

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DO POTENCIAL BIOATIVO DO PÓLEN DE POTE DE
***Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)**

IANA SOARES PESSOA

VILA VELHA-ES
FEVEREIRO / 2022

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DO POTENCIAL BIOATIVO DO PÓLEN DE POTE DE
***Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

IANA SOARES PESSOA

VILA VELHA-ES
FEVEREIRO / 2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P475e Pessoa, Iana Soares.
Estudo do potencial bioativo do pólen de pote de *Melipona capixaba* (*Hymenoptera* : *Apidae*) / Iana Soares Pessoa. – 2022.
79f. : il.

Orientador: Marcio Fronza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2022.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Abelha. 3. Antioxidante
3. Pólen. I. Fronza, Márcio. I. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

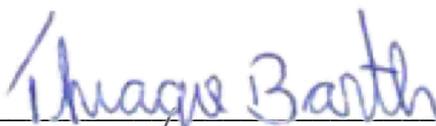
IANA SOARES PESSOA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOATIVO DO PÓLEN DE POTE DE
Melipona capixaba (Hymenoptera: Apidae)**

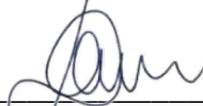
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022,

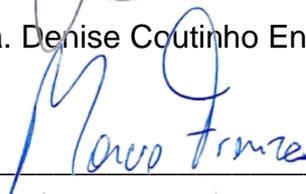
Banca examinadora:



Prof. Dr. Thiago Barth - UFRJ



Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer - UVV



Prof. Dr. Marcio Fronza – UVV

(Orientador)

Sinto falta e saudade.

A meus pais Rosa e Luiz Gonzaga "*in memoriam*"

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Marcio Fronza, expresso a mais profunda gratidão por tudo. Obrigada pelo ensinamento, apoio científico, paciência, compreensão e motivação ao longo deste percurso.

Aos amigos do laboratório de cultura de células e aos colaboradores do Biopráticas que sempre me motivaram, sou grata por todo apoio e disponibilidade quando precisei, não se faz pesquisa sozinho. Especialmente a querida Ariane, agradeço a ajuda e ombro amigo em vários momentos.

A minha “família UVV”, meus amigos da graduação, vocês fazem meus dias melhores.

Ao Carlos, que de diversas maneiras me motivou e auxiliou, agradeço o apoio.

As minhas tias Luciana, Mariana e aos meus primos que sempre me recebem com amor.

Um especial agradecimento ao meu filho Michael e as minhas irmãs Ioná e Lone, que sempre me apoiaram nos momentos de maior dificuldade, que cuidaram de mim mesmo à distância. Sem vocês não teria conseguido.

A minha vovó Luci, que me ensinou a amar os animais e a natureza, e mais uma vez me apoiou na vida acadêmica.

Aos queridos amigos da AME – ES, especialmente João, Adailton e Adelmo minha eterna gratidão. Obrigada pela gentileza em nos receber para as coletas e pelo entusiasmo que apoiam nossos projetos.

E principalmente a Deus, pois tenho clareza da sua presença em todos os momentos da minha vida, tenho certeza de que sua mão me segurou e me guiou.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
1.1 Abelhas	13
1.2 Abelhas no Brasil	13
1.3 <i>Melipona capixaba</i>	14
1.4 Pólen floral	16
1.5 Pólen de abelha	17
1.6 Pólen de pote / pão de abelha.....	19
1.7 Indicadores físico, químico, nutricionais e de qualidade	19
1.8 Compostos bioativos (metabólitos secundários)	22
1.9 Compostos fenólicos e flavonoides.....	22
1.10 Atividade antioxidante	23
1.11 Atividade anti-inflamatória.....	24
1.12 Justificativa da pesquisa	Erro! Indicador não definido.
1.13 Hipótese.....	Erro! Indicador não definido.
2 REFERÊNCIAS*	25
1 INTRODUÇÃO	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
3 RESULTADOS	39
3.1 Determinação do rendimento dos extratos hidroetanólicos.....	39
3.2 Determinação de flavonoides, fenólicos totais e taninos.....	39
3.3 Espectrometria de Massas (ESI-FT-ICR MS).....	40
3.4 Atividade antioxidante dos extratos.....	66
3.5 Viabilidade Celular	67
3.6 Redução da produção do ânion superóxido (O ₂ ⁻).....	68
3.7 Determinação de óxido nítrico <i>in vitro</i>	70
3.8 Determinação de citocinas <i>in vitro</i>	70
4 DISCUSSÃO	72
5 CONCLUSÕES	74
6 AGRADECIMENTOS	74

7	REFERÊNCIAS*	75
---	--------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS⁺ – 2,2-azinobis (3-
etilbenzotiazol-6-sulfonato)

TMB – Tetrametilbenzidina

AMU – Unidades de Massa Atômica

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

ANOVA – Análise de Variância

ASF – Abelha Sem Ferrão

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio Padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DBE – (Double Bound Equivalent)

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

ESI-FT-ICR MS – Espectrometria de
Massas com Ionização por Eletrospray
e Ressonância Ciclotrônica de Íons por
Transformada de Fourier

ETOH – Etanol

IC₅₀ – Concentração do Extrato
Requerida para Reduzir a Quantidade
de Radicais Livres em 50%

IL – Interleucina

IL-10 – Interleucina 10

IL-6 – Interleucina 6

LPS – Lipopolissacarídeo

MTT – (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-
2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

NBT – Cloreto de Nitroazul de
Tetrazólio

NO – Óxido Nítrico

PPM – Partes por Milhão

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Rendimento do processo de obtenção dos extratos hidroetanólicos dos pólenes de pote P1, P2 e P3 de *M. capixaba*.....**39**
- Tabela 2.** Quantificação de flavonóides, fenólicos e taninos totais nos extratos hidroetanólicos dos pólenes de pote P1, P2 e P3 de *M. capixaba*.....**39**
- Tabela 3.** Espécies químicas propostas a partir de dados ESI(-)FT-ICR MS para os extratos hidroetanólicos dos Pólenes P1, P2 e P3 de *Melipona capixaba***41**
- Tabela 4.** Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos dos Pólenes de Pote P1, P2 e P3 de *Melipona capixaba*.....**67**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Foto representativa da abelha *Melipona capixaba*. Fonte: portfólio do biólogo entomólogo Felipe Bertholdi Fraga.15
- Figura 2.** Representação das paredes do pólen. As setas indicam a categorização das camadas interna e externa, intina em cinza claro e exina em preto. Fonte: adaptado de Quilichini, Grienberger e Douglas [23]......16
- Figura 3.** Espectros de massa dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1 (Figura 2A), P2 (Figura 2B) e P3 (Figura 2C) de *Melipona capixaba* obtidos por ESI(-)FT-ICR MS. Em vermelho estão os compostos cujos números correspondem ao descrito na Tabela 3. Em azul estão destacadas exemplos de fragmentações de massa com perdas de 152 e 162 unidades de massa atômica (AMU)......66
- Figura 4.** Efeitos citotóxicos dos extratos hidroetanólicos P1, P2 e P3 de *M. capixaba* nas linhagens de macrófagos (RAW 264.7) Figura 3A, melanoma (MV3) Figura 3B e fibroblastos (L929) Figura 3C.68
- Figura 5.** Efeito dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1, P2 e P3 de *M. capixaba* na produção do ânion superóxido. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. #Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle negativo (basal). *Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle + LPS.69
- Figura 6.** Efeito dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1, P2 e P3 de *M. capixaba* na produção de óxido nítrico *in vitro* em cultura de macrófagos estimulados com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. #Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle negativo (basal). *Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle + LPS.70
- Figura 7.** Efeito dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1, P2 e P3 de *M. capixaba* na produção de IL-6 (Figura 6A) e TNF- α (Figura 6B) em células RAW (264.7) estimuladas com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. #Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle negativo (basal). *Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle + LPS.72

RESUMO

Pessoa, Iana Soares, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2022. **Estudo do potencial bioativo do pólen de pote de *Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)**. Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza.

O pólen das abelhas sem ferrão, conhecido como “Pólen de Pote”, apresenta grande variação em sua composição química e bioativa conforme espécie de abelha, espécie floral, região e estação do ano, o que dificulta o estabelecimento de padrões de qualidade. Este estudo teve como objetivo investigar a composição química e avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* do pólen de pote da abelha *Melipona capixaba* proveniente de diferentes locais e altitudes. Extratos do pólen de pote de três diferentes municípios do estado do Espírito Santo, Brasil, foram preparados empregando a maceração assistida por ultrassom utilizando como solvente uma mistura hidroetanólica à 70%. O conteúdo de flavonoides foi determinado por método espectrofotométrico após a reação com o cloreto de alumínio e expresso em g equivalente de quercetina (g QE)/100g do extrato). O teor de fenólicos e taninos foi estimado pelo método Folin-Ciocalteu expressos em g equivalentes de ácido gálico (g GAE)/100g do extrato). Os compostos bioativos foram identificados através de espectrometria de massas (ESI-FT-ICR MS). A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos químicos do sequestro do radical ABTS e DPPH. A citotoxicidade *in vitro* dos extratos de pólen de pote foi investigada em cultura de fibroblastos (L929), macrófagos (RAW 264.7) e melanoma (MV3) pelo método colorimétrico do MTT. A inibição da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e óxido nítrico (NO) e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 foram avaliadas em macrófagos estimulados por LPS. Na quantificação do teor de flavonoides, fenólicos totais e taninos foram encontradas diferenças significativas entre as três amostras, as maiores concentrações médias obtidas foram $10,74 \pm 1,21$ (g QE / 100g) para flavonoides, $10,70 \pm 0,66$ (g GAE / 100g) para fenólicos e $8,91 \pm 0,88$ (g GAE / 100g) para taninos totais. Foram identificados nos diferentes extratos de *M. capixaba* cinquenta compostos bioativos. Os menores valores de IC₅₀ para atividade antioxidante obtido no ABTS foi de $13,68 \pm 2,52$ μ g/mL e no DPPH de $40,27 \pm 11,53$ μ g/mL. Na produção de mediadores do processo inflamatório *in vitro* as três amostras tiveram efeito redutor de $O_2^{\cdot-}$. Inibição significativa na produção de IL-6 e TNF- α foi observado na concentração de 20 μ g/mL em diferentes amostras. No geral o pólen de pote localizado em maior altitude apresentou os melhores resultados para atividade antioxidante e anti-inflamatória, entretanto apesar do gradiente altitudinal influenciar em fatores ecológicos outras análises podem contribuir para esclarecer melhor essa questão. Os resultados apresentaram, pela primeira vez, elucidações sobre a composição química e potenciais atividades bioativas do pólen de pote de *M. capixaba*, o que pode contribuir como referência para elaboração de uma norma futura, específica para os produtos das abelhas sem ferrão.

Palavras-chaves: abelha sem ferrão, pólen de pote, antioxidante, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Pessoa, Iana Soares, M.Sc, Vila Velha University – ES, February 2022. **Study of the bioactive potential of *Melipona capixaba* pot pollen (Hymenoptera: Apidae).** Advisor: Prof. Dr. Marcio Fronza.

The pollen of stingless bees, known as "Pot Pollen", presents great variation in its chemical and bioactive composition according to bee species, floral species, region, and climate season, which makes it difficult to establish quality standards. This study aimed to investigate the chemical composition and evaluate the in vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of pot pollen of the bee *Melipona capixaba* originating from different locations and altitudes. Extracts of pot pollen from three different municipalities in the state of Espírito Santo, Brazil, were prepared by ultrasound-assisted maceration using 70% hydroethanolic mixture as solvent. The flavonoid content was determined by spectrophotometric method reaction with aluminum chloride and expressed in g quercetin equivalent (g QE)/100g of extract). The phenolics and tannins content was estimated by the Folin-Ciocalteu method expressed in g gallic acid equivalent (g GAE)/100g of extract). Bioactive compounds were identified by mass spectrometry (ESI-FT-ICR MS). The antioxidant activity was evaluated by ABTS and DPPH radical scavenging chemical methods. The in vitro cytotoxicity of pot pollen extracts was investigated in culture of fibroblasts (L929), macrophages (RAW 264.7) and melanoma (MV3) by the MTT colorimetric method. Inhibition of the production of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and nitric oxide (NO) and of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 were evaluated in macrophages stimulated by LPS. The quantification of flavonoids, total phenolics and tannins content presented significant differences between the three samples, where the highest average concentrations obtained were 10.74 ± 1.21 (g QE / 100g) for flavonoids, 10.70 ± 0.66 (g GAE / 100g) for phenolics and 8.91 ± 0.88 (g GAE / 100g) for total tannins. In the different extracts of *M. capixaba* fifty bioactive compounds were identified. The lowest IC₅₀ values for antioxidant activity obtained by ABTS was 13.68 ± 2.52 μ g/mL and in DPPH 40.27 ± 11.53 μ g/mL. In the production of mediators of the in vitro inflammatory process, the three samples had an $O_2^{\bullet-}$ reducing effect. Significant inhibition in the production of IL-6 and TNF- α was observed at the concentration of 20 μ g/mL in different samples. In general, the pollen from a pot located at a higher altitude showed the best results for antioxidant and anti-inflammatory activity, however, despite the influence of the altitudinal gradient in ecological factors, other analyzes may contribute to clarify this issue. The results presented, for the first time, elucidations about the chemical composition and potential bioactive activities of *M. capixaba* pot pollen, which may contribute as a reference for the future elaboration of a standard, specific for the products of stingless bees.

Keywords: stingless bee, pot pollen, antioxidant, anti-inflammatory.

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Abelhas

As abelhas surgiram no Cretáceo, juntamente com as primeiras plantas que produziam flores, elas evoluíram de vespas predadoras, substituindo insetos e aracnídeos como principal fonte de alimento por néctar e pólen das flores [1,2].

Dois terços de mais de 225 mil espécies vegetais dependem de insetos para sua reprodução. A polinização via abelha tem um importante papel devido a sua relação intrínseca e pode se dar entre plantas, entre flores de uma mesma planta ou numa mesma flor [3].

A abelha forrageira recolhe na flor os grãos de pólen e, aplicando néctar e saliva, formam uma bolota com milhares ou até milhões de grãos de pólen, chamada de pólen de abelha. Elas modificam o néctar e o pólen antes de consumi-los, criando produtos cujos sabores, benefícios nutricionais e terapêuticos se tornaram atrativos para o consumo humano [4].

Acredita-se que o homem se interessou pelos produtos das abelhas há cerca de 8 mil anos, sendo o mel o primeiro açúcar conhecido. Diversos produtos elaborados pelas abelhas são explorados pelo homem, como mel, própolis, pólen, geleia real, cera e veneno [5,6].

1.2 Abelhas no Brasil

No Brasil, as abelhas melíferas mais difundidas e conhecidas são as do gênero *Apis*, porém elas não são nativas, foram inicialmente introduzidas no país com a espécie europeia *Apis mellifera mellifera* no Rio de Janeiro em 1839. Posteriormente foram introduzidas outras 3 espécies europeias, e em 1956 introduziu-se a espécie africana *Apis mellifera scutellata*. Não existem mais abelhas europeias puras no Brasil devido a seu cruzamento com a africana, originando um poli-híbrido africanizado [7].

Por outro lado, o Brasil abriga a maior variedade de abelhas melíferas sem ferrão, também chamadas de abelhas indígenas sem ferrão [8]. Conforme Pedro [9] até o ano de publicação do estudo foram identificadas 244 espécies no país, sendo dessas 87 endêmicas.

As abelhas indígenas sociais habitam grande parte das regiões de clima tropical e partes de clima temperado do planeta [8]. Elas constituem a tribo Meliponini, e juntamente com as tribos Apini, Bombini e Euglossini formam a subfamília Apinae

(Hymenoptera: Apinae: Apidae), conforme classificação proposta por Michener [10]. As abelhas da subfamília Apinae constroem seus ninhos ou depósitos com cera ou cerume (mix de cera e seiva de árvores), suas operárias carregam o pólen das flores e outros materiais para o ninho em concavidades chamadas corbículas, localizadas nas tíbias de suas pernas traseiras [8,10].

Villas-Bôas [11] cita algumas espécies cultivadas na meliponicultura do Brasil, sendo que as mais populares são: no sudeste a Guarupú (*Melipona bicolor*), a Jataí (*Tetragonisca angustula*) e a Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*); no norte a Jandaíra-Preta (*Melipona compressipes*) e a Canudo (*Scaptotrigona sp*); no sul a Guaraipo (*Melipona bicolor*), a Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), a Jataí (*Tetragonisca angustula*) e a Bugia (*Melipona Mondury*); no nordeste a Jandaíra (*Melipona subnitida*), a Monduri (*Melipona asilvai*), e a Uruçu-Nordestina (*Melipona scutellaris*); no centro-oeste a Uruçu (*Melipona compressipes*), a Uruçu-Amarela (*Melipona rufiventris*), a Canudo (*Scaptotrigona sp.*) e a Jataí (*Tetragonisca angustula*).

1.3 *Melipona capixaba*

Melipona capixaba Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) é uma espécie de abelha sem ferrão (ASF) endêmica do Espírito Santo, é conhecida popularmente por vários nomes dentre os mais comuns “uruçu-preta” e “uruçu-capixaba” [12,13]. *Melipona capixaba* (Figura 1) é uma abelha sem ferrão relativamente grande, medindo aproximadamente 10,08 mm de comprimento total [14].



Figura 1. Foto representativa da abelha *Melipona capixaba*. Fonte: portfólio do biólogo entomólogo Felipe Bertholdi Fraga.

A área geográfica em que a abelha *M. capixaba* é encontrada é um *hot spot* de área remanescente do bioma Mata Atlântica com características muito próprias de vegetação, temperatura e altitude [15]. Silveira *et al.* [16] citam o desmatamento da região como um dos principais motivos de ameaça à espécie, que tem o hábito de nidificar em troncos de árvores maiores [13]. A espécie encontra-se classificada como Em Perigo (EN) na lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção [16].

Resende [15] abordou a distribuição geográfica da *M. capixaba* e encontrou ocorrência natural da espécie nos municípios de Domingos Martins, Conceição do Castelo, Castelo, Venda Nova do Imigrante, Alfredo Chaves, Brejetuba, Marechal Floriano, Vargem alta, Santa Maria de Jetibá e Afonso Cláudio. Nesses locais a temperatura costuma ser mais amena, a cobertura vegetal é do tipo Floresta Ombrófila Densa Montana e Floresta Ombrófila Aberta Montana, com temperatura entre 18°C e 23°C e altitude de 800 - 1200 metros [15,17].

A Lei nº 11077 de 27/11/2019 – DOE/ES normatiza a criação de abelhas nativas sem ferrão no âmbito do Estado do Espírito Santo para criadores comerciais que possuam acima de 50 colônias. A lei estadual dispõe do uso e manejo de abelhas nativas sem ferrão, bem como os procedimentos para a autorização de meliponários e suas atividades correlatas. Ela também estabelece que a criação de abelhas nativas sem ferrão seja restrita à região geográfica de ocorrência natural e que a criação de espécies constantes em qualquer lista oficial de espécies ameaçadas poderá ser

realizada com finalidade comercial, desde que associada a projeto de conservação [18].

No estado do Espírito Santo ocorrem 39 espécies de abelhas nativas sem ferrão, porém a única espécie endêmica é a abelha *Melipona capixaba* [14,18].

1.4 Pólen floral

O grão de pólen é a célula reprodutora masculina das angiospermas, com tamanho variando entre 2,5 e 250 μm . Localiza-se na antera da flor, e sua transferência até o estigma se dá pelo vento (anemofilia), água (hidrofilia) e animais (zoofilia), na maioria insetos. Conforme seu processo de transporte e fertilização, cada espécie de planta desenvolveu seu tipo característico de pólen, muitos podendo inclusive ser reconhecidos por seu formato, composição química ou conteúdo de nutrientes [19–21].

O pólen possui duas paredes protetoras, uma interna chamada intina e outra externa chamada exina (Figura 2). Essa camada externa é recoberta por esporopolenina, um carboidrato complexo, que impede sua desidratação e confere resistência a ácidos fortes, temperaturas altas e agentes decompositores de matéria orgânica [22].

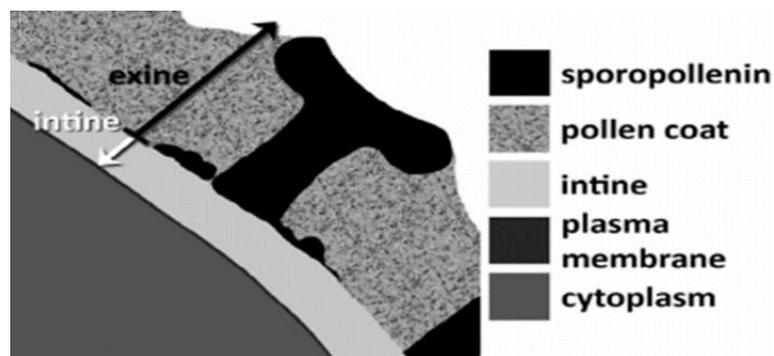


Figura 2. Representação das paredes do pólen. As setas indicam a categorização das camadas interna e externa, intina em cinza claro e exina em preto. Fonte: adaptado de Quilichini, Grienberger e Douglas [23].

A exina de muitos pólenes é tão dura que é praticamente impossível digeri-la, e tão resistente que possui registros fósseis de milhões de anos [21]. Por ter resistência química, ela preserva os compostos do interior do grão, limitando sua absorção por digestão [24]. A exina é a principal barreira para a digestão do conteúdo do pólen,

porém possui poros germinativos por onde ocorre a extração do conteúdo no interior do grão [21].

Nem todos os pólenes são coletados pelas abelhas. Os pólenes com características anemófilas (polinização por ação do vento), contém alergênicos que podem causar sintomas graves. Por outro lado, os pólenes com características entomófilas (polinização via insetos) são em grande parte coletados pelas abelhas e utilizados como alimentos pelo ser humano [20].

As razões que orientam a abelha na colheita do pólen ainda são objeto de estudo, mas sabe-se que, em geral, para os insetos polinizadores, a preferência está condicionada pelas características dos constituintes do pólen, e não pela quantidade de pólen disponível [19].

As fontes naturais de alimentação das abelhas, guardadas suas particularidades, estão no néctar, ou pseudonéctar, no pólen e na água. Do néctar elas obtêm energia de seus carboidratos e do pólen obtêm proteínas, lipídios, vitaminas e minerais [19].

1.5 Pólen de abelha

A abelha forrageira recolhe na flor os grãos de pólen com sua boca ou por meio de seus pelos e, acrescentando néctar e saliva, forma bolotas com milhares ou até milhões desses grãos [4]. Cada abelha forrageira pode carregar para a colmeia, por vez, até duas bolotas em suas corbículas (compartimento especializado para carga localizado em suas pernas posteriores), a esse pólen coletado pelas abelhas denomina-se pólen de abelha [8].

O pólen é coletado em fontes botânicas diversas, dependendo das preferências da espécie da abelha e da disponibilidade da flora local. As abelhas não separam as bolotas por tipo de pólen ao armazená-las, o que dificulta uma avaliação posterior da composição polínea. No entanto, é possível separar as bolotas por cor e analisá-las ao microscópio. Como as abelhas raramente coletam mais de um tipo de pólen por incursão forrageira [3], a bolota geralmente possui um único tipo de pólen e sua respectiva coloração, permitindo a separação e identificação palinológica [20].

O pólen de abelha é considerado uma fonte de energia e de substâncias bioativas, e é consumido como suplemento alimentar [25]. Uma característica determinante para isso é a grande variação que sofre sua composição química,

nutritiva e bioativa devido a fatores como diversidade de espécie floral, região de origem e estação [20,26,27].

Ele possui aproximadamente 200 compostos químicos, contendo de 5-60% de proteínas, 13-55% de açúcares redutores [20], minerais, oligoelementos, vitaminas e carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, esteróis e terpenos, e todos aminoácidos essenciais ao homem [26,28].

Estudos apontaram seu potencial terapêutico com diversas propriedades biológicas, como antioxidante, antibacteriana [28], anti-inflamatória, antifúngica, hepatoprotetora [29] e antiaterosclerótica [30], anti-tumoral [31] e analgésica local [32].

Chantarudee *et al.* [33] constataram que no pólen de abelha havia um significativo valor nutricional, pelo alto nível de calorias, açúcares, vitaminas, proteínas, coenzimas e níveis moderados de gordura encontrados, e em comparação ao pólen floral de mesma origem botânica apresentou um nível significativamente maior de atividade biológica.

Quanto à sua coleta pelo apicultor/meliponicultor, pode ocorrer antes dele ser armazenado na colmeia, no momento que a abelha forrageira chega em sua entrada utilizando-se grades de retenção como armadilhas, onde as abelhas deixam cair as bolotas de pólen ao passarem pelos pequenos espaços da grade, ou no caso das abelhas sem ferrão através de coleta direta nos potes de cerume [27].

Embora a produção do pólen de abelha em larga escala tenha iniciado após a Segunda Guerra Mundial [4], no Brasil sua produção iniciou-se no final dos anos 80 [19]. Ele é normalmente comercializado na forma desidratada, pois após sua coleta precisa ser rapidamente congelado ou desidratado (4% de umidade) para manter sua qualidade por mais tempo [19,34].

No Brasil existe uma norma de qualidade para o pólen de abelha comercializado, definindo os valores nutricionais aceitos, entre outros parâmetros [34]. Entretanto, a norma tem como base o pólen apícola (espécie *Apis mellifera*), carecendo de norma específica para o pólen das abelhas sem ferrão. A legislação determina valores nutricionais apenas para o pólen de abelha desidratado: umidade máxima de 4%, proteína mínima de 8%, fibras brutas mínimas de 2%, açúcares entre 14,5-55,0%, lipídios mínimos de 1,8% e cinzas máximas de 4% [19,34].

1.6 Pólen de pote / pão de abelha

Ao retornarem à colmeia, com o pólen coletado, as abelhas forrageiras deixam as bolotas de pólen na entrada com as abelhas operárias que regurgitam sobre elas mel e enzimas salivares [4,8].

O processo na colmeia é semelhante tanto para as Meliponíneas quanto para as Apícolas: o pólen de abelha fica armazenado em recipientes, onde sofrerá atuação de micro-organismos, (principalmente bactérias ácido-láticas advindas do estômago das abelhas) ao receber acréscimo de mel e enzimas contidas na saliva da abelha operária iniciam um processo de fermentação láctica, transformando-se ao final num novo produto a ser consumido pelas abelhas, mais digerível, acrescido de novos nutrientes e com grande capacidade de conservação. No caso das Meliponíneas, o pólen de abelha é armazenado em potes de cerume (cera e seiva) e é conhecido como pólen de pote, já as Apícolas o armazenam em células de cera que são denominadas pão de abelha [21,27].

Ao contrário do pólen de abelha (bolotas de pólen), que precisa ser desidratado ou congelado para não perder seus valores nutricionais, o pólen de pote e o pão de abelha possuem uma capacidade de conservação que permite seu armazenamento por anos [21].

Em comparação ao pólen de abelha, o pólen de pote apresenta uma maior quantidade de ácido láctico, mais açúcares reduzidos, e vitamina K [3]. Um estudo feito no planalto cundiboyacense, na Colômbia, indicou também uma melhor digestibilidade, com maior disponibilização de nutrientes e bioativos [27].

No Brasil, o pólen de pote também é conhecido popularmente como samora, saburá ou samburá [3,8].

A extração do pólen armazenado não é tão simples devido à forma como é armazenado pelas abelhas, dificultando sua exploração até poucos anos atrás. Equipamentos especializados como grades de retenção são adaptados para uma extração sem grandes danos as colmeias, especialmente para o pólen apícola [27]. O pólen de pote ainda não tem uma forma específica de coleta, apenas equipamentos utilizados para a coleta de mel, como bombas de sucção, glossadores e seringas [11].

1.7 Indicadores físico, químico, nutricionais e de qualidade

No Brasil, as referências estabelecidas de padrões de qualidade exclusivas do pólen de pote ainda não estão definidas. Utiliza-se como parâmetro o Regulamento

Técnico Brasileiro de 2001, porém ele é específico para o pólen apícola (*Apis mellifera*) [34].

Dentre as principais características analisadas do pólen armazenado destacam-se:

a) Umidade: quantidade de água na amostra. A legislação brasileira determina valores máximos de umidade para o pólen apícola fresco (30%) e desidratado (4%). Em comparações entre amostras frescas e desidratadas, a quantidade de água influencia as concentrações dos demais indicadores, devendo ser comparados na base seca [34]. De acordo com Oliveira *et al.* [35], a umidade do pólen de pote é alta devido a mistura feita pelas abelhas, que adicionam enzimas e mel ao pólen, em sua pesquisa foi encontrado 53% de umidade para o pólen armazenado de *M. scutellaris*.

b) Cinzas: indicador de sujidades. O máximo permitido para o pólen apícola no Brasil é de 4% na base seca [34].

c) Fibra bruta: O mínimo permitido para o pólen apícola no Brasil é de 2% na base seca [34].

d) pH: mede a concentração de íons hidrogênio na amostra. Alimentos que apresentam pH alcalinos ou pouco ácidos ($\text{pH} > 4,5$) são favoráveis ao desenvolvimento de bactérias, enquanto alimentos mais ácidos ($\text{pH} < 4,5$) são favoráveis ao desenvolvimento de bolores e leveduras [36]. O valor permitido para o pólen apícola no Brasil é pH de 4 a 6 [34]. O pólen de pote tende a ter alta acidez devido a fermentação, como nos valores encontrados no pólen de pote da espécie *M. scutellaris*, com pH de 3,7 [35].

e) Acidez livre: relacionada às condições de conservação do produto [37]. O máximo permitido para o pólen apícola no Brasil é de 300 mEq/kg. O teste da acidez para *M. scutellaris* indicou valor de 453 + 60 mEq/kg [35].

f) Atividade da água: está correlacionada ao crescimento microbiano e reações de deterioração [37].

g) Minerais: não podem ser sintetizados pelo corpo humano, sendo adquiridos via alimentação, podendo variar de essenciais a tóxicos, dependendo do mineral e da dosagem. Uma análise do pólen de abelha da espécie *M. subnitida* na Paraíba encontrou K, Ca, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu, sem traços de Na [26].

h) Lipídios: indicador de importância nutricional, no Brasil a determinação mínima para o pólen apícola é de 1,8% na base seca [34].

i) Açúcares totais: indicador de importância nutricional. No Brasil a determinação para o pólen apícola é o intervalo de 14,5 – 55,0% na base seca) [34].

j) Carboidratos: indicador de importância nutricional, contempla os açúcares totais [34].

k) Proteínas: indicador de importância nutricional, no Brasil a determinação mínima para o pólen apícola é de 8% na base seca. Em estudo de Oliveira [35] para 40 amostras do pólen de pote de *M. scutellaris* na Bahia, o índice variou de 10,19 a 24,02% (base úmida, com umidade entre 47,3% e 55,70%). Os altos valores normalmente encontrados para o pólen de abelha e pólen de pote os colocam como potenciais suplementos nutricionais [35].

l) Aminoácidos: dos 20 aminoácidos existentes, 9 são essenciais para o bom funcionamento do corpo humano, ou seja, não são produzidos naturalmente e precisam ser adquiridos pela alimentação. Análise do pólen de abelha de *M. subnitida* na Paraíba encontrou 17 aminoácidos, sendo desses 8 essenciais aos humanos [26].

m) Energia: calculado com base no percentual de lipídios, proteínas e carboidratos presentes na amostra, o indicador é de interesse nutricional [34].

n) Ácidos graxos: uma das principais fontes de energia. Em análise do pólen de pote de *M. scutellaris*, na Bahia, foram identificados 12 ácidos graxos, sendo o ácido cáprico o principal ácido saturado, ácido oleico o principal monoinsaturado, e ácidos linoleico/ômega-6 e linoleico/ômega-3 os principais poli-insaturados [35]. Para o pólen de abelha de *M. mandaçaia*, verificou-se que os valores encontrados de ácidos graxos poli-insaturados foram significativamente maiores que os monoinsaturados e saturados, relação insaturados/saturados de $1,4 \pm 0,4$, indicando sua qualidade nutricional [38].

o) Testes microbiológicos: são testes higiênicos relativos a processamento e manipulação do produto. Normalmente medem-se os níveis de levedura, bolores e micro-organismos e presença de coliformes fecais. Estudo do pólen de *M. mandaçaia* foram detectados apenas micro-organismos aeróbios mesófilos em pequena quantidade, indicando que as amostras foram manipuladas corretamente [38]. Quanto à *Salmonella* sp, a norma brasileira determina que estejam ausentes em 25g do produto [34].

1.8 Compostos bioativos (metabólitos secundários)

O metabolismo vegetal compreende reações químicas e enzimáticas que o classificam como metabolismo primário, quando visam atividades comuns essenciais à vida celular, com funções vitais bem definidas (lipídeos, protéidos e glicídios), ou como metabolismo secundário, quando visam atividades que lhe tragam qualidades específicas destinadas a vantagens estratégicas conferindo proteção e sobrevivência ao ambiente [39].

Metabólitos secundários produzidos por vegetais são de grande interesse para o consumo humano em aplicações terapêuticas, diversas atividades biológicas estão sendo associadas a eles, e ainda há muito por descobrir, o pólen floral é rico em metabólitos secundários, já o pólen de abelha, normalmente composto com vários tipos de pólenes, acrescenta diversidade a esta riqueza, trazendo benefícios, mas também algumas dificuldades de aplicação [20,26,27].

Denisow e Denisow-Pietrzyk [20] apontam as boas expectativas para a saúde devido à ampla gama de metabólitos secundários encontrados no pólen de abelha, além de enzimas e coenzimas presentes, e suas promissoras propriedades biológicas. Entretanto, apontam também o desafio da variação espécie-específica presente em sua composição, sendo essa a principal dificuldade para sua aplicação terapêutica.

Os compostos bioativos do pólen de abelha (desidratado) incluem ácidos graxos insaturados/saturados (1–10%: linoleico, γ -linoleico e arcaico), fosfolipídios (1.5%), fitoesteróis (1.1%: β -sitosterol, P-sitosterol), terpenos, polifenóis, principalmente flavonoides (3–8%: principalmente catequinas, kaempferol, quercetina e isorhamnetinas), pigmentos carotenóides orgânicos (licopeno, zeaxantina) e as vitaminas β -caroteno, tocoferol (vitamina E), niacina (vitamina B3), tiamina (vitamina B1), biotina e ácido fólico (vitamina B9) [20].

1.9 Compostos fenólicos e flavonoides

Compostos fenólicos, são metabólitos secundários produzidos pelas plantas na rota do ácido chiquímico, caracterizam-se por possuírem ao menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático [40]. Os compostos fenólicos são considerados benéficos para a saúde humana principalmente por sua atividade antioxidante. A estrutura dos polifenóis, especialmente dos flavonoides, são ideais para o sequestro de radicais, sendo mais efetivos que as vitaminas C e E [41]. Lopes *et al.* [42] analisaram o pólen coletado de *Scaptotrigona affinis postica* encontrando 9,3% de fenólicos totais, frente

aos 3,0% de *Apis mellifera* [43]. Para *M. fasciculata*, obteve-se valores entre 6,1 e 11,4% [44].

Quanto ao perfil dos compostos fenólicos, um estudo com 7 diferentes espécies de abelhas sem ferrão do Gênero *Melipona* no Nordeste do Brasil, indicou que os compostos fenólicos mais comumente encontrados no pólen das meliponíneas são a Apigenina, Kaempferol, Luteolina, Naringin, Rutina, ácidos Gálico, Ferúlico, Cafeico, p-cumárico, Clorogênico, Abscísico, Protocatecuico, Vanílico e trans-cinâmico [45].

1.10 Atividade antioxidante

Radicais livres são espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio produzidas naturalmente pelo organismo humano para atuar em funções como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes [46,47]. No entanto, seu excesso, pode originar um estresse oxidativo que promoverá sua interação com moléculas vitais das células, como as que compõem membranas celulares, proteínas, DNA e RNA, podendo lesioná-las ou provocar a morte celular, desenvolver respostas de inflamação crônica ou doenças diversas como câncer, cardiovascular, metabólica, degenerativa e neoplásica [48].

Existem diferentes testes para se medir a atividade antioxidante de uma amostra. Dentre os mais comuns está a medição em IC₅₀, que informa a concentração de amostra necessária para sequestrar/reduzir 50% dos radicais livres da solução padrão (DPPH e ABTS). Quanto menor a concentração de amostra necessária, maior sua atividade antioxidante [49,50].

O pólen das abelhas sem ferrão vem apresentando uma maior atividade antioxidante quando comparado ao de *Apis mellifera*. Para a solução padrão DPPH, o pólen coletado de *Scaptotrigona affinis postica* apresentou IC₅₀ = 273 µg/mL [42], valor promissor frente ao do pólen apícola com IC₅₀ = 810 a 4690 µg/mL [51]. Para *M. fasciculata*, obteve-se IC₅₀ = 117 a 598 µg/mL [44]. Entretanto, com atividade inferior à da geoprópolis, como por exemplo, de *M. fasciculata*, que alcançou valor de IC₅₀ de 3,75 µg/mL usando acetato de etila como solvente [52].

Importante ressaltar que um estudo de Silva *et al.* [53] apontou uma dependência deste indicador com o tipo do solvente utilizado na extração da amostra. Alguns solventes conseguem extrair mais compostos fenólicos do pólen que outros,

como por exemplo, os melhores resultados antioxidantes foram conseguidos, na sequência, por acetato de etila, etanol e hexano.

1.11 Atividade anti-inflamatória

De um modo geral, a inflamação é um mecanismo de defesa imunológico complexo que tanto luta contra estímulos nocivos quanto pode ser prejudicial devido às reações exageradas a estímulos normais. Lopes *et al.* [42] sugerem que a atividade anti-inflamatória se dá pela presença de compostos fenólicos. A enzima COX é uma componente essencial do processo inflamatório, pois realiza o metabolismo do ácido araquidônico e produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, e, portanto, alvo de inibição das drogas anti-inflamatórias não esteroides [42].

Testes *in vitro* do pólen de abelha de *M. fasciculata* apresentaram alta inibição da enzima COX-2 (68% acima da COX-1). Testes *in vivo* apresentaram alta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Testes *in silico* sugeriram a ação dos compostos do pólen na inibição da liberação de histamina e inibição da síntese de prostaglandinas, onde o ácido graxo linolênico e o ácido linoleico são os compostos que apresentam os melhores parâmetros de interação com o receptor H1 da histamina. Sugerem também que a quercetina 3,4'-diglicosídeo e o ácido elágico foram os compostos que apresentaram os melhores parâmetros de interação com COX-2 [44].

Estudo realizado por Lopes *et al.* [42] utilizando o pólen coletado da *Scaptotrigona affinis postica* também apontou inibição da COX *in vitro* e atividade anti-inflamatória e antinociceptiva nos modelos *in vivo* avaliados.

2 REFERÊNCIAS*

*As referências listadas neste trabalho foram formatadas segundo as normas da revista *Antioxidants*.

1. Danforth, B.N.; Poinar, G.O. Morphology, Classification, and Antiquity of *Melittosphex burmensis* (Apoidea: Melittosphecidae) and Implications for Early Bee Evolution. *J. Paleontol.* **2011**, *85*, 882–891, doi:10.1666/10-130.1.
2. Michener, C.D.; Grimaldi, D.A. The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 6424–6426, doi:10.1073/pnas.85.17.6424.
3. Souza, R.C. da S.; Yuyama, L.K.O.; Aguiar, J.P.L.; Oliveira, F.P.M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. *Acta Amaz.* **2004**, *34*, 333–336, doi:10.1590/S0044-59672004000200021.
4. Campos, M.G.R.; Frigerio, C.; Lopes, J.; Bogdanov, S. What is the future of Bee-Pollen? *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* **2010**, *2*, 131–144, doi:10.3896/IBRA.4.02.4.01.
5. Crane, E. The Past and Present Importance of Bee Products to Man. In *Bee Products*; Springer US: Boston, MA, 1997; pp. 1–13.
6. Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Phenolic Composition of Propolis. In *Bee Products - Chemical and Biological Properties*; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp. 99–111 ISBN 9783319596891.
7. Ferreira, R.S.; Almeida, R.A.M.B.; Barraviera, S.R.C.S.; Barraviera, B. Historical Perspective and Human Consequences of Africanized Bee Stings in the Americas. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* **2012**, *15*, 97–108, doi:10.1080/10937404.2012.645141.
8. Nogueira-neto, P. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*; Nogueirapis: São Paulo, 1997; Vol. 34; ISBN 8586525014.
9. Pedro, S.R.M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* **2014**, *61*, 348–354, doi:10.13102/sociobiology.v61i4.348-354.
10. Michener, C.D. *The bees of the world*; 2nd ed.; John Hopkins University Press: Baltimore, 2007; ISBN 0801885736.
11. Villas-Bôas, J. *Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão.*; Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN).: Brasília - DF, 2012; ISBN 978-85-63288-08-0.
12. Luz, C.F.P. Da; Fernandes-Salomão, T.M.; Lage, L.G.A.; Resende, H.C.; Tavares, M.G.; Campos, L.A.D.O. Pollen Sources for *Melipona capixaba* Moure & Camargo: An Endangered Brazilian Stingless Bee. *Psyche A J. Entomol.* **2011**, *2011*, 1–7, doi:10.1155/2011/107303.
13. Melo, G.A.R. Notes on the Nesting Biology of *Melipona Capixaba* (Hymenoptera, Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* **1996**, *69*, 207–210.
14. Moure, J.S.; Camargo, J.M.F. *Melipona* (*Michmelia*) *capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do Sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* **1994**, *11*, 289–296, doi:10.1590/S0101-81751994000200013.

15. Resende, H.C. Filogeografia e Conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae), Universidade Federal de Viçosa, 2012.
16. Silveira, F.A. da; Melo, G.A.R. de; Campos, L.A. de O.; Filho, P.O.J.M.; Pedro, S.R. de M. *Melipona* (*Michmelia*) *capixaba* Moure & Camargo, 1994. In *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.*; Brasília - DF: ICMBio/MMA, 2018; pp. 184–186.
17. Garbin, M.L.; Saiter, F.Z.; Carrijo, T.T.; Peixoto, A.L. Breve histórico e classificação da vegetação capixaba. *Rodriguésia* **2017**, *68*, 1883–1894, doi:10.1590/2175-7860201768521.
18. Espírito Santo *Diário Oficial. LEI Nº 11.077 de 27/11/2019*; Vitória, Brasil, 2019; pp. 9–11;.
19. de Arruda, V.A.S.; Pereira, A.A.S.; de Freitas, A.S.; Barth, O.M.; de Almeida-Muradian, L.B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *29*, 100–105, doi:10.1016/j.jfca.2012.11.004.
20. Denisow, B.; Denisow-Pietrzyk, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4303–4309, doi:10.1002/jsfa.7729.
21. Krell, R. Value-added products from beekeeping. *Fao Agric. Serv. Bull.* **1996**, *124*, 420.
22. Dabing, Zhang ; Jianxin, Shi; Xijia, Y. *Lipids in Plant and Algae Development*; Nakamura, Y., Li-Beisson, Y., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer International Publishing: Cham, 2016; Vol. 86; ISBN 978-3-319-25977-2.
23. Quilichini, T.D.; Grienenberger, E.; Douglas, C.J. The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry* **2015**, *113*, 170–182, doi:10.1016/j.phytochem.2014.05.002.
24. Zuluaga, C.M.; Serrato, J.C.; Quicazan, M.C. Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. *Chem. Eng. Trans.* **2015**, *43*, 175–180, doi:10.3303/CET1543030.
25. Ares, A.M.; Valverde, S.; Bernal, J.L.; Nozal, M.J.; Bernal, J. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 110–124, doi:10.1016/j.jpba.2017.08.009.
26. da Silva, G.R.; da Natividade, T.B.; Camara, C.A.; da Silva, E.M.S.; dos Santos, F. de A.R.; Silva, T.M.S. Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of *Janda* Stingless Bees (*Melipona subnitida*). *Food Nutr. Sci.* **2014**, *05*, 1015–1021, doi:10.4236/fns.2014.511112.
27. Zuluaga, C.M.; Serrato, J.C.; Quicazan, M.C. Bee-pollen structure modification by physical and biotechnological processing: influence on the availability of nutrients and bioactive compounds. *Chem. Eng. Trans.* **2015**, *43*, 79–84, doi:10.3303/CET1543014.
28. Carpes, S.T.; Begnini, R.; Alencar, S.M. de; Masson, M.L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia* **2007**, *31*, 1818–1825, doi:10.1590/S1413-70542007000600032.
29. Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory.

- Food Chem. Toxicol.* **2014**, *63*, 233–239, doi:10.1016/j.fct.2013.11.010.
30. Polański, M.; Okoń, K.; Przybyło, R.; Frasiak, W. Cardioprotective properties of hydrophilic pollen extract (HPE). *Pol. J. Pathol.* **1998**, *49*, 109–12.
 31. Furusawa, E.; Chou, S.C.; Hirazumi, A.; Melera, A. Antitumour potential of pollen extract on lewis lung carcinoma implanted intraperitoneally in syngeneic mice. *Phyther. Res.* **1995**, *9*, 255–259, doi:10.1002/ptr.2650090405.
 32. Kroyer, G.; Hegedus, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2001**, *2*, 171–174, doi:10.1016/S1466-8564(01)00039-X.
 33. Chantarudee, A.; Phuwapraisirisan, P.; Kimura, K.; Okuyama, M.; Mori, H.; Kimura, A.; Chanchao, C. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 45, doi:10.1186/1472-6882-12-45.
 34. Brasil Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001: Anexo v - regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pólen apícola. *Diário Of. da União* 2001, 18.
 35. Oliveira, D. de J.; Rodrigues dos Santos, D.; Andrade, B.R.; Nascimento, A.S. do; Oliveira da Silva, M.; da Cruz Mercês, C.; Lucas, C.I.S.; Cavalcante da Silva, S.M.P.; Dib de Carvalho, P.; Silva, F. de L.; et al. Botanical origin, microbiological quality and physicochemical composition of the *Melipona scutellaris* pot-pollen (“samburá”) from Bahia (Brazil) Region. *J. Apic. Res.* **2021**, *60*, 457–469, doi:10.1080/00218839.2020.1797271.
 36. FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*; Atheneu: São Paulo, 2008; ISBN 8573791217.
 37. RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E.A.G. *Química de alimentos*; 2nd ed.; Blucher: São Paulo, 2007; ISBN 9788521203667.
 38. Bárbara, M.S.; Machado, C.S.; Sodrê, G.D.S.; Dias, L.G.; Estevinho, L.M.; De Carvalho, C.A.L. Microbiological assessment, nutritional characterization and phenolic compounds of bee pollen from *Melipona mandacaia* Smith, 1983. *Molecules* **2015**, *20*, 12525–12544, doi:10.3390/molecules200712525.
 39. Simões, C.M.O.; Schenkel, João, P.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos. In *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*; Artmed: Porto Alegre, 2017; pp. 89–96 ISBN 9788582713594.
 40. Arruda, V.A.S. de Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, capacidade antioxidante e origem botânica, Universidade de São Paulo: São Paulo, 2013.
 41. Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 113–123, doi:10.1590/S0100-40422006000100021.
 42. Lopes, A.J.O.; Vasconcelos, C.C.; Garcia, J.B.S.; Pinheiro, M.S.D.; Pereira, F.A.N.; Camelo, D. de S.; Morais, S.V. de; Freitas, J.R.B.; Rocha, C.Q. da; Ribeiro, M.N. de S.; et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by *Scaptotrigona affinis postica*: in silico, in vitro, and in vivo Studies. *Antioxidants* **2020**, *9*, 103, doi:10.3390/antiox9020103.

43. CARPES, S.T. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian J. Food Technol.* **2009**, *12*, 220–229, doi:10.4260/bjft2009800900016.
44. Lopes, A.J.O.; Vasconcelos, C.C.; Pereira, F.A.N.; Silva, R.H.M.; Queiroz, P.F. dos S.; Fernandes, C.V.; Garcia, J.B.S.; Ramos, R.M.; Rocha, C.Q. da; Lima, S.T.D.J.R.M.; et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Pollen Extract Collected by Stingless Bee *Melipona fasciculata*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4512, doi:10.3390/ijms20184512.
45. Oliveira, R.G. de; Jain, S.; Freitas, L. dos S.; Araújo, E.D. de Phenolic compound, nutritional and antioxidant profile of pollen collected by the genus *Melipona* in North Eastern Brazil. *Brazilian J. Food Technol.* **2019**, *22*, doi:10.1590/1981-6723.07918.
46. Vit, P.; Santiago, B.; Pedro, S.; PerezPerez, E.; PenaVera, M. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. *Emirates J. Food Agric.* **2016**, *28*, 78, doi:10.9755/ejfa.2015-05-245.
47. Pérez-Pérez, E.; Sulbarán-Mora, M.; Barth, O.M.; Flavia Massaro, C.; Vit, P. Bioactivity and Botanical Origin of *Austroplebeia* and *Tetragonula* Australian Pot-Pollen. In *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 377–390.
48. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
49. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200, doi:10.1038/1811199a0.
50. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237, doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
51. Carpes, S.T.; Cabral, I.S.R.; Luz, C.F.P.; Capeletti, J.P.; Alencar, S.M.; Masson, M.L. Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. *J. Food, Agric. Environ.* **2009**, *7*, 667–673.
52. Dutra, R.P.; De Barros Abreu, B.V.; Cunha, M.S.; Batista, M.C.A.; Torres, L.M.B.; Nascimento, F.R.F.; Ribeiro, M.N.S.; Guerra, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2549–2557, doi:10.1021/jf404875v.
53. Silva, T.M.S.; Camara, C.A.; da Silva Lins, A.C.; Maria Barbosa-Filho, J.; da Silva, E.M.S.; Freitas, B.M.; de Assis Ribeiro dos Santos, F. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 507–511, doi:10.1016/j.jfca.2005.12.011.
54. Al-Hatamleh, M.A.I.; Boer, J.C.; Wilson, K.L.; Plebanski, M.; Mohamud, R.; Mustafa, M.Z. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. *Biomolecules* **2020**, *10*, 923, doi:10.3390/biom10060923.
55. Resende, H.C.; De Barros, F.; Campos, L.A.O.; Fernandes-Salomão, T.M. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. *Neotrop. Entomol.* **2008**, *37*, 609–611, doi:10.1590/S1519-566X2008000500019.

DISSERTAÇÃO EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Composição química e atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* do pólen de pote da abelha *Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)

Iana Soares Pessoa^a, Ariane Pinheiro Cruz Bergamini^a, Thiago Antonio de Sousa Cutrim^b, Victor da Rocha Fonseca^c, Denise Coutinho Endringer^a, Rodrigo Scherer^b, Wanderson Romão^c, Marcio Fronza^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, CEP 29102-920, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Cromatografia, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, CEP 29102-920, Brasil

^cLaboratório de Petrolômica e Forense, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Avenida Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Vitória, ES, CEP: 29075-910, Brasil

* *Autor correspondente*

Prof. Dr. Marcio Fronza

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Vila Velha, Vila Velha – Espírito Santo.

Av. Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, Vila Velha, ES, 29102-920, Brasil

E-mail: marcio.fronza@uvv.br

Telefone: +55 (27) 3421-2087.

RESUMO

Pessoa, Iana Soares, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2022. **Estudo do potencial bioativo do pólen de pote de *Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)**. Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza.

Este estudo teve como objetivo investigar a composição química e avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* do pólen de pote da abelha *Melipona capixaba*. Extratos do pólen de pote foram preparados empregando a maceração assistida por ultrassom utilizando como solvente uma mistura hidroetanólica à 70%. Os compostos bioativos foram identificados através de espectrometria de massas (ESI-FT-ICR MS). O conteúdo de flavonoides foi determinado por método espectrofotométrico após a reação com o cloreto de alumínio e o teor de fenólicos e taninos foi estimado pelo método do Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos químicos do sequestro do radical ABTS e DPPH. A citotoxicidade *in vitro* dos extratos de pólen de pote foi investigada em cultura de fibroblastos (L929), macrófagos (RAW 264.7) e melanoma (MV3) pelo método colorimétrico do MTT. A inibição da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e óxido nítrico (NO) e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 foram avaliadas em macrófagos estimulados por LPS. O teor médio de flavonoides, fenólicos totais e taninos foi de $10,74 \pm 1,21$ (g QE / 100g), $10,70 \pm 0,66$ (g GAE / 100g) e $8,91 \pm 0,88$ (g GAE / 100g), respectivamente. No total, foram identificados cinquenta compostos bioativos nos diferentes extratos de *M. capixaba*. Os menores valores de IC_{50} para atividade antioxidante obtido no ABTS foi de $13,68 \pm 2,52$ μ g/mL e no DPPH de $40,27 \pm 11,53$ μ g/mL. Redução significativa na produção de $O_2^{\cdot-}$, IL-6 e TNF- α foi observado na concentração de 20 μ g/mL. Os resultados apresentaram, pela primeira vez, elucidações sobre a composição química e potenciais atividades antioxidante e anti-inflamatória do pólen de pote de *M. capixaba*.

Palavras-chaves: abelha sem ferrão, pólen de pote, antioxidante, anti-inflamatório.

1 INTRODUÇÃO

As propriedades biológicas e medicinais dos produtos apícolas como mel, própolis e pólen são vastamente pesquisadas, porém as propriedades dos produtos das abelhas sem ferrão (meliponíneas) são pouco conhecidas [1]. Os produtos das abelhas melíferas sem ferrão podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos, já que as regiões tropicais e subtropicais, locais onde se encontram a maioria das espécies de meliponíneos, tem uma abundante e diversificada vegetação [2]. Em especial o pólen das abelhas sem ferrão, conhecido como “Pólen de Pote”, apresenta grande variação em sua composição química, nutritiva e bioativa [3]. Fatores como espécie floral, região, altitude e estação, influenciam diretamente na composição dos compostos secundários presentes nas plantas [4–7].

Uma característica relevante que diferencia o pólen de abelha sem ferrão do pólen floral é que ele passa por processos enzimáticos e de fermentação dentro de potes de cerume no interior da colmeia [8]. A fermentação láctica aumenta a acidez desse pólen, elevando significativamente sua conservação, bem como facilita o rompimento da exina, camada externa do pólen que limita o acesso aos compostos em seu interior, aumentando a diversidade de nutrientes e componentes bioativos [9].

Os compostos fenólicos comumente encontrados nos pólenes de abelhas sem ferrão são rutina, ácido hidroxicinâmico e ácido elágico [10–12]. Resultados promissores de fenólicos totais e atividade antioxidante foram encontrados em estudos realizados com o pólen de pote do Gênero *Melipona* [3,13]. Devido a atividade antioxidante e imunomoduladora, os compostos fenólicos têm sido propostos como compostos para terapia anti-inflamatória uma vez que o estresse oxidativo é considerado um modulador do processo inflamatório [1,3,14].

O Brasil abriga a maior variedade de abelhas melíferas sem ferrão, foram identificadas 244 espécies no país, sendo dessas 87 endêmicas [15,16]. *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) é uma espécie de abelha sem ferrão endêmica do estado do Espírito Santo, Brasil, restrita a áreas com temperatura média anual de 18°C à 23°C e altitude de 800m – 1200m e classificada como Em Perigo (EN) na lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção [17,18]. Análises palinológicas feitas por Luz *et al.* [19] no pólen de pote de *M.*

capixaba encontraram 33 tipos diferentes de pólen e identificaram 23 gêneros e 15 famílias de espécies botânicas.

A atividade biológica e a caracterização química do pólen de pote das Meliponas ainda requerem elucidação. Pesquisas anteriores demonstraram atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* em pólenes de meliponíneos [3,13]. Entretanto até o presente estudo não há trabalhos científicos na literatura sobre a atividade biológica e composição química do pólen de pote da espécie *Melipona capixaba*.

Neste contexto, pela primeira vez, este estudo teve como objetivo investigar a composição química e avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* do pólen de pote da abelha *Melipona capixaba* provenientes de diferentes locais e altitudes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação do pólen

As amostras de pólen de pote da abelha *Melipona capixaba* foram coletadas em três locais de ocorrência da espécie entre dezembro de 2020 e janeiro de 2021 em meliponários de associados da AME-ES (Associação dos Meliponicultores do Espírito Santo). A altitude e as coordenadas geográficas foram verificadas através do software Google Earth (Google Inc.), os três meliponários estavam localizados em áreas rurais nos municípios de Santa Maria de Jetibá à 470 m de altitude (denominado pólen P1), Domingos Martins à 930m (denominado pólen P2) e Divino de São Lourenço à 1.180 m (denominado pólen P3), coordenadas: (20°02'52''S 40°36'56''W), (20°20'49.1''S 40°50'43.5''W) e (20°35'02''S 41°46'22''W), respectivamente. As amostras foram retiradas diretamente dos potes das colmeias através de espatulação com material estéril, acondicionadas em tubos de polipropileno, identificadas e armazenadas sob proteção da luz, acondicionadas em caixa térmica refrigerada durante o transporte e imediatamente levadas ao laboratório de produtos naturais e cultura de células da Universidade Vila Velha - ES para congelamento em freezer, onde foram mantidas à temperatura de -20°C até a obtenção dos extratos.

2.2 Obtenção dos extratos hidroetanólicos

As amostras de pólen de pote (P1, P2 e P3, respectivamente) foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas e, em seguida

submetidas ao processo de extração por maceração assistida por ultrassom empregando etanol 70% em proporção de 1:5 de (m/v) [11]. Após a extração o material foi filtrado, rotaevaporado, liofilizado e armazenado sob proteção da luz em freezer a -20°C até o uso.

2.3 Determinação do rendimento

O rendimento do extrato hidroetanólico da biomassa de cada pólen de pote de *M. capixaba* foi calculado com base na matéria seca de acordo com EMBRAPA [20] adaptado. Essa equação é largamente aplicada na determinação do rendimento, sendo o valor calculado expresso em porcentagem (g de biomassa liofilizada / g de biomassa úmida x 100).

2.4 Determinação de flavonoides, fenólicos totais e taninos

O conteúdo total de flavonoides foi determinado por método espectrofotométrico após a reação com o cloreto de alumínio (10% p/v), conforme [21,22]. A quantificação foi feita a partir da construção de uma curva padrão de quercetina (100 - 800 µg/mL) e determinada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra MAX 190) a 415 nm. O teor de flavonoides totais dos extratos dos pólenes de pote foi expresso em g equivalente de quercetina (QE)/100g de extrato seco. Os experimentos foram realizados em triplicata em dias diferentes.

A quantificação de fenólicos totais e taninos foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Krepsky [23]. Para a determinação de fenólicos totais foi preparada uma curva analítica com ácido gálico (6,2 - 70 µg/mL). Os teores de fenólicos totais e taninos foram determinados através da leitura das absorbâncias realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra MAX 190) a 715 nm. O teor de taninos foi estimado pela diferença entre o teor de fenólicos totais e não fenólicos nos extratos, baseado na precipitação de polivinilpirrolidona (PVPP). O teor de fenólicos totais e taninos dos extratos dos pólenes de pote foi expresso em g equivalentes de ácido gálico (GAE)/100g de extrato bruto. Os experimentos foram realizados em triplicata em dias diferentes.

2.5 Espectrometria de Massas (ESI-FT-ICR MS)

As amostras foram dissolvidas em 1 mL de metanol (MeOH) e analisadas por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS). Foi utilizado o espectrômetro FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros foram obtidos no modo negativo, ESI (-), em uma faixa de massa m/z 150-1500. As condições da fonte de ESI foram: pressão de gás nebulizador de 1,5 Bar, voltagem capilar de 4,0 – 4,4 kV, e a temperatura de transferência capilar de 200° C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0,010 – 0,030 s. O tempo de voo foi de 0.950s. Cada espectro foi adquirido pela acumulação de 16 varreduras (scans). Todos os espectros de massa foram calibrados externamente usando Arginina (m/z de 150 a 1500). Os espectros foram obtidos com alta resolução (4 M) e erros de massas menores do que 10 ppm, fornecendo fórmulas moleculares inequívocas para os íons moleculares de carga única. Todos os espectros de massa foram calibrados externamente usando arginina (m/z de 150 a 1500). Os espectros de massa foram processados usando o software Data Analysis (Bruker Dantonics, Bremen, Alemanha) [24] sendo propostas estruturas químicas considerando a relação massa-carga (m/z) e equivalentes de dupla ligação (DBEs).

As fórmulas estruturais dos compostos foram obtidas pelo software chemspider database [25] e comparadas com compostos frequentemente descritos na literatura científica para produtos de abelha.

2.6 Atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante dos pólenes de pote de *M. capixaba* (P1,P2 e P3) foi determinada pela capacidade de sequestrar os radicais orgânicos ABTS+ 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazol-6-sulfonato) e DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil [26,27]. A atividade antioxidante dos extratos foi comparada com a ação da quercetina. Os resultados foram expressos em IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), que representa a concentração necessária de amostra para redução de 50% dos radicais livres. Os experimentos foram executados em triplicata em dias diferentes.

2.7 Estudos da atividade citotóxica *in vitro*

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico do MTT [28]. Neste estudo foram empregadas culturas de células de fibroblastos (L929), macrófagos (RAW 264.7) e melanoma (MV3). As culturas foram incubadas com

diferentes concentrações (10 – 150 µg/mL) dos extratos hidroetanólicos dos pólenes de pote P1, P2 e P3 de *M. capixaba* por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período a cultura foi incubada com o MTT por 2 horas e em seguida foi adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), para a dissolução dos cristais de formazana a placa foi colocada em agitador orbital até obtenção de coloração homogênea. A leitura da absorbância da reação foi feita em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra MAX 190) a 595 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade e as análises foram feitas em triplicatas, em dias diferentes.

2.8 Redução da produção do ânion superóxido (O₂^{•-})

O potencial efeito inibitório dos extratos dos pólenes P1, P2 e P3 de *M. capixaba* sobre a produção da espécie reativa de oxigênio ânion superóxido (O₂^{•-}) foi avaliado pelo ensaio do superóxido [29–31]. Macrófagos (RAW 264.7) foram cultivados em placas de 96 poços e pré-tratados com concentrações crescentes (1, 5, 10 e 20 µg/mL) dos extratos dos pólenes de pote e estimulados com LPS na concentração de 1 µg/mL. Empregou-se como controle positivo o Tempol, um antioxidante permeável às células que atua como inibidor de superóxido. Após incubação por 20 h (5% de CO₂ a 37°C) o sobrenadante foi removido e adicionado cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL) e incubados por 2 h. Após, as células foram lavadas com metanol, secas e então os cristais de formazana formados foram dissolvidos em KOH (2 M) e DMSO, a absorbância foi quantificada em espectrofotômetro a 630 nm (Molecular Devices Spectra MAX 190). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da produção de ânion superóxido.

2.9 Determinação de óxido nítrico *in vitro*

O óxido nítrico (NO) está presente em processos inflamatórios do sistema imunológico. A quantificação de NO foi realizada pela determinação da influência sobre a produção de nitrito em cultura de macrófagos (RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeos (LPS). As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços e incubadas até atingirem 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (1, 5, 10 e 20 µg/mL) dos extratos dos pólenes de pote de *M. capixaba* (P1, P2 e P3) por 60 min antes da adição de LPS (1 µg/mL). Empregou-se como controle positivo o L-NIL, um conhecido inibidor seletivo da sintase de NO

induzível. Decorridas 24h, o sobrenadante celular foi utilizado para a quantificação de nitrito pelo reagente de Griess e a concentração de nitrito calculada por regressão linear utilizando-se uma solução padrão de nitrito de sódio [32]. A leitura da absorbância da reação para a quantificação de nitrito foi feita em espectrofotômetro a 540 nm (Molecular Devices Spectra MAX 190).

2.10 Determinação de citocinas *in vitro*

Macrófagos (RAW 264.7) foram cultivados em placas para cultura de células de 96 poços e incubados até atingirem 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (1 – 20 µg/mL) dos extratos dos pólenes de pote de *M. capixaba* (P1, P2 e P3) 60 min antes da adição de lipopolissacarídeos (LPS) (1 µg/mL). Decorridas 24 h, o sobrenadante celular foi utilizado para quantificação das citocinas interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”). Para tal, as citocinas foram detectadas através de anticorpos de captura, e anticorpos biotinizados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com instruções do fabricante (eBioscience[®]). Como substrato foi utilizado o-Phenylenediamine (OPD) ou tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada adicionando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M) aos poços. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra MAX 190) a 420 nm. A concentração de cada citocina para cada amostra foi determinada pela equação da reta comparando-se as absorbâncias das concentrações conhecidas da curva padrão para cada citocina com as absorbâncias obtidas nas amostras.

2.11 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism[®] 5.0. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a significância da diferença entre as médias determinada por teste *post-hoc*, método de Tukey, ajustado para múltiplas comparações e com significância aceita quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Determinação do rendimento dos extratos hidroetanólicos

O rendimento médio obtido para os extratos hidroetanólicos da biomassa do pólen de pote de *M. capixaba* foi de 11,5%. Conforme apresentado na Tabela 1, o maior rendimento alcançado foi de 13,8% (amostra P1) e o menor foi de 8,8% (amostra P2).

Tabela 1. Rendimento do processo de obtenção dos extratos hidroetanólicos dos pólenes de pote P1, P2 e P3 de *M. capixaba*

Pólenes	Localidade (altitude)	Rendimento (%)*
P1	Santa Maria de Jetibá (470 m)	13,76%
P2	Domingos Martins (930 m)	8,8%
P3	Divino de São Lourenço (1.180 m)	11,9%

*Calculado com base na matéria seca (g de biomassa liofilizada / g de biomassa úmida x 100)

3.2 Determinação de flavonoides, fenólicos totais e taninos

As análises quantitativas das principais classes de metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos (P1, P2 e P3) dos pólenes de pote de *M. capixaba* estão demonstradas na Tabela 2. Diferenças significativas foram encontradas entre as três amostras para todos os itens quantificados, isto é, flavonoides, fenólicos e taninos totais, sempre tendo a amostra P3 com as maiores concentrações e a P1 com as menores. As maiores concentrações médias obtidas foram $10,74 \pm 1,21$ (g QE / 100g) para flavonoides, $10,70 \pm 0,66$ (g GAE / 100g) para fenólicos e $8,91 \pm 0,88$ (g GAE / 100g) para taninos totais.

Tabela 2. Quantificação de flavonoides, fenólicos e taninos totais nos extratos hidroetanólicos dos pólenes de pote P1, P2 e P3 de *M. capixaba*.

Pólenes	Flavonoides (g QE/100 g) [#]	Fenólicos (g GAE/100 g)*	Taninos (g GAE/100g)*
P1	$2,58 \pm 0,37$ ^c	$4,09 \pm 0,27$ ^c	$2,98 \pm 0,46$ ^c
P2	$6,17 \pm 0,14$ ^b	$6,90 \pm 0,41$ ^b	$4,89 \pm 0,81$ ^b
P3	$10,74 \pm 1,21$ ^a	$10,70 \pm 0,66$ ^a	$8,91 \pm 0,88$ ^a

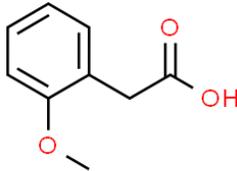
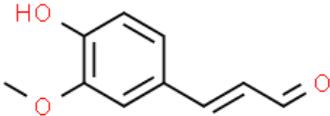
[#]Teor de flavonóides totais expresso em g equivalente de quercetina (g QE) / 100g de extrato em peso seco. *Teores de fenólicos e taninos totais expressos em g equivalente de ácido gálico (g GAE) / 100g de extrato seco. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

3. 3 Espectrometria de Massas (ESI-FT-ICR MS)

Considerando a alta resolução e precisão de ESI(-)FT-ICR MS, bem como o baixo erro de massa (≤ 10 ppm), valores de m/z (relação massa sobre carga) e equivalentes de dupla ligação (DBEs), foram propostos 50 compostos que frequentemente são encontrados em produtos de abelha sem ferrão, tais como, própolis e pólen (vide descrição e referências tabela 3).

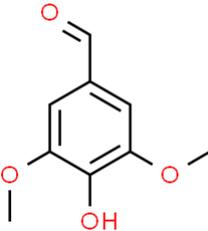
Foram observados representantes da classe dos flavonoides constituídos de hidroxilas ligadas ao núcleo fundamental tricíclico, cuja estrutura apresenta-se conjugada com açúcares (heterosídeos) ou não (aglicona). Estas substâncias observadas para os pólenes P1, P2 e P3 foram encontradas por outros autores nas suas amostras de pólen (Tabela 3) e os compostos bioativos mais frequentemente detectados são kaempferol, isorhamnetim e quercetina.

Tabela 3. Espécies químicas propostas a partir de dados ESI(-)FT-ICR MS para os extratos hidroetanólicos dos pólenes P1, P2 e P3 de *Melipona capixaba*.

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continua)									
1	165.05577	C ₉ H ₉ O ₃	5	-0,31	 2-Methoxyphenyl acetic acid	ND	D	ND	[25] [33]
2	177.05439	C ₁₀ H ₉ O ₃	6	-4,41	 Coniferaldehyde	ND	ND	D	[25] [33]

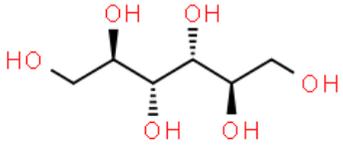
(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência

(Continuação)

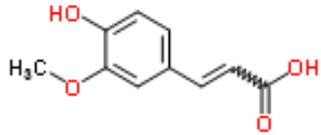
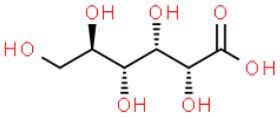
3	181.05066	C ₉ H ₉ O ₄	5	-0,17		ND	D	ND	[25] [33]
---	-----------	--	---	-------	---	----	---	----	--------------

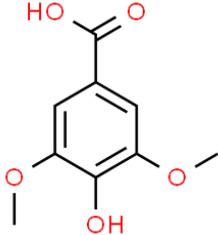
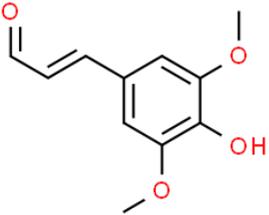
Syringaldehyde

C₆H₁₃O₆

4	181.07181		0	-0,91		D	D	D	[25] [34]
---	-----------	--	---	-------	---	---	---	---	--------------

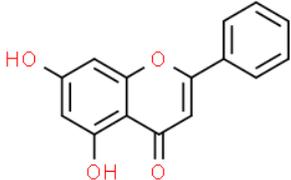
Mannitol

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
5	193.04973	C ₁₀ H ₉ O ₄	6	9,44	 <p>Ferulic acid</p>	D	D	D	[25] [3] [35]
6	195.05105	C ₆ H ₁₁ O ₇	1	-0,37	 <p>Gluconic acid</p>	D	D	D	[25] [13] [11]

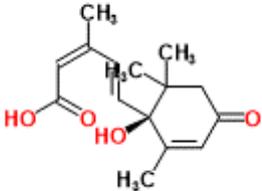
(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
7	197.04563	C ₉ H ₉ O ₅	5	2,67	 <p>Syringic acid</p>	D	D	ND	[25] [33]
8	207.06619	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	6	3,88	 <p>Sinapaldehyde</p>	D	D	D	[25] [33]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência

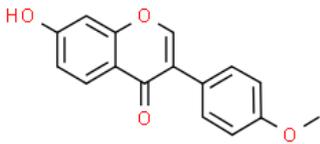
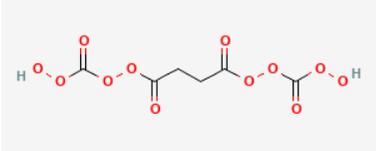
(Continuação)

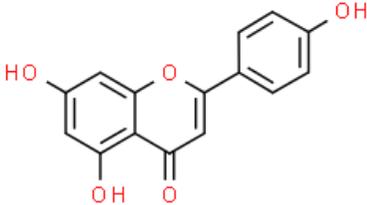
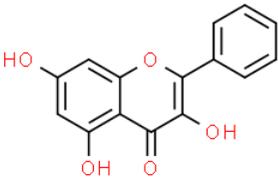
9	253.04847	C ₁₅ H ₉ O ₄	11	2,38		D	ND	ND	[25] [33] [36]
---	-----------	---	----	------	---	---	----	----	----------------------

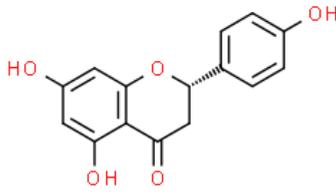
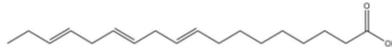
Chrysin

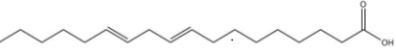
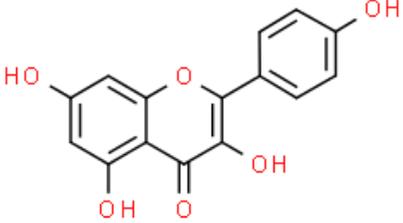
10	263,1280	C ₁₅ H ₁₉ O ₄	4	-9,30		D	ND	D	[25] [3]
----	----------	--	---	-------	---	---	----	---	-------------

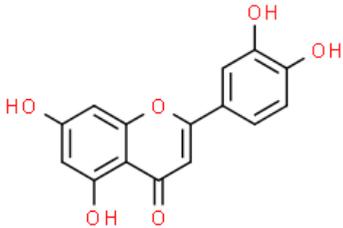
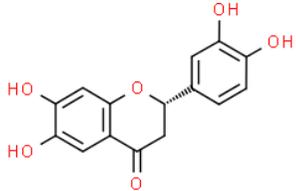
Abscisic acid

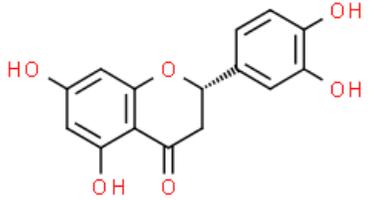
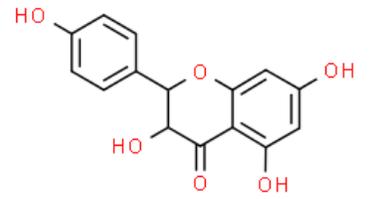
(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
11	267.264	C ₁₆ H ₁₁ O ₄	10	4,43	 <p>Formononetin</p>	D	ND	ND	[25] [36]
12	268.97588	C ₆ H ₅ O ₁₂	4	10.29	 <p>Dicarbonoperoxoil butanediperoxoate</p>	D	D	D	[37]

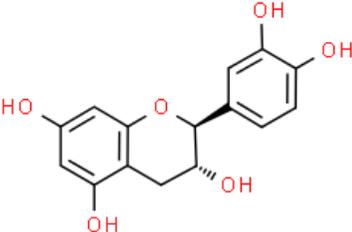
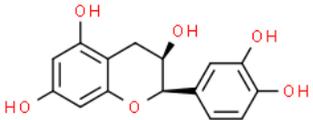
(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
13	269.0455	C ₁₅ H ₉ O ₅	11	9,69	 <p style="text-align: center;">Apigenin</p>	D	D	D	[25] [3] [33] [35]
14	269.0455	C ₁₅ H ₉ O ₅	11	9,69	 <p style="text-align: center;">Galangin</p>	D	D	D	[25] [33]

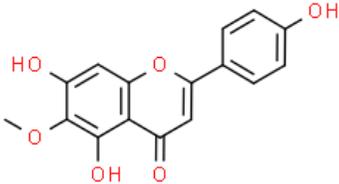
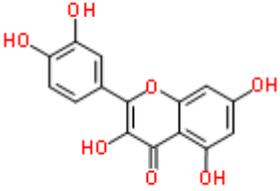
(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
15	271,0612	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	11	-0,27	 <p>Naringenin</p>	ND	D	ND	[25] [38] [33] [39]
16	277.21742	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	4	-0,55	 <p>Linolenic acid</p>	ND	D	D	[25] [13]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
17	279.23306	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	3	-7,48	 Linoleic acid	D	D	D	[25] [13]
18	285.04051	C ₁₅ H ₉ O ₆	11	-0,40	 Kaempferol	D	D	D	[25] [3] [33] [35] [13] [11]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
19	285.04051	C ₁₅ H ₉ O ₆	11	-0,40	 <p style="text-align: center;">Luteolin</p>	D	D	D	[25] [3] [34]
20	287.05611	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	10	-6,24	 <p style="text-align: center;">(2S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one Plathymenin</p>	D	D	D	[25] [36]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
21	287.05611	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	10	-6,24		D	D	D	[25] [38] [33]
					Eriodictyol				
22	287.05611	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	10	-6,24		D	D	D	[25] [33]
					Aromadendrin				

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
23	289.06978	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	9	6,84		D	D	D	[25] [33]
					Catechin				
24	289.06978	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	9	6,84		D	D	D	[25] [33]
					(-)-Epicatechin				

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
25	299.05618	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	11	-0,38	 <p>Hispidulin</p>	ND	D	D	[25] [33]
26	301.03569	C ₁₅ H ₉ O ₇	11	7,31	 <p>Quercetin</p>	D	D	D	[25] [33] [40] [34] [12]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência

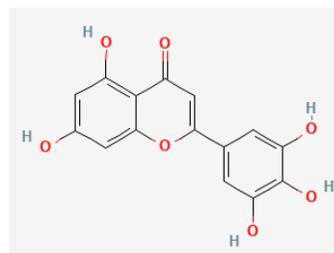
(Continuação)

27 301.03569

C₁₅H₉O₇

11

7,31



Tricetin

D D D

[34]

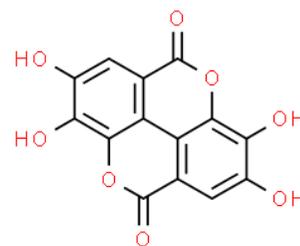
[25]

28 300,99926

C₁₄H₅O₈

12

9,53



Ellagic acid

D D ND

[33]

[40]

[13]

[11]

(3)* Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
------------	-------------	-----------------------------------	-----	---------------	-------------------	----	----	----	------------

(Continuação)

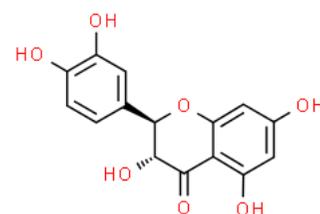
29

303.05118

C₁₅H₁₁O₇

10

-0,50



D

D

D

[25]

[33]

Taxifolin

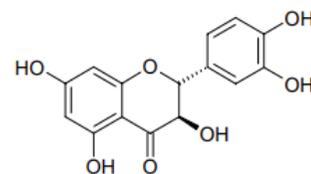
30

303.05118

C₁₅H₁₁O₇

10

-0,50



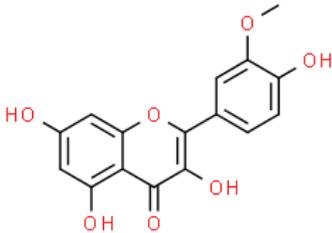
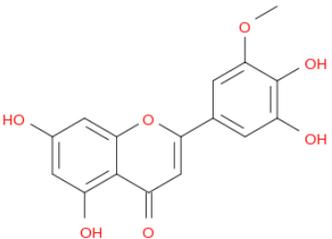
D

D

D

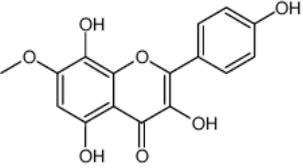
[34]

dihydroquercetin

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
31	315.05126	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	11	-0,37	 <p>Isorhamnetin</p>	D	D	D	[25] [39] [35] [34]
32	315.05126	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	11	-0,37	 <p>Selagin</p>	D	D	D	[39]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência

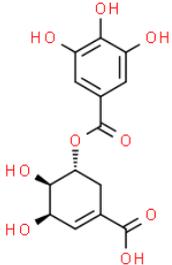
(Continuação)

33	315.05126	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	11	-0,37	 <p>Methoxyherbacetin</p>	D	D	D	[39]
----	-----------	--	----	-------	--	---	---	---	------

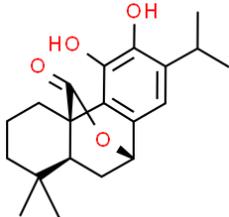
34	317.03032	C ₁₅ H ₉ O ₈	11	-0,35	Miricetrin	D	D	D	[33]
----	-----------	---	----	-------	------------	---	---	---	------

(3)* Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
------------	-------------	-----------------------------------	-----	---------------	-------------------	----	----	----	------------

(Continuação)

35	325.0593	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	8	-8,60		D	D	D	[25]
----	----------	--	---	-------	---	---	---	---	------

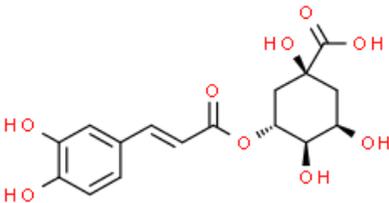
5-galloylshikimic acid

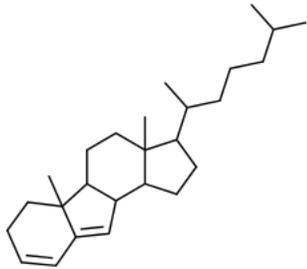
36	329,17604	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	8	8,48		D	D	ND	[25] [33]
----	-----------	--	---	------	---	---	---	----	--------------

Carnosol

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência

(Continuação)

37	353.08788	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8	-6,55	 <p>Chlorogenic acid</p>	D	D	D	[25] [3] [33]
----	-----------	--	---	-------	--	---	---	---	---------------------

38	353.32092	C ₂₆ H ₄₁	6	7.89	 <p>3a,5b-Dimethyl-3-(6-methyl-2-heptanyl)- 1,2,3,3a,4,5,5a,5b,6,7,10a,10b-dodecahydrocyclopenta[a]fluorene</p>	D	D	D	[39]
----	-----------	---------------------------------	---	------	---	---	---	---	------

(3)* Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
------------	-------------	-----------------------------------	-----	---------------	-------------------	----	----	----	------------

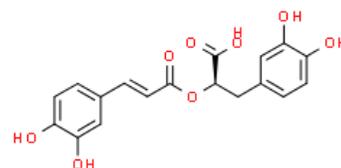
(Continuação)

39 359.07581

C₁₈H₁₅O₈

11

4,82



(R)-(+)-rosmarinic acid

ND D D

[25]

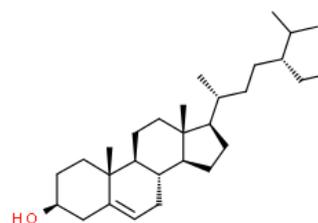
[33]

40 413.37882

C₂₉H₄₉O

5

-6,17

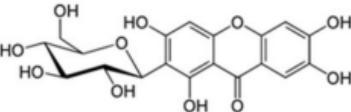
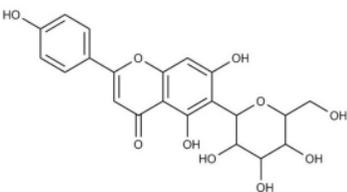


Sitosterol

D D ND

[25]

[39]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
41	421.084900	C ₁₉ H ₁₇ O ₁₁	11	-8,18	 <p>Mangiferin</p>	D	D	ND	[25] [38]
42	431.09859	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	12	-1,67	 <p>Apigenin-6-C-glucoside</p>	D	D	D	[11]

(3)* Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
------------	-------------	-----------------------------------	-----	---------------	-------------------	----	----	----	------------

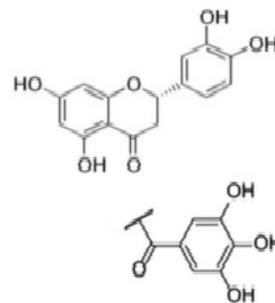
(Continuação)

43 439.0639

C₂₂H₁₅O₁₀

15

7,22



Galloyl eriodictyol

D D D

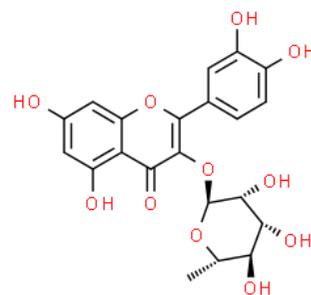
[38]

44 447.09331

C₂₁H₁₉O₁₁

12

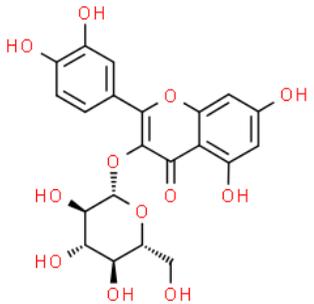
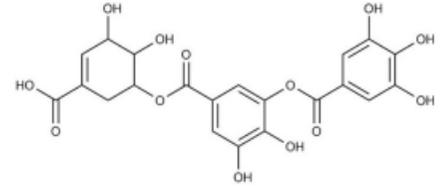
6,51

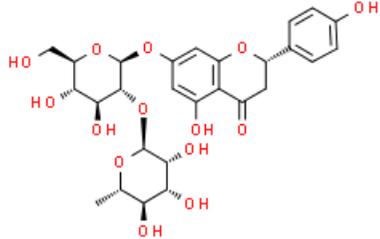


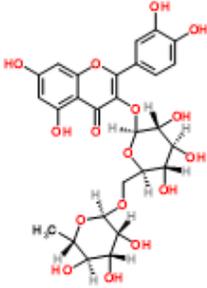
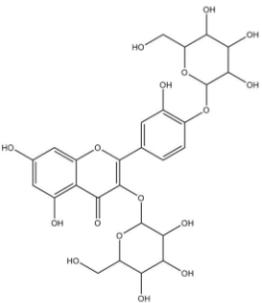
Quercitrin

D D D

[25]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
45	463.08836	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12	-0,69	 <p>Isoquercetin</p>	D	D	D	[25] [33]
46	477.07226	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	13	-10,05	 <p>digalloylshikimic acid</p>	D	D	D	[11]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
(Continuação)									
47	579.16647	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	12	9,43	 <p style="text-align: center;">Naringin</p>	D	D	D	[25] [3] [33]
48	603.00535	C ₂₈ H ₁₁ O ₁₆	23	0,78	Ellagic acid dimer	D	D	ND	[13]

(3)*									
Nº	M/Z (exper)	Fórmulas Moleculares [M-H]-	DBE	Erro (ppm)	Composto proposto	P1	P2	P3	Referência
49	609.1478	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	13	-5,30	 <p>Rutin</p>	D	D	D	(Conclusão) [25] [3] [33] [12]
50	625.1412	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	13	-0,82	 <p>Quercetin 3,4'-diglucoside</p>	D	D	D	[13] [11] [12]

* M/Z (Relação massa sobre carga); DBE Número de insaturações e anéis (Double Bound Equivalente); ppm (partes por milhão); ND (Não Detectado); D (Detectado).

A exemplo de fragmentação de massa temos a perda de 162 unidades de massa atômica (AMU) que se refere a fração de açúcar que é comum em polifenóis C-glicosilados (Figura 2). Também alguns polifenóis possuem o grupo galoil devido a detecção de uma perda neutra de 152 AMU na fragmentação de massa dos compostos. Porém, a configuração e a posição de ligação de alguns grupos (ex. galoil) não pode ser distinguida por ESI(-)FT-ICR MS.

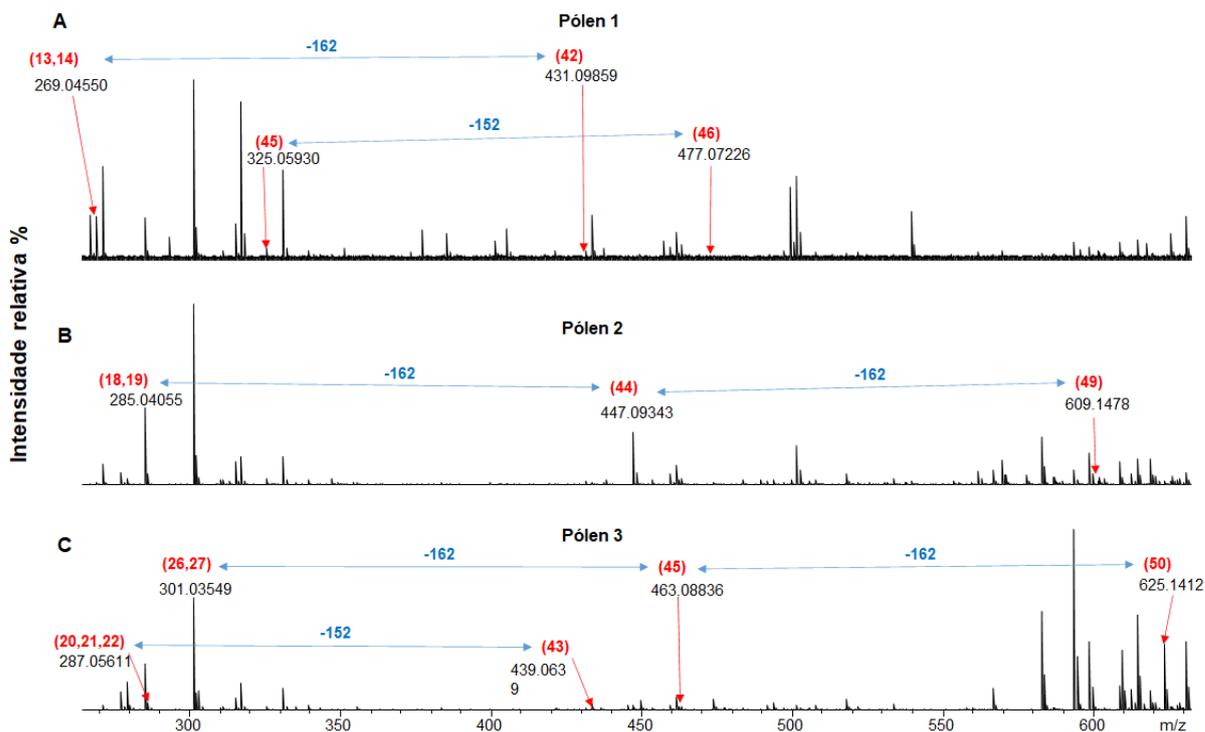


Figura 3. Espectros de massa dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1 (Figura 2A), P2 (Figura 2B) e P3 (Figura 2C) de *Melipona capixaba* obtidos por ESI(-)FT-ICR MS. Em vermelho estão os compostos cujos números correspondem ao descrito na Tabela 3. Em azul estão destacadas exemplos de fragmentações de massa com perdas de 152 e 162 unidades de massa atômica (AMU).

3. 4 Atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante dos extratos P1, P2 e P3 de *M. capixaba* foi estimada utilizando-se métodos químicos de sequestro dos radicais livres ABTS e DPPH. Das três amostras, a maior atividade antioxidante foi observada com a amostra P3, seguido por P2 e P1, em ambos os testes. Os três pólenes apresentaram diferenças significativas entre si na inibição do DPPH. Os menores valores de IC₅₀ foram observados com o pólen P3 tanto no teste do ABTS com valor de 13,68 ± 2,52 µg/mL como no teste do DPPH com valor de 40,27 ± 11,53 µg/mL (Tabela 4).

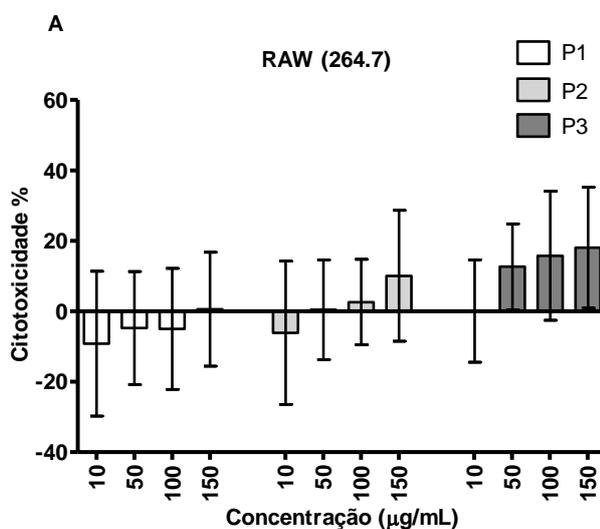
Tabela 4. Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos dos pólenes de pote P1, P2 e P3 de *Melipona capixaba*.

Atividade antioxidante (IC ₅₀ µg/mL)		
Pólenes de pote	ABTS*	DPPH*
P1	29,98 ± 0,29 ^a	94,99 ± 3,03 ^a
P2	29,03 ± 9,85 ^a	62,45 ± 6,99 ^b
P3	13,68 ± 2,52 ^b	40,27 ± 11,53 ^c
Quercetina	6,90 ± 1,16 ^b	5,89 ± 2,08 ^d

*Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre as amostras (p<0,05).

3. 5 Viabilidade Celular

Os efeitos dos extratos P1, P2 e P3 de *M. capixaba* sobre a viabilidade celular foram avaliados utilizando-se as linhagens de fibroblastos (L929), macrófagos (RAW 264.7) e melanoma (MV3). Nas concentrações de 10 a 150 µg/mL nenhum extrato apresentou citotoxicidade para as linhagens RAW 264.7 e MV3 (Figuras 3A e 3B). Para a linhagem L929 os extratos P2 e P3 apresentaram citotoxicidade a partir de 50 µg/mL e, o extrato P1 apresentou citotoxicidade em 150 µg/mL (Figura 3C). Desta forma os experimentos de atividade anti-inflamatória subsequentes foram realizados considerando concentrações que não apresentaram citotoxicidade.



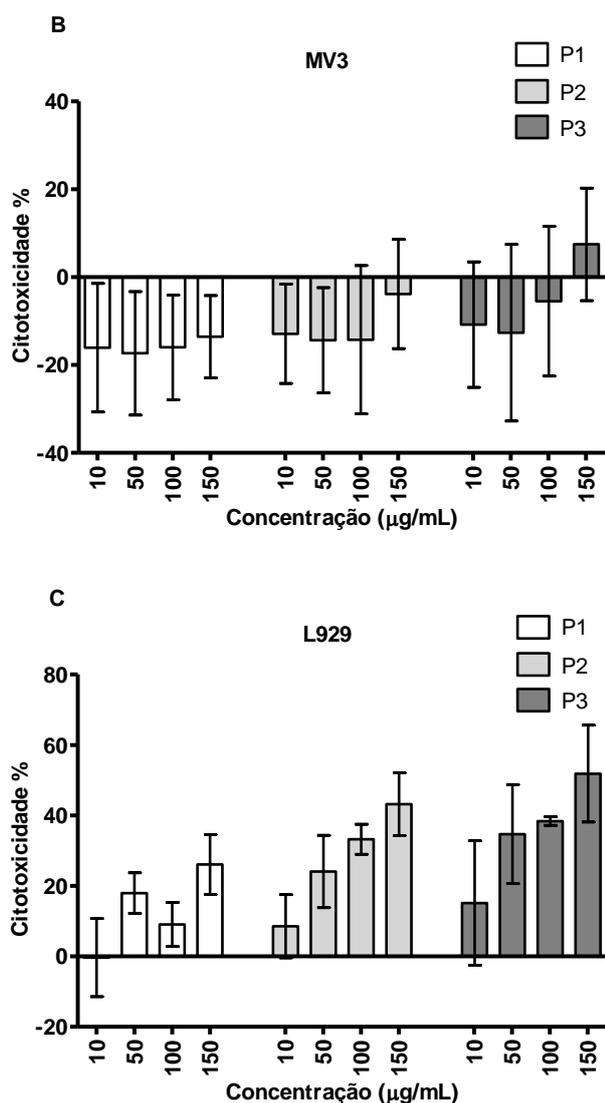


Figura 4. Efeitos citotóxicos dos extratos hidroetanólicos P1, P2 e P3 de *M. capixaba* nas linhagens de macrófagos (RAW 264.7) Figura 3A, melanoma (MV3) Figura 3B e fibroblastos (L929) Figura 3C.

3. 6 Redução da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Na análise intracelular da inibição da produção do ânion superóxido produzido por macrófagos (RAW 267.2) estimulados por LPS, após tratamento com os extratos dos pólenes de *M. capixaba* P1, P2 e P3, observou-se que as amostras tiveram efeito redutor na produção do ânion superóxido nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL para o P1 e nas concentrações de 10 e 20 µg/mL para os pólenes P2 e P3 (Figura 4).

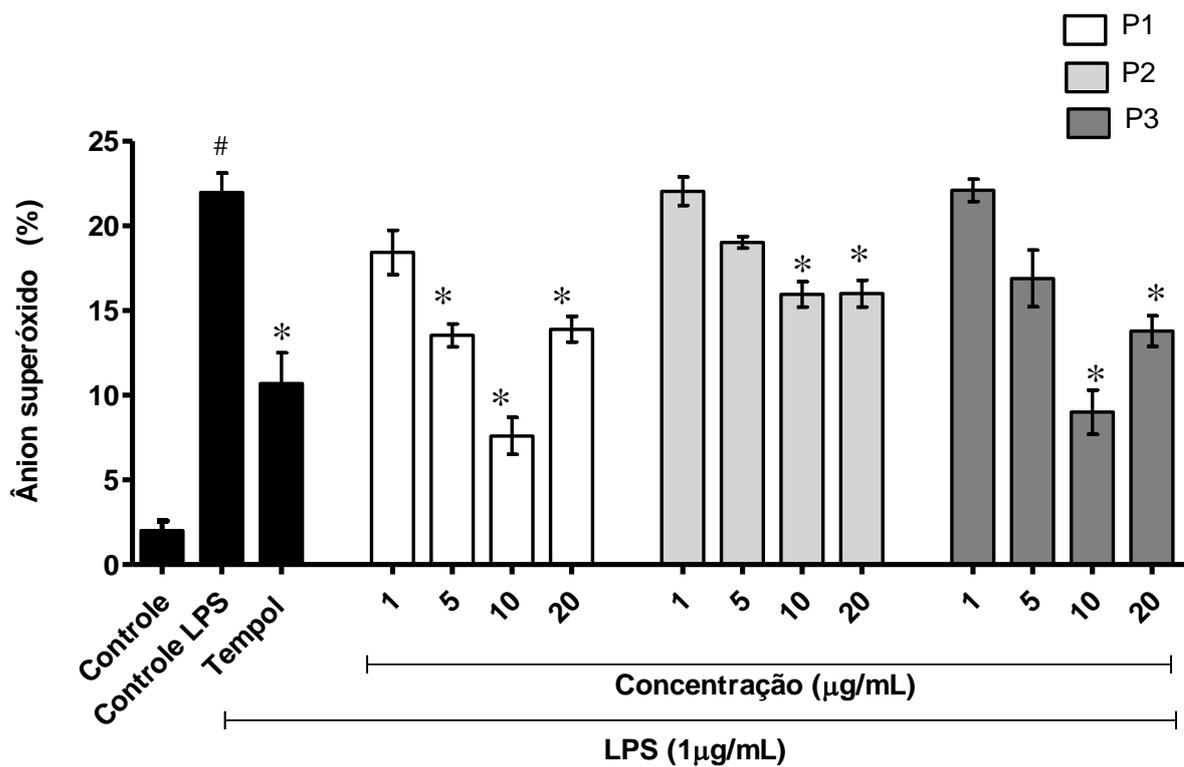


Figura 5. Efeito dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1, P2 e P3 de *M. capixaba* na produção do ânion superóxido. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. #Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle negativo (basal). *Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle + LPS.

3. 7 Determinação de óxido nítrico *in vitro*

Os extratos P1, P2 e P3 de *M. capixaba* não apresentaram efeitos significativos sobre a produção de NO nas concentrações testadas conforme figura 5.

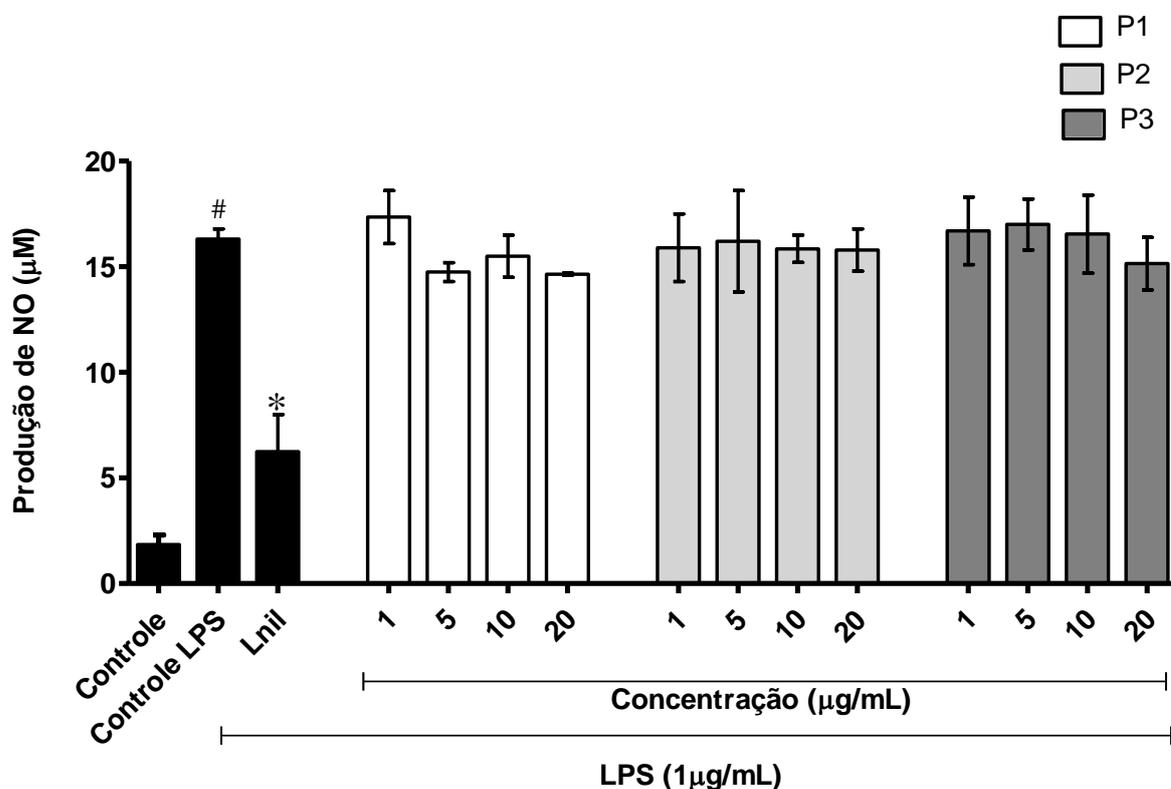


Figura 6. Efeito dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1, P2 e P3 de *M. capixaba* na produção de óxido nítrico *in vitro* em cultura de macrófagos estimulados com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. #Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle negativo (basal). *Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle + LPS.

3. 8 Determinação de citocinas *in vitro*

A produção de IL-6 e TNF- α foi avaliada em macrófagos induzidos por LPS e tratados com os extratos P1, P2 e P3 de *M. Capixaba* em diferentes concentrações. Reduções significativas na produção de IL6 foram observadas após tratamento com as concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ de P2 ($207,3 \pm 69,6 \text{ pg/mL}$), e 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de P3 ($272,9 \pm 69,6$ e $234,6 \pm 15,5 \text{ pg/mL}$, respectivamente) (Figura 6A).

O extrato P3 apresentou maior efeito inibitório de TNF- α ($1682 \pm 387 \text{ pg/mL}$) na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ em comparação à concentração de TNF- α produzida pelo controle LPS ($3330 \pm 583 \text{ pg/mL}$). Diferenças significativas foram encontradas após

tratamento com o P1 a 20 $\mu\text{g/mL}$, e nas concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de P2 e P3, respectivamente (Figura 6B).

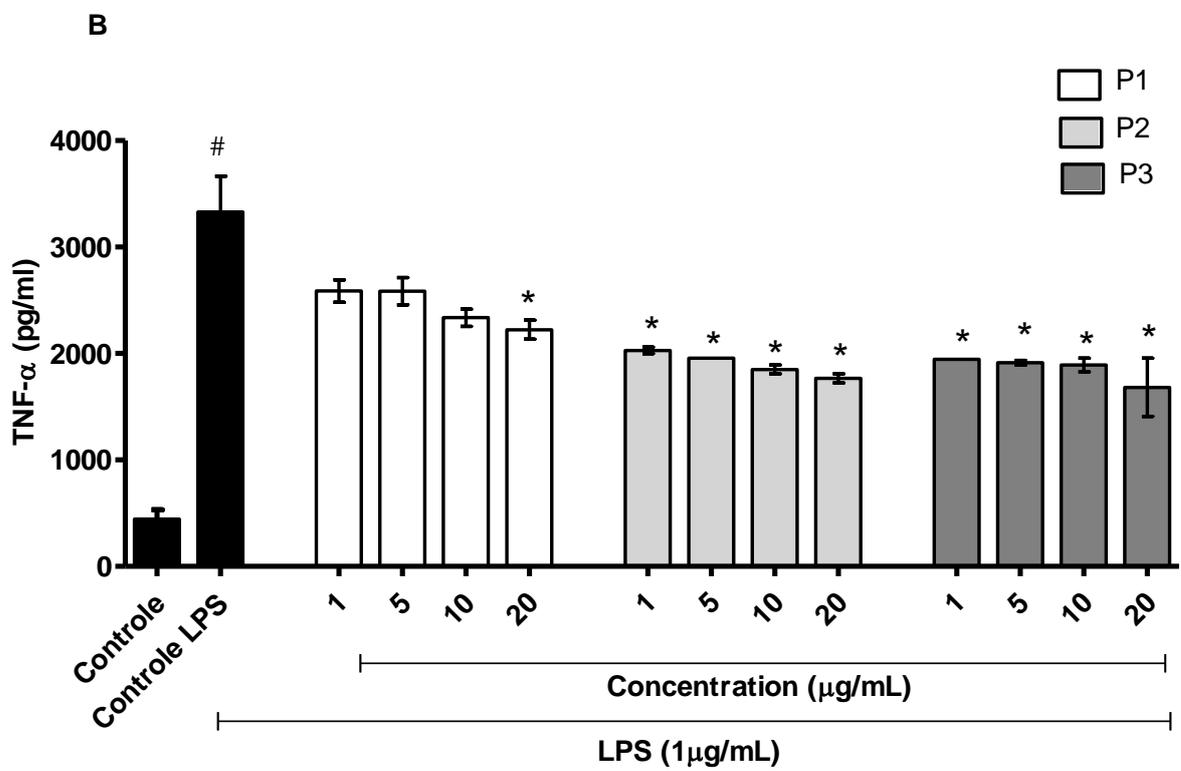
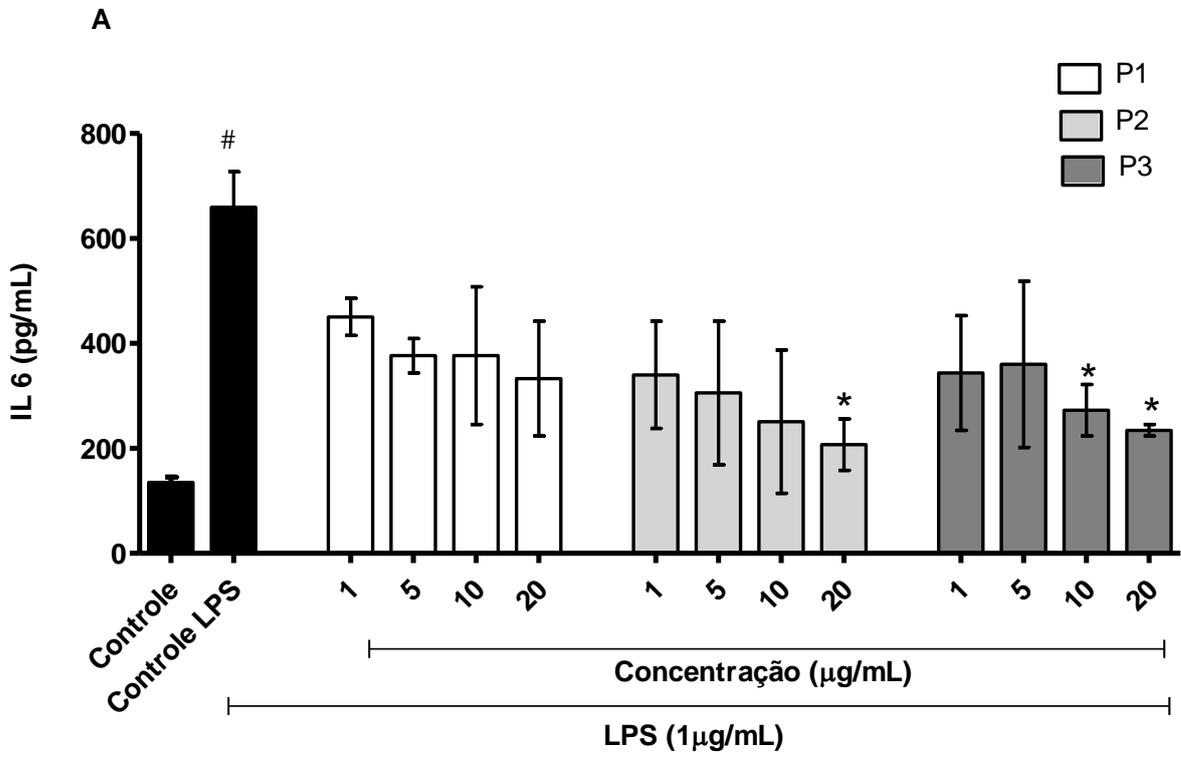


Figura 7. Efeito dos extratos hidroetanólicos dos pólenes P1, P2 e P3 de *M. capixaba* na produção de IL-6 (Figura 6A) e TNF- α (Figura 6B) em células RAW (264.7) estimuladas com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. #Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle negativo (basal). *Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle + LPS.

4 DISCUSSÃO

Os estudos dos extratos do pólen de pote de *M. capixaba* demonstraram atividade antioxidante nos experimentos químicos (ABTS e DPPH), redução dos mediadores inflamatórios (ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), TNF- α e IL-6, e a presença de diferentes compostos bioativos em sua composição como os compostos fenólicos, flavonoides e taninos totais.

Os metabólitos secundários, como polifenóis, têm importantes funções fisiológicas nas plantas, bem como inúmeras propriedades benéficas a saúde humana. Estudos sugerem que diferentes fatores, como a estação da coleta do pólen ou a variação de altitude, podem influenciar na produção desses metabólitos [7,41].

