

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Composição química e atividade antioxidante do pólen  
coletado pela abelha sem ferrão: *Melipona seminigra*  
Cockerell, 1919**

**Luz Piedad Sánchez Villarreal**

Manaus - Amazonas  
Dezembro – 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Luz Piedad Sánchez Villarreal**

**Composição química e atividade antioxidante do pólen  
coletado pela abelha sem ferrão: *Melipona seminigra*  
Cockerell, 1919**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Saraiva Nunomura  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidia Medina**

Manaus - Amazonas  
Dezembro - 2009

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Villarreal, Luz Piedad Sánchez

V722c Composição química e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão: *Melipona seminigra* Cockerell, 1919 / Luz Piedad Sánchez Villarreal. - Manaus: UFAM, 2009.  
117 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lidia Medina

1. *Melipona seminigra* 2. Abelhas sem ferrão 3. Pólen – Composição química I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva II. Medina, Lidia III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 638.19(043.3)

## Luz Piedad Sánchez Villarreal

Composição química e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão: *Melipona seminigra* Cockerell, 1919

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

Aprovada em 15 de dezembro de 2009.

### BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Saraiva Nunomura  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislene Almeida Carvalho-Zilse  
Instituto de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Marcos Batista Machado  
Universidade Federal do Amazonas

Ao meu esposo,  
à minha mãe e minha irmã  
pelo amor e presença permanentes.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora pela confiança, o incentivo e o acompanhamento constante;

À minha mãe, Gloria Villarreal por me escutar sempre, por me compreender, pelo apoio e incentivo permanente.

Ao Dr. Sergio Massayosshi Nunomura pelo suporte técnico, pelas orientações, pela dedicação e por compartilhar comigo o seu conhecimento;

À Dra. Gislene Carvalho-Zilse do Laboratório de Pesquisas em Abelhas do INPA por fornecer o material de estudo.

À Dra. Maria Lucia Absy e aos bolsistas do Laboratório de Palinologia do INPA pela colaboração para a determinação da origem botânica das amostras.

Ao pessoal do Laboratório de Pesca da UFAM pelo apoio técnