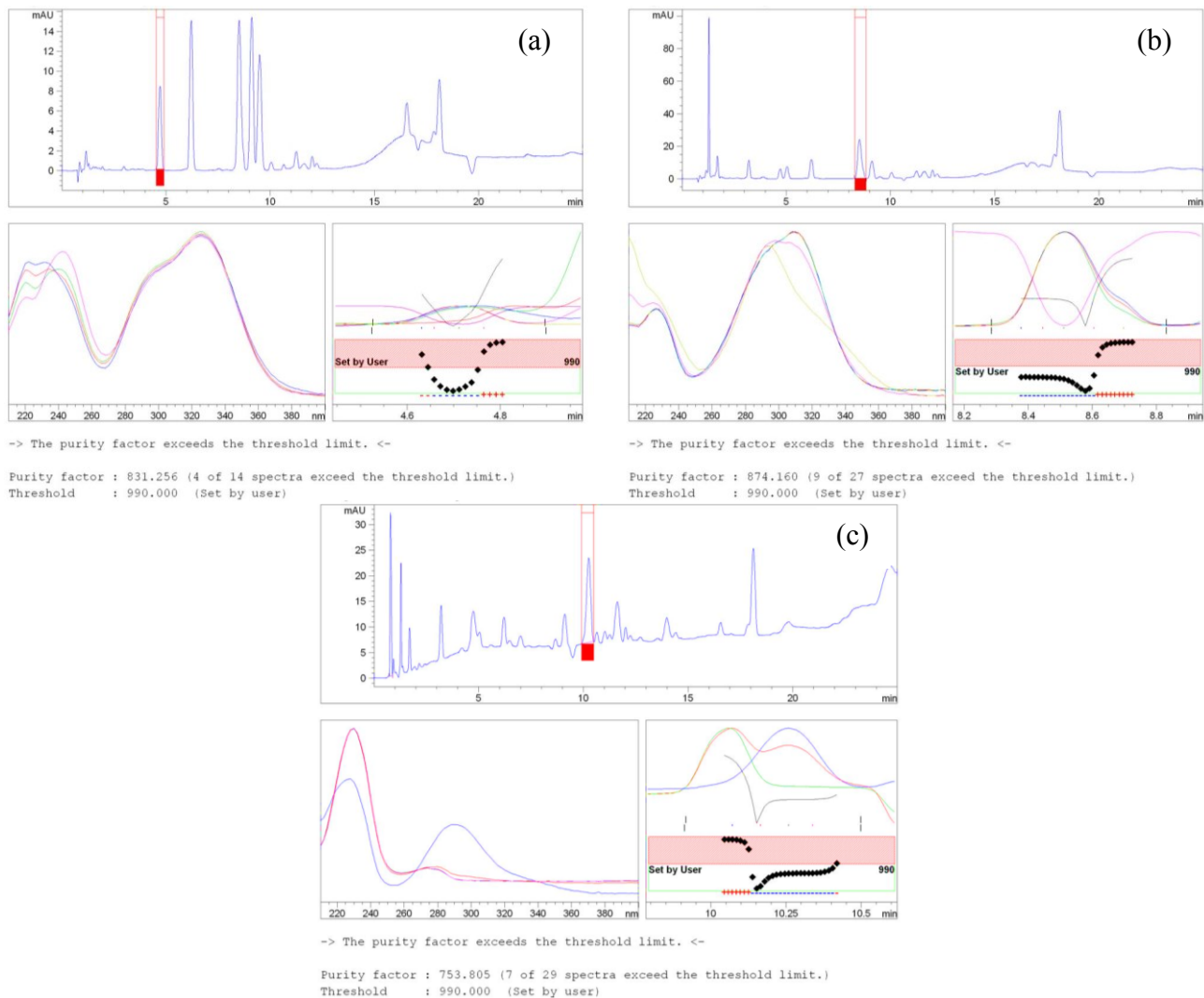


**APÊNDICE C** – Parâmetros cromatográficos do método de separação de compostos fenólicos.

<b>Compostos</b>	<b>Fator de retenção (k)</b>	<b>Fator de separação (<math>\alpha</math>)</b>	<b>Resolução</b>
Ácido gálico	1,15	2,72	8,36
Ácido 3,4 dihidroxibenzóico	3,13	1,82	9,50
Ácido clorogênico	5,71	1,10	1,97
Ácido siríngico	6,30	1,11	2,07
Ácido cafeico	7,00	1,38	6,64
Ácido <i>p</i> -cumárico	9,69	1,08	1,89
Ácido ferúlico	10,49	1,05	1,43
Coniferaldeído	11,04	1,07	1,77
Ácido benzoico	11,80	1,03	1,17
Rutina	12,20	1,10	3,08
Ácido salicílico	13,40	1,04	1,36
Hesperidina	13,94	1,41	18,77
Luteolina	19,72	1,03	1,90
Quercetina	20,37	1,05	2,58
Pinobanksina	21,33	1,02	0,80
Naringenina	21,66	1,09	4,16
Campferol + isoramnetina	23,55	-	-

Fonte: o próprio autor (2019).

**APÊNDICE D** – Verificação da pureza espectral dos picos dos ácidos (a) clorogênico (DAD 325 nm), (a) *p*-cumárico (DAD 300 nm) e (a) benzóico (DAD 240 nm) em amostra de mel de melato de bracatinga.



Fonte: o próprio autor (2019).

**APÊNDICE E** - Resultados de normalidade, homocedasticidade e independência dos dados para a curva de calibração da solução padrão dos analitos.

Compostos	Normalidade		Homocedasticidade		Independência	
	D	D <sub>n</sub>	C calc.	C tab.	DW calc.	Interpretação
Ácido gálico	0,1813	0,2872	0,5504	0,6644	1,3286	Independência
Ácido 3,4 dihidroxibenzóico	0,1183	0,2693	0,5870	0,6152	1,0890	Inconclusivo
Ácido clorogênico	0,1654	0,2872	0,6513	0,6644	1,3432	Independência
Ácido siríngico	0,1128	0,2693	0,5970	0,6152	1,5978	Independência
Ácido cafeico	0,1629	0,2872	0,6302	0,6644	1,4437	Independência
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,1796	0,3094	0,6292	0,7218	1,0529	Inconclusivo
Ácido ferúlico	0,1259	0,2693	0,5469	0,6152	1,7767	Independência
Coniferaldeído	0,1122	0,2693	0,5256	0,6152	1,9638	Independência
Ácido benzóico	0,1438	0,2872	0,4221	0,6644	0,5194	Dependência
Rutina	0,1438	0,2693	0,5605	0,6152	0,8691	Dependência
Ácido salicílico	0,1522	0,2872	0,3024	0,6644	0,6174	Dependência
Hesperidina	0,1699	0,3094	0,4007	0,7218	0,5746	Dependência
Luteolina	0,1701	0,2872	0,5734	0,6644	1,0716	Inconclusivo
Quercetina	0,1292	0,3094	0,5865	0,7218	2,2717	Independência
Pinobanksina	0,1799	0,2872	0,6085	0,6644	0,7802	Dependência
Naringenina	0,1092	0,2693	0,5792	0,6152	1,2882	Independência
Campferol + isoramnetina	0,1577	0,3094	0,6731	0,7218	1,3654	Independência

D, valor obtido pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; D<sub>n</sub>, valor crítico para o teste de Kolmogorov-Smirnov baseado no número de pontos da curva de calibração.

C calculado, valor obtido pelo teste de Cochran; C tabelado, valor crítico para o teste de Cochran baseado no número de pontos da curva de calibração.

DW, valor obtido pelo teste de Durbin-Watson.

Fonte: o próprio autor (2019).

**APÊNDICE F** - Proteínas totais em amostras de mel determinados pelo método de Lowry.

Amostra	Proteínas (mg g <sup>-1</sup> )	Desvio padrão
MMBp 1	0,284	0,005
MMBp 2	0,286	0,015
MMBp 3	0,277	0,008
MMBp 4	0,250	0,008
MMBp 5	0,220	0,007
MMBp 6	0,263	0,019
MMBc 7	0,258	0,016
MMBc 8	0,274	0,011
MMBc 9	0,279	0,007
MMBc 10	0,273	0,006
MMBc 11	0,292	0,017
MMBc 12	0,249	0,014
MF 13	0,160	0,012
MF 14	0,180	0,011
MF 15	0,131	0,002
MF 16	0,161	0,009
MF 17	0,410	0,022
MF 18	0,228	0,020

MMBp, mel de melato de bracatinga puro; MMBc, mel de melato de bracatinga comercial; MF, mel floral.

Fonte: o próprio autor (2019).

**APÊNDICE G** - Resultados *BLAST* e alinhamento para os peptídeos EALPHVPIFDR, TFWTIER e QNIDVVAR, candidatos a marcadores de quantificação das proteínas MRJP 1, 3 e 4, respectivamente, sendo específicos e presentes apenas nestas proteínas (acesso em: 24-07-2019) (continua).

## Alignments

Alignment overview	Info	Status
Query: B201907246746803381A1F0E0DB47453E0216320D08AD7BY <input checked="" type="checkbox"/> MRJP1_APIME - Major royal jelly protein 1 - Apis mellifera ... - View alignment	E-value: 3.6e-5 Score: 103 Ident.: 100.0%	
<input checked="" type="checkbox"/> Q5VLE2_APICC - Major royal jelly protein MRJP1 - Apis cerana cera... - View alignment	E-value: 3.6e-5 Score: 103 Ident.: 100.0%	
<input checked="" type="checkbox"/> Q8MMJ1_APICE - Major royal jelly protein 1 - Apis cerana (Ind... - View alignment	E-value: 3.6e-5 Score: 103 Ident.: 100.0%	
<input checked="" type="checkbox"/> A0A2A3EFY1_APICC - Major royal jelly protein - Apis cerana cera... - View alignment	E-value: 3.8e-5 Score: 103 Ident.: 100.0%	
<input checked="" type="checkbox"/> A0A3D1D0A8_9BACT - Hybrid sensor histidine kinase/resp... - Prevotella sp. - View alignment	E-value: 2.9e-1 Score: 77 Ident.: 84.6%	
<input checked="" type="checkbox"/> A0A1671ZY3_9HYPO - Uncharacterized protein - Metarhizium rle... - View alignment	E-value: 1.7e0 Score: 72 Ident.: 100.0%	
<input type="checkbox"/> A0A139KK3_BACT4 - ATPase/histidine kinase/DNA gyrase ... - Bacteroides thet... - View alignment	E-value: 4.7e0 Score: 69 Ident.: 83.3%	
<input type="checkbox"/> A0A372UQN0_9BACE - Response regulator - Bacteroides sp. ... - View alignment	E-value: 4.7e0 Score: 69 Ident.: 83.3%	

```

t[Q5VLE2]Q5VLE2_APICC/1-433      1 MTRWLFMVVCLGIVCQGTSSILRGESLNKLSVLHEWKFDDYDFDSDERRQDAIILSGEYDYRKNYPSDVDQHWG 75
t[Q8MMJ1]Q8MMJ1_APICE/1-433      1 MTRWLFMVVCLGIVCQGTSSILRGESLNKLSVLHEWKFDDYDFDSDERRQDAIILSGEYDYRKNYPSDVDQHWG 75
sp[O1833Q]MRJP1_APIME/1-432      1 MTRLFMLVCLGIVCQGTSSILRGESLNKSLPLHEWKFDDYDFDSDERRQDAIILSGEYDYRKNYPSIDQWHDK 75
t[A0A2A3EFY1]A0A2A3EFY1_APICC/1-96 1 MNAVSRITVAQSDDELQMI VGMKIK EALPHVP I FDRY I NREY I LVL SNRMOKMANNNDYFNDFNFR I MDANVNDL I 75
t[A0A3D1D0A8]A0A3D1D0A8_9BACT/1-1139 1 KKGDAESLP SDNVRE I VCDQAGNVVWGTNDGLA I FNPLSRKFHK I ESPLLGDNI YSLSATADGR I LAACNLGDI S 75
t[A0A1671ZY3]A0A1671ZY3_9HYPO/1-955 1 MPPRSLPHVP I FDRP TTRNVS LHATGA I VGHNVEAKSLANS SLTAEQGKVRTNNV VAPQTN POGHTMSNGQRCRA 75

t[Q5VLE2]Q5VLE2_APICC/1-433      76 K I FVTMLRYNGVPS S LNV I S K K I G D G P L L Q P Y P D W S F A K Y D D C S G I V S A T K L A I D K C D R L W L W D S G L V N N T Q P M 150
t[Q8MMJ1]Q8MMJ1_APICE/1-433      76 K I FVTMLRYNGVPS S LNV I S K K I G D G P L L Q P Y P D W S F A K Y D D C S G I V S A T K L A I D K C D R L W L W D S G L V N N T Q P M 150
sp[O1833Q]MRJP1_APIME/1-432      76 I FVTMLRYNGVPS S LNV I S K K V G D G P L L Q P Y P D W S F A K Y D D C S G I V S A S K L A I D K C D R L W L W D S G L V N N T Q P M C 150
t[A0A2A3EFY1]A0A2A3EFY1_APICC/1-96 76 L N T R C E N P N D N T P F K I S I H L
t[A0A3D1D0A8]A0A3D1D0A8_9BACT/1-1139 76 V I D T H D A E H G N L A P T S I S K L E I G N A A C N A A R T V L K D A Y G N V M I G S Y G T G I T F V N Q R P T A F D V L P A I I D G K G N T S R 150
t[A0A1671ZY3]A0A1671ZY3_9HYPO/1-955 76 R P G G T K S I S H S N A R N S T R K V L G H M S S Q L F E K V L G E Q Q V A D P W K R V A K L R T R L P I L L Q E I I R Q E E D R S A D G S 150

t[Q5VLE2]Q5VLE2_APICC/1-433      151 C S P K L L T F D L T T S Q L L K Q V E I P H D V A V N A T T G K G R L S S L A V Q P L D C N I N G D T M V Y I A D E K G E G L I V Y H D S D S F S H 225
t[Q8MMJ1]Q8MMJ1_APICE/1-433      151 C S P K L L T F D L T T S Q L L K Q V E I P H D V A V N A T T G K G R L S S L A V Q P L D C N I N G D T M V Y I A D E K G E G L I V Y H D S D S F S H 225
sp[O1833Q]MRJP1_APIME/1-432      151 S P K L L T F D L T T S Q L L K Q V E I P H D V A V N A T T G K G R L S S L A V Q S L D C N T N S D T M V Y I A D E K G E G L I V Y H N S D S F H R 225
t[A0A2A3EFY1]A0A2A3EFY1_APICC/1-96 151 V Y G I T A C Q N G L W L G S D N G L S L Y R D S K V V G H W Q F A N V L H R A S A F V Y V M H E D H E G N V M I G L D D E G V I V F D S H K Q S F 225
t[A0A3D1D0A8]A0A3D1D0A8_9BACT/1-1139 151 G L R E L L P T P E E N K C M L K H A A L A G H S Q R A I E R Y I Y I L R G R N D D A R C K R Y L E I P T S V P L F I F H Y L I R Q S S G I S D A V T 225
t[A0A1671ZY3]A0A1671ZY3_9HYPO/1-955

t[Q5VLE2]Q5VLE2_APICC/1-433      226 R L T S K T F D Y D P K F T K M T I N G E S F T T Q N G I S G M A L S P M T N N L Y S P V A S T S L Y V N T E Q F R T S N Y E Q N A V H Y E G V Q 300
t[Q8MMJ1]Q8MMJ1_APICE/1-433      226 R L T S K T F D Y D P K F T K M T I N G E S F T T Q S G I S G M A L S P M T N N L Y S P V A S T S L Y V N T E Q F R T S N Y E Q N A V H Y E G V Q 300
sp[O1833Q]MRJP1_APIME/1-432      226 L T S N T F D Y D P K F T K M T I D G E S Y T A Q D G I S G M A L S P M T N N L Y S P V A S T S L Y V N T E Q F R T S D Y Q N D I H Y E G V Q N 300
t[A0A2A3EFY1]A0A2A3EFY1_APICC/1-96 226 R R I D I P A R K L D I H A F M E M P G G G M M I G S E Y G A L Y K D G K V S F L R H L T A Q L A S P T I Y G L V T D H L G R L W I G T D G G V T 300
t[A0A3D1D0A8]A0A3D1D0A8_9BACT/1-1139 226 L Q R M I D S S R L Y Y D T S S M P K S N H P E T K V G A E K G L H I D R Q N F N S M R L L A H Q C C R L E P R F V V D H L A G L A S Q Y I Q S M S V 300
t[A0A1671ZY3]A0A1671ZY3_9HYPO/1-955

t[Q5VLE2]Q5VLE2_APICC/1-433      301 N I L D T Q S S A K V V S K S G V L F F G L V G D S A L G C W N E H R S L E R H N I R T V A Q S D E T L Q M I V G M K I K E A L P H V P I F D R Y I N 375
t[Q8MMJ1]Q8MMJ1_APICE/1-433      301 N I L D T Q S S A K V V S K S G V L F F G L V G D S A L G C W N E H R S L E R H N I R T V A Q S D E T L Q M I V G M K I K E A L P H V P I F D R Y I N 375
sp[O1833Q]MRJP1_APIME/1-432      301 I L D T Q S S A K V V S K S G V L F F G L V G D S A L G C W N E H R T L E R H N I R T V A Q S D E T L Q M I A S M K I K E A L P H V P I F D R Y I N R 375
t[A0A2A3EFY1]A0A2A3EFY1_APICC/1-96 301 I L T K T G K R V A V L K E G K G L P S S R V S Q L F M A K D K S V W I A T D K G V C H V P D V A K P H D I E F F G N A Q G L T D S Y V M A V T Q D I 375
t[A0A3D1D0A8]A0A3D1D0A8_9BACT/1-1139 301 S A K N G G K N Y I A Q C D L F N A C L Q T F R P E P N V Q V A Q R A M P N A Y F W E A Q R I L L S M S A G L E K P L L I S R G G F R A I R E V L S G 375
t[A0A1671ZY3]A0A1671ZY3_9HYPO/1-955

t[Q5VLE2]Q5VLE2_APICC/1-433      376 R E Y I L V L S N R M O K M A N N D Y F N D V N F R I M D A N V N D L I L N T R C E N P N N D N T P F K I S I H L 433
t[Q8MMJ1]Q8MMJ1_APICE/1-433      376 R E Y I L V L S N R M O K M A N N D Y F N D V N F R I M D A N V N D L I L N T R C E N P N N D N T P F K I S I H L 433
sp[O1833Q]MRJP1_APIME/1-432      376 E Y I L V L S N K M Q K M V N D F N D D V N F R I M N A N V N E L I L N T R C E N P N D R T P F K I S I H L 432
t[A0A2A3EFY1]A0A2A3EFY1_APICC/1-96 376 Y Q Q I W V S T F T N I A C L D M A S R T F A V Y D F N V G V T A C G F V E G S A A L T T D G Y Y V F G S P K G V C S V N A Q Y L R M O R R A S R Y V 450
t[A0A3D1D0A8]A0A3D1D0A8_9BACT/1-1139 376 Q S K N H A E L Y S A A R H A P T W P P Y L Q P G H G M D E R T E P E D N W S R A I S A G M L M Q E A G F A K D D A D H A M D I L Q G M T Q D G P T 450
t[A0A1671ZY3]A0A1671ZY3_9HYPO/1-955

```

**APÊNDICE G** – Resultados *BLAST* e alinhamento para os peptídeos EALPHVPIFDR, TFVTIER e QNIDVVAR, candidatos a marcadores de quantificação das proteínas MRJP 1, 3 e 4, respectivamente, sendo específicos e presentes apenas nestas proteínas (acesso em: 24-07-2019) (continua).

**Alignments**

BLAST Align Download Add to basket Columns 1 to 3 of 3 Show 25

Alignment overview	Info	Status
Query: B20190725216DA2B77BFBD2E6699CA9B6D1C41EB207147AJ MRJP3_APIME - Major royal jelly protein 3 - Apis mellifera ... - View alignment	E-value: 2.1e0 Score: 69 Ident.: 100.0%	
Q3L632_APICA - Major royal jelly protein 3 - Apis mellifera c... - View alignment	E-value: 2.1e0 Score: 69 Ident.: 100.0%	
D3Y5T0_APIME - Major royal jelly protein - Apis mellifera ... - View alignment	E-value: 2.1e0 Score: 69 Ident.: 100.0%	

1 to 3 of 3 Show 25

```

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579      1 MTKWLLLVVCLGIACQDVTSAAVNHQRKSANNLAHSMKV IYEWKH I DDFDGS DERRDAAIKS 62
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    1 MTKWLLLVVCLGIACQDVTSAAVNHQRKSANNLAHSMKV IYEWKH I DDFDGS DERRDAAIKS 62
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544      1 MTKWLLLVVCLGIACQDVTSAAVNHQRKSANNLAHSMKV IYEWKH I DDFDGS DERRDAAIKS 62

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    63 GEFDHTKNYPFDVDRWRD KTFVT IERNNGVPS LNVVTNKKGKGGP LLRYPDWSFAKYEDC 124
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    63 GEFDHTKNYPFDVDRWRD KTFVT IERNNGVPS LNVVTNKKGKGGP LLRYPDWSFAKYEDC 124
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    63 GEFDHTKNYPFDVDRWRD KTFVT IERNNGVPS LNVVTNKKGKGGP LLRYPDWSFAKYEDC 124

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    125 SGIVSAFK IAVDKFDRLWVLD SGLVNNQPMCS PKLLT FDLKT SKLVKQVE I PHN I AVNATT 186
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    125 SGIVSAFK IAVDKFDRLWVLD SGLVNNQPMCS PKLLT FDLKT SKLVKQVE I PHN I AVNATT 186
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    125 SGIVSAFK IAVDKFDRLWVLD SGLVNNQPMCS PKLLT FDLKT SKLVKQVE I PHN I AVNATT 186

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    187 GMGELVSLAVQA IDRTNTMVY I ADEKGEGL IMYQNSD DSFHRLT SNTFDYDPRYTKLTVAGE 248
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    187 GMGELVSLAVQA IDRTNTMVY I ADEKGEGL IMYQNSD DSFHRLT SNTFDYDPRYTKLTVAGE 248
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    187 GMGELVSLAVQA IDRTNTMVY I ADEKGEGL IMYQNSD DSFHRLT SNTFDYDPRYTKLTVAGE 248

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    249 SFTVKNG ICGIALSPVTNNLYSPL SHGLYYVDTEQFRD PQYEENN VQYEGSQD I LNTQSF 310
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    249 SFTVKNG ICGIALSPVTNNLYSPL SHGLYYVDTEQFRN PQYEENN VQYEGSQD I LNTQSF 310
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    249 SFTVKNG IYGIALSPVTNNLYSPL LSHGLYYVDTEQF SNPQYEENN VQYEGSQD I LNTQSF 310

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    311 GKVVSKNGVLF LGLVGN SGIACVNEHQV LQRESFDVVAQNEET LQMI VSMK IMENLPQSGR I 372
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    311 GKVVSKNGVLF LGLVGN SGIACVNEHQV LQRESFDVVAQNEET LQMI VSMK IMENLPQSGR I 372
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    311 GKVVSKNGVLF LGLVGN SGIACVNEHQV LQRESFDVVAQNEET LQMI VSMK IMENLPQSGR I 372

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    373 NDPEGNEYMLALS NRMQK I INDNFNFDVNFRI LGANVDD LMRNTRCGRYHNQNA GNQNA GN 434
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    373 NDPEGNEYMLALS NRMQK I INDNFNFDVNFRI LGANVDD LMRNTRCGRYHNQNA GNQNA GN 434
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    373 NDPEGNEYMLALS NRMQK I INDNFNFDVNFRI LGANVDD LMRNTRCGRYHNQNA GNQNA GN 434

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    435 QNADNQNDNQANNQNDNQAN KQNGNRQNDNRQND NKQNGNRQND NKQNGNRQND NKQNGNRQND 496
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    435 QNADNQNDNQANNQNDNQAN KQNGNRQNDNRQND NKQNGNRQND NKQNGNRQND NKQNGNRQND 496
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    435 QNADNQNDNQANNQNDNQAN KQNGNRQNDNRQND NKQNGNRQND NKQNGNRQND NKQNGNRQND 496

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    497 GNRQNDNKQNGNRQNDNK QNGNRQNGNK QNDNKQND NRQNDNKQNGNRQNDNK RQNGNRQNDN 558
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544    497 GNKQNDNKQNGNRQNDNKRNGNRQNDNQNNQNDNRRNDNQVHSSK L H 544
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544    497 GNKQNDNKQNGNRQNDNKRNGNRQNDNQNNQNDNRRNDNQVHSSK L H 544

tr|Q3L632|Q3L632_APICA/1-579    559 QNNQNDNRRNDNQVHSSK L H 579
tr|D3Y5T0|D3Y5T0_APIME/1-544
sp|Q17060|MRJP3_APIME/1-544
    
```

**APÊNDICE G** – Resultados *BLAST* e alinhamento para os peptídeos EALPHVPIFDR, TFVTIER e QNIDVVAR, candidatos a marcadores de quantificação das proteínas MRJP 1, 3 e 4, respectivamente, sendo específicos e presentes apenas nestas proteínas (acesso em: 24-07-2019) (conclusão).

## Alignments

Alignment overview	Info	Status
Query: B201907246746803381A1F0E0DB47453E0216320D08AC53N		
MRJP4_APIME - Major royal jelly protein 4 - Apis mellifera ... - View alignment	E-value: 2.3e-1 Score: 76 Ident.: 100.0%	
AOA088AU20_APIME - Major royal jelly protein 4 - Apis mellifera ... - View alignment	E-value: 2.3e-1 Score: 76 Ident.: 100.0%	
D3JXA7_APIME - Major royal jelly protein 4 - Apis mellifera ... - View alignment	E-value: 2.3e-1 Score: 76 Ident.: 100.0%	
A0A2A3EG07_APICC - Major royal jelly protein - Apis cerana cera... - View alignment	E-value: 1.3e0 Score: 71 Ident.: 90.0%	
A0A2R4SV22_APICE - Major royal jelly protein 4 - Apis cerana (Ind... - View alignment	E-value: 1.3e0 Score: 71 Ident.: 90.0%	
Q6QNI6_APICE - Major royal jelly protein 4 - Apis cerana (Ind... - View alignment	E-value: 1.3e0 Score: 71 Ident.: 90.0%	

1 to 6 of 6 Show 25

t A0A088AU20 A0A088AU20_APIME/1-464	1	MTKWL LLMVCLGIACQNI RGGVYRENSSGK NLTNTLNV I HKWKYLDYDFD NDERRQAAIQSGEYDRTKKNYPLD	73
t D3JXA7 D3JXA7_APIME/1-464	1	MTKWL LLMVCLGIACQNI RGGVYRENSSGK NLTNTLNV I HEWKYLDYDFD NDERRQAAIQSGEYDRTKKNYPLD	73
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	1	MTKWL LLMVCLGIACQNI RGGVYRENSSGK NLTNTLNV I HKWKYLDYDFD NDERRQAAIQSGEYDRTKKNYPLD	73
t A0A2A3EG07 A0A2A3EG07_APICC/1-485	1	MTKWL LLMVCLGIACQNI RGA VYRENSSRK NLTNTLNV I HEWKYVDYDFG SDEKRQAAIQSGEYDRTKKNYPLD	73
t A0A2R4SV22 A0A2R4SV22_APICE/1-485	1	MTKWL LLMVCLGIACQNI RGA VYRENSSRK NLTNTLNV I HEWKYVDYDFG SDEKRQAAIQSGEYDRTKKNYPLD	73
t Q6QNI6 Q6QNI6_APICE/1-485	1	MTKWL LLMVCLGIACQNI RGA VYRENSSRK NLTNTLNV I HEWKYVDYDFG SDEKRQAAIQSGEYDRTKKNYPLD	73
t A0A088AU20 A0A088AU20_APIME/1-464	74	VDQWHNKTFLAVIRYNGVPS S LNVVSDKTGN GGRLLQPYPDW SFAKYEDCSGIVSAHKIAID EYERLWLVDSG	146
t D3JXA7 D3JXA7_APIME/1-464	74	VDQWHNKTFLAVIRYNGVPS S LNVVSDKTGN GGRLLQPYPDW SFAKYEDCSGIVSAHKIAID EYERLWLVDSG	146
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	74	VDQWHNKTFLAVIRYNGVPS S LNVVSDKTGN GGRLLQPYPDW SFAKYEDCSGIVSAHKIAID EYERLWLVDSG	146
t A0A2A3EG07 A0A2A3EG07_APICC/1-485	74	VDQWHNKTFLAVIRYNGVPS S LNVVSDKTGN GGRLLQPYPDW SFAKYEDCSGIVSANKIAID EYERLWLVDSG	146
t A0A2R4SV22 A0A2R4SV22_APICE/1-485	74	VDQWHNKTFLAVIRYNGVPS S LNVVSDKTGN GGRLLQPYPDW SFAKYEDCSGIVSANKIAID EYERLWLVDSG	146
t Q6QNI6 Q6QNI6_APICE/1-485	74	VDQWHNKTFLAVIRYNGVPS S LNVVSDKTGN GGRLLQPYPDW SFAKYEDCSGIVSANKIAID EYERLWLVDSG	146
t A0A088AU20 A0A088AU20_APIME/1-464	147	LVNNTQPMCSPKLLAFDLN TSKLLKQVEIPHDVA TTGK GELVSLTVQAMDSTNTMVMYVMDNKNTLIIVQNADD	219
t D3JXA7 D3JXA7_APIME/1-464	147	LVNNTQPMCSPKLLAFDLN TSKLLKQVEIPHDVA TTGK GELVSLTVQAMDSTNTMVMYVMDNKNTLIIVQNADD	219
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	147	LVNNTQPMCSPKLLAFDLN TSKLLKQVEIPHDVA TTGK GELVSLTVQAMDSTNTMVMYVMDNKNTLIIVQNADD	219
t A0A2A3EG07 A0A2A3EG07_APICC/1-485	147	LVNNTQPMCSPKLLAFDLN TSKLLKQVEIPHDVA VNA TTGKGG LASLAVQAMD SVNTMVMYVMDNKDDALIIVYQ	219
t A0A2R4SV22 A0A2R4SV22_APICE/1-485	147	LVNNTQPMCSPKLLAFDLN TSKLLKQVEIPHDVA VNA TTGKGG LASLAVQAMD SVNTMVMYVMDNKDDALIIVYQ	219
t Q6QNI6 Q6QNI6_APICE/1-485	147	LVNNTQPMCSPKLLAFDLN TSKLLKQVEIPHDVA VNA TTGKGG LASLAVQAMD SVNTMVMYVMDNKDDALIIVYQ	219