A quantidade total de compostos fenólicos presentes no pólen é considerada um importante indicador de sua qualidade, uma vez que os compostos estão associados a diferentes propriedades biológicas como propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias [40]. Os resultados evidenciaram que o pólen P3, obtido em maior altitude (1.180 m), apresentou os maiores teores de flavonoides, fenólicos e taninos totais. Os teores de flavonoides, fenólicos e taninos totais na amostra P2, obtida a 980 m foram 43%, 33% e 45% menores, respectivamente comparadas aos valores obtidos na amostra P3. Para a amostra P1, obtida a 470 m, seus teores em relação aos de P3 foram ainda menores, com reduções de 76%, 62% e 67% de flavonoides, fenólicos e taninos totais, respectivamente.

O teor de fenólicos totais encontrados para os extratos de *Melipona capixaba* oscilaram entre 4,1 e 10,7% dependendo do local de coleta. Resultados semelhantes para o teor de fenólicos são descritos na literatura para outras espécies de abelhas. Lopes et al. [11] analisaram o extrato do pólen de *Scaptotrigona affinis postica* encontrando 9,3% de fenólicos totais. Carpes [42] encontrou para *Apis mellifera* 3,0% e Lopes et al. [13] obteve valores entre 6,1 e 11,4% para *Melipona fasciculata*.

Os extratos do pólen de pote de *M. capixaba* demonstraram diferentes atividades biológicas entre si, variando favoravelmente o conteúdo de fenólicos totais,

flavonoides e taninos quanto maior a altitude do local de origem do pólen. Diferentes altitudes interferem nos índices pluviométricos, umidade relativa, temperatura e disponibilidade de radiação, fatores ecológicos que afetam as reações fisiológicas das plantas [6,41]. Entretanto, convém destacar que outras condições também estão envolvidas na quantidade de metabólitos secundários presentes no pólen como por exemplo as diferentes espécies vegetais nas quais o pólen foi coletado pelas abelhas [43]. Investigações palinológicas poderiam ser realizadas com a finalidade de elucidar as espécies botânicas florais pertencentes a cada pólen de pote [19].

A capacidade de inibir radicais livres observada nos extratos de *M. capixaba* pode estar relacionada à presença dos compostos fenólicos, assim como demonstrado em outros estudos. A presença desses compostos indica potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória do pólen de abelhas sem ferrão [3,14]. Nos testes de atividade antioxidante, o extrato P3 (maior altitude) apresentou maior potencial antioxidante com diferenças significativas quando comparado as demais amostras.

Os pólenes das abelhas sem ferrão apresentaram uma ampla variedade de compostos bioativos. Os resultados ESI(-)FT-ICR MS sugerem a presença de aldeídos e ácidos fenólicos livres nas amostras dos extratos P1, P2 e P3. Um total de 50 compostos, frequentemente encontrados em outros produtos de abelhas sem ferrão, foram identificados nos extratos do pólen de pote de *M. capixaba*. A maior diversidade de compostos encontrados ocorreu em P2, com 46/50 compostos identificados, seguido por P1 com 43/50 e então P3 com 39/50. Oliveira [3] em estudo com 7 diferentes espécies de abelhas do Gênero *Melipona*, no nordeste do Brasil, encontrou diversos compostos fenólicos, também identificados no pólen da espécie *Melipona capixaba* como: Apigenina, Kaempferol, Luteolina, Naringin, Rutina, Ácido Gálico, Ácido Ferúlico, Ácido Clorogênico, Ácido Abscísico.

Compostos bioativos como o Kaempferol que é frequentemente detectado em amostras de pólen podem ser utilizados como possíveis marcadores químicos no controle da qualidade da matéria-prima fitoterápica. Os efeitos farmacológicos do kaempferol, incluindo propriedades anti-inflamatórias foram sugeridas para o tratamento de doenças, tal como, COVID-2019 [44].

Para as amostras de pólen de *Melipona fasciculata*, Lopes *et al.* [13] sugeriram que a resposta anti-inflamatória está correlacionada a ação de polifenóis e ácidos graxos livres (presentes nas amostras de pólen) sobre a inibição da liberação de histamina e diminuição da síntese de prostaglandinas. Neste estudo, pela primeira vez

foi demonstrado que os extratos do pólen de *M. capixaba* inibiram significativamente a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) contribuindo para a redução do estresse oxidativo, bem como pela redução na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, evidenciando sua provável modulação do processo inflamatório.

Os resultados obtidos com o pólen P3 na identificação dos compostos bioativos e nas suas propriedades antioxidantes, e anti-inflamatórias podem ser reflexo do ambiente de sua origem. Convém destacar que dos três extratos, o P3 vem de região de grande diversidade botânica, coberta por floresta (Mata Atlântica), pertencente ao município de Divino de São Loureço, um dos que abrangem o Parque Nacional do Caparaó – Unidade de Conservação com proteção integral [45].

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos dos diferentes extratos do pólen de pote de *Melipona capixaba* demonstraram, pela primeira vez, elucidações sobre a composição química e potenciais atividades bioativas capazes de inibir espécies reativas de oxigênio e reduzir a produção de mediadores do processo inflamatório *in vitro*. No geral o Pólen de pote localizado em maior altitude demonstrou os melhores resultados em relação as propriedades antioxidante e anti-inflamatória. Apesar do gradiente altitudinal influenciar em fatores ecológicos que afetam as reações fisiológicas das plantas, interferindo na composição dos metabólitos secundários, outros estudos como análise química do solo e análise palinológica podem contribuir para esclarecer melhor essa questão. Os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir como referência para elaboração de uma norma futura, específica para os produtos das abelhas sem ferrão.

6 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Edital FAPES Nº 14/2019 - PROCAP 2020, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).

7 REFERÊNCIAS*

*As referências listadas neste trabalho foram formatadas segundo as normas da revista *Antioxidants*.

1. Al-Hatamleh, M.A.I.; Boer, J.C.; Wilson, K.L.; Plebanski, M.; Mohamud, R.; Mustafa, M.Z. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. *Biomolecules* **2020**, *10*, 923, doi:10.3390/biom10060923.
2. Abd Jalil, M.A.; Kasmuri, A.R.; Hadi, H. Stingless Bee Honey, the Natural Wound Healer: A Review. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2017**, *30*, 66–75, doi:10.1159/000458416.
3. Oliveira, R.G. de; Jain, S.; Freitas, L. dos S.; Araújo, E.D. de Phenolic compound, nutritional and antioxidant profile of pollen collected by the genus *Melipona* in North Eastern Brazil. *Brazilian J. Food Technol.* **2019**, *22*, doi:10.1590/1981-6723.07918.
4. DUARTE, A.W.F.; VASCONCELOS, M.R. dos S.; ODA-SOUZA, M.; OLIVEIRA, F.F. de; LÓPEZ, A.M.Q. Honey and bee pollen produced by *Meliponini* (Apidae) in Alagoas, Brazil: multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. *Food Sci. Technol.* **2018**, *38*, 493–503, doi:10.1590/fst.09317.
5. Sharma, A.; Shahzad, B.; Rehman, A.; Bhardwaj, R.; Landi, M.; Zheng, B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* **2019**, *24*, 2452, doi:10.3390/molecules24132452.
6. Yang, L.; Wen, K.-S.; Ruan, X.; Zhao, Y.-X.; Wei, F.; Wang, Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules* **2018**, *23*, 762, doi:10.3390/molecules23040762.
7. Zargoosh, Z.; Ghavam, M.; Bacchetta, G.; Tavili, A. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16021, doi:10.1038/s41598-019-52605-8.
8. Chantarudee, A.; Phuwapraisirisan, P.; Kimura, K.; Okuyama, M.; Mori, H.; Kimura, A.; Chanchao, C. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 45, doi:10.1186/1472-6882-12-45.
9. Zuluaga, C.M.; Serrato, J.C.; Quicazan, M.C. Bee-pollen structure modification by physical and biotechnological processing: influence on the availability of nutrients and bioactive compounds. *Chem. Eng. Trans.* **2015**, *43*, 79–84, doi:10.3303/CET1543014.
10. Bárbara, M.S.; Machado, C.S.; Sodr e, G.D.S.; Dias, L.G.; Estevinho, L.M.; De Carvalho, C.A.L. Microbiological assessment, nutritional characterization and

- phenolic compounds of bee pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. *Molecules* **2015**, *20*, 12525–12544, doi:10.3390/molecules200712525.
11. Lopes, A.J.O.; Vasconcelos, C.C.; Garcia, J.B.S.; Pinheiro, M.S.D.; Pereira, F.A.N.; Camelo, D. de S.; Morais, S.V. de; Freitas, J.R.B.; Rocha, C.Q. da; Ribeiro, M.N. de S.; et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by *Scaptotrigona affinis postica*: in silico, in vitro, and in vivo Studies. *Antioxidants* **2020**, *9*, 103, doi:10.3390/antiox9020103.
 12. Belina-Aldemita, M.D.; Schreiner, M.; D'Amico, S. Characterization of phenolic compounds and antioxidative potential of pot-pollen produced by stingless bees (*Tetragonula biroi* Friese) from the Philippines. *J. Food Biochem.* **2020**, *44*, doi:10.1111/jfbc.13102.
 13. Lopes, A.J.O.; Vasconcelos, C.C.; Pereira, F.A.N.; Silva, R.H.M.; Queiroz, P.F. dos S.; Fernandes, C.V.; Garcia, J.B.S.; Ramos, R.M.; Rocha, C.Q. da; Lima, S.T.D.J.R.M.; et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Pollen Extract Collected by Stingless Bee *Melipona fasciculata*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4512, doi:10.3390/ijms20184512.
 14. Ranneh, Y.; Akim, A.M.; Hamid, H.A.; Khazaai, H.; Fadel, A.; Mahmoud, A.M. Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2, NF- κ B and p38 MAPK. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2019**, *16*, 15, doi:10.1186/s12986-019-0341-z.
 15. Pedro, S.R.M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* **2014**, *61*, 348–354, doi:10.13102/sociobiology.v61i4.348-354.
 16. Nogueira-neto, P.; Nogueira, P. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*; Nogueirapis: São Paulo, 1997; Vol. 34; ISBN 8586525014.
 17. Resende, H.C. Filogeografia e Conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae), Universidade Federal de Viçosa, 2012.
 18. Silveira, F.A. da; Melo, G.A.R. de; Campos, L.A. de O.; Filho, P.O.J.M.; Pedro, S.R. de M. *Melipona* (*Michmelia*) *capixaba* Moure & Camargo, 1994. In *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.*; Brasília - DF: ICMBio/MMA, 2018; pp. 184–186.
 19. Luz, C.F.P. Da; Fernandes-Salomão, T.M.; Lage, L.G.A.; Resende, H.C.; Tavares, M.G.; Campos, L.A.D.O. Pollen Sources for *Melipona capixaba* Moure & Camargo: An Endangered Brazilian Stingless Bee. *Psyche A J. Entomol.* **2011**, *2011*, 1–7, doi:10.1155/2011/107303.
 20. Embrapa *Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório*; Belém-PA, 2004;
 21. Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern, J.C. Estimation of total flavonoid

- content in propolis by two complementary colometric methods. *J. Food Drug Anal.* **2002**, *10*, 178–182, doi:10.38212/2224-6614.2748.
22. Asem, N.; Abdul Gapar, N.A.; Abd Hapit, N.H.; Omar, E.A. Correlation between total phenolic and flavonoid contents with antioxidant activity of Malaysian stingless bee propolis extract. *J. Apic. Res.* **2020**, *59*, 437–442, doi:10.1080/00218839.2019.1684050.
 23. Krepsky, P.B.; Isidório, R.G.; De Souza Filho, J.D.; Côrtes, S.F.; Braga, F.C. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 953–957, doi:10.1016/j.phymed.2012.05.011.
 24. Ribeiro, R.; Eloy, M.A.; Francisco, C.S.; Javarini, C.L.; Ayusso, G.M.; Da Rocha Fonseca, V.; Romão, W.; Regasini, L.O.; Araujo, S.C.; Almeida, M.O.; et al. Flavonoid Derivatives Targeting BCR-ABL Kinase: Semisynthesis, Molecular Dynamic Simulations and Enzymatic Inhibition. *Curr. Top. Med. Chem.* **2021**, *21*, 1999–2017, doi:10.2174/1568026621666210705170047.
 25. ©Royal Society of Chemistry chemspider database Available online: <http://www.chemspider.com/>.
 26. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237, doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
 27. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200, doi:10.1038/1811199a0.
 28. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
 29. Choi, H.W.; Klessig, D.F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol.* **2016**, *16*, 1–10, doi:10.1186/s12870-016-0921-2.
 30. Pinho, B.R.; Sousa, C.; Valentão, P.; Andrade, P.B. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0024098.
 31. Sturrock, A.; Cahill, B.; Norman, K.; Huecksteadt, T.P.; Hill, K.; Sanders, K.; Karwande, S. V.; Stringham, J.C.; Bull, D.A.; Gleich, M.; et al. Transforming growth factor- β 1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2006**, *290*, 661–673, doi:10.1152/ajplung.00269.2005.
 32. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138, doi:10.1016/0003-2697(82)90118-X.
 33. Ferreira, B.L.; Gonzaga, L.V.; Vitali, L.; Micke, G.A.; Baggio, D.; de Oliveira

- Costa, A.C.; Fett, R. Dataset about Southern-Brazilian geopropolis: Physical and chemical perspectives. *Data Br.* **2020**, *29*, 105109, doi:10.1016/j.dib.2020.105109.
34. Silva, T.M.S.; Camara, C.A.; Lins, A.C.S.; Agra, M. de F.; Silva, E.M.S.; Reis, I.T.; Freitas, B.M. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *An. Acad. Bras. Cienc.* **2009**, *81*, 173–178, doi:10.1590/S0001-37652009000200003.
 35. Othman, Z.A.; Wan Ghazali, W.S.; Noordin, L.; Mohd. Yusof, N.A.; Mohamed, M. Phenolic Compounds and the Anti-Atherogenic Effect of Bee Bread in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *Antioxidants* **2019**, *9*, 33, doi:10.3390/antiox9010033.
 36. Funakoshi-Tago, M.; Ohsawa, K.; Ishikawa, T.; Nakamura, F.; Ueda, F.; Narukawa, Y.; Kiuchi, F.; Tamura, H.; Tago, K.; Kasahara, T. Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *40*, 550–560, doi:10.1016/j.intimp.2016.10.008.
 37. National Center for Biotechnology Information PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
 38. Chong, F.C.; Chua, L.S. Effects of Solvent and pH on Stingless Bee Propolis in Ultrasound-Assisted Extraction. *AgriEngineering* **2020**, *2*, 308–316, doi:10.3390/agriengineering2020020.
 39. Silva, T.M.S.; Camara, C.A.; da Silva Lins, A.C.; Maria Barbosa-Filho, J.; da Silva, E.M.S.; Freitas, B.M.; de Assis Ribeiro dos Santos, F. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 507–511, doi:10.1016/j.jfca.2005.12.011.
 40. Ávila, S.; Hornung, P.S.; Teixeira, G.L.; Malunga, L.N.; Apea-Bah, F.B.; Beux, M.R.; Beta, T.; Ribani, R.H. Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. *Food Res. Int.* **2019**, *123*, 1–10, doi:10.1016/j.foodres.2019.01.068.
 41. NEGRÃO, A.F.; ORSI, R.O. Harvesting Season and Botanical Origin Interferes in Production and Nutritional Composition of Bee Pollen. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2018**, *90*, 325–332, doi:10.1590/0001-3765201720150192.
 42. CARPES, S.T. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian J. Food Technol.* **2009**, *12*, 220–229, doi:10.4260/bjft2009800900016.
 43. Leja, M.; Mareczek, A.; Wyżgolik, G.; Klepacz-Baniak, J.; Czekońska, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem.* **2007**, *100*, 237–240, doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.047.
 44. Khazdair, M.; Anaeigoudari, A.; Agbor, G. Anti-viral and anti-inflammatory effects of kaempferol and quercetin and COVID-2019: A scoping review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2021**, *11*, 327, doi:10.4103/2221-1691.319567.

45. Brasil *DECRETO Nº 50.646 DE 24 DE MAIO DE 1961: Cria o Parque Nacional de Caparaó e dá outras providências.*; 1961;