t A0A088AU20 A0A088AU20_APIME/1-464	220	SFHLSSHTLNHN S D KMSDQENLTLKEVDNK YGMALSPVTHNLYYNSP SSENLYYNTESLMKSENQGNV	292
t D3JXA7 D3JXA7_APIME/1-464	220	SFHLSSHTLNHN S D KMSDQENLTLKEVDNK YGMALSPVTHNLYYNSP SSENLYYNTESLMKSENQGNV	292
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	220	SFHLSSHTLNHN S D KMSDQENLTLKEVDNK YGMALSPVTHNLYYNSP SSENLYYNTESLMKSENQGNV	292
t A0A2A3EG07 A0A2A3EG07_APICC/1-485	220	NADDSFHRLSSH I S N H N F R S D K M S Q E N L T L K E V D N R V F G M A L S S V T H N L Y Y S P L S S Q N L Y Y N T T S L M N S Q N	292
t A0A2R4SV22 A0A2R4SV22_APICE/1-485	220	NADDSFHRLSSH I S N H N F R S D K M S Q E N L T L K E V D N R V F G M A L S S V T H N L Y Y S P L S S Q N L Y Y N T T S L M N S Q N	292
t Q6QNI6 Q6QNI6_APICE/1-485	220	NADDSFHRLSSH I S N H N F R S D K M S Q E N L T L K E V D N R V F G M A L S S V T H N L Y Y S P L S S Q N L Y Y N T T S L M N S Q N	292
t A0A088AU20 A0A088AU20_APIME/1-464	293	QYERVDQVDFSQLTVKAVS KNGVLLFGLANNTLSCWNEHQS LDRQNI DVVARN EDTLQMVVSMKIKQNI PQSG	365
t D3JXA7 D3JXA7_APIME/1-464	293	QYERVDQVDFSQLTVKAVS KNGVLLFGLANNTLSCWNEHQS LDRQNI DVVARN EDTLQMVVSMKIKQNI PQSG	365
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	293	QYERVDQVDFSQLTVKAVS KNGVLLFGLANNTLSCWNEHQS LDRQNI DVVARN EDTLQMVVSMKIKQNI PQSG	365
t A0A2A3EG07 A0A2A3EG07_APICC/1-485	293	GNDVQYESVQDVFSSQLSAKAVSKNGV LFFGFTNTTLGCWNEHQS LDRQNI DVVARN EDTLQMVVSMKIKQNI PQSG	365
t A0A2R4SV22 A0A2R4SV22_APICE/1-485	293	GNDVQYESVQDVFSSQLSAKAVSKNGV LFFGFTNTTLGCWNEHQS LDRQNI DVVARN EDTLQMVVSMKIKQNI PQSG	365
t Q6QNI6 Q6QNI6_APICE/1-485	293	GNDVQYESVQDVFSSQLSAKAVSKNGV LFFGFTNTTLGCWNEHQS LDRQNI DVVARN EDTLQMVVSMKIKQNI PQSG	365
t A0A088AU20 A0A088AU20_APIME/1-464	366	RVNNTQRNEYLLA L SDRNQV L NNDL N L E H V N F Q I L G A N V N D L I R N S R C A N F N D Q D N N H Y N H N H N Q A R H S S K S	438
t D3JXA7 D3JXA7_APIME/1-464	366	RVNNTQRNEYLLA L SDRNQV L NNDL N L E H V N F Q I L G A N V N D L I R N S R C A N F N D Q D N N H Y N H N H N Q A R H S S K S	438
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	366	RVNNTQRNEYLLA L SDRNQV L NNDL N L E H V N F Q I L G A N V N D L I R N S R C A N F N D Q D N N H Y N H N H N Q A R H S S K S	438
t A0A2A3EG07 A0A2A3EG07_APICC/1-485	366	QSGKVNTQRNEH L L A L T N K K Q D V L N D L N L E H V N F Q I L D A N V N D L I R N S R C A N S D N O D N N O H N Y N H N Q V R H S	438
t A0A2R4SV22 A0A2R4SV22_APICE/1-485	366	QSGKVNTQRNEH L L A L T N K K Q D V L N D L N L E H V N F Q I L D A N V N D L I R N S R C A N S D N O D N N O H N Y N H N Q V R H S	438
t Q6QNI6 Q6QNI6_APICE/1-485	366	QSGKVNTQRNEH L L A L T N K K Q D V L N D L N L E H V N F Q I L D A N V N D L I R N S R C A N S D N O D N N O H N Y N H N Q V R H S	438
t A0A088AU20 A0A088AU20_APIME/1-464	439	DNQNNNQHN DQAHS SSK SNNRHNND	464
t D3JXA7 D3JXA7_APIME/1-464	439	DNQNNNQHN DQAHS SSK SNNRHNND	464
sp Q17061 MRJP4_APIME/1-464	439	DNQNNNQHN DQAHS SSK SNNRHNND	464
t A0A2A3EG07 A0A2A3EG07_APICC/1-485	439	SKSDNQNNQHNNQAYH SSKSDNWDNNNNQAHS SSKFDNQNNNQYNN	485
t A0A2R4SV22 A0A2R4SV22_APICE/1-485	439	SKSDNQNNQHNNQAYH SSKSDNWDNNNNQAHS SSKFDNQNNNQYNN	485
t Q6QNI6 Q6QNI6_APICE/1-485	439	SKSDNQNNQHNNQAYH SSKSDNWDNNNNQAHS SSKFDNQNNNQYNN	485

## ANEXO A – Publicações geradas a partir desta tese.

Journal of Chromatography A, 1585 (2019) 182–191



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Simplex-centroid design and Derringer's desirability function approach for simultaneous separation of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys by HPLC/DAD



Bibiana da Silva, Luciano Valdomiro Gonzaga, Roseane Fett, Ana Carolina Oliveira Costa\*

Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 September 2018

Received in revised form

19 November 2018

Accepted 27 November 2018

Available online 29 November 2018

## Keywords:

Derringer's desirability function

Mixture experimental design

Phenolic compounds

Bracatinga honeydew honey

Central composite design

Method optimization

## ABSTRACT

Honeydew honeys have been under-evaluated about their major phenolic compounds, especially *Mimosa scabrella* Bentham (bracatinga) honeydew honey. In this work, a fast and robust chromatographic method was optimized for simultaneous separation and quantification by HPLC/DAD of 18 phenolic compounds detected in bracatinga honeydew honey. A simplex-centroid design, central composite rotatable design and response surface-desirability function simultaneous optimization of Derringer and Suich were used, evaluating the mobile phase composition, flow rate and oven temperature to separate all the peaks. These multivariate procedures were efficient in determining the optimal separation conditions, using peak pair resolutions and run time as responses. The 18 peaks were separated in 25 min and the mobile phase gradient started with 1.6% MeOH, 3.3% ACN, 1.0% THF and 94.1% formic acid 0.1% changing to 10.0% MeOH, 33.3% ACN, 6.0% THF and 50.7% formic acid 0.1%, oven temperature of 33 °C and flow rate of 0.73 mL min<sup>-1</sup>. The method was validated according to Eurachem guidelines and considered accurate and robust. It was applied to 18 bracatinga honeydew honey samples in which 9 phenolic compounds were identified and quantified.

© 2018 Published by Elsevier B.V.





Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

## Improved strategy based on QuEChERS method followed by HPLC/DAD for the quantification of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys



Bibiana Silva, Luciano Valdomiro Gonzaga, Roseane Fett, Ana Carolina Oliveira Costa\*

Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Dispersive-solid phase extraction  
Recovery profiles  
Bracatinga honeydew honey  
Sample preparation  
PCA

### ABSTRACT

Sample preparation of honey for analysis of minor components as phenolic compounds is challenging, mainly due to the high sugar content. In this regard, a fast, simple and solvent saving method for extraction of phenolic compounds in *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys was proposed. The method was based on QuEChERS, and the extraction, salting-out and clean-up steps were studied through univariate experiments. Solvent volume, solvent pH, partition salts, and clean-up salts were the variables studied. The responses were considered the recovery of selected phenolic compounds and the visual inspection of the bracatinga honeydew honeys chromatograms. The final sample preparation used 4 mL of acetonitrile (with 1% formic acid) besides 1 g NaCl and 4 g MgSO<sub>4</sub> on the extraction step. For the clean-up step, 150 mg CaCl<sub>2</sub>, 50 mg PSA, and 50 mg C<sub>18</sub> were used. After validation according to the Eurachem guidelines, the proposed QuEChERS method was applied for sample preparation of 52 bracatinga honeydew honey samples. Sixteen compounds were quantified by HPLC/DAD and Principal Components Analysis was used to distinguish samples regarding their phenolic composition. QuEChERS was useful for the phenolic compounds extraction from bracatinga honeydew honey and could be successfully applied for its determination in other honeys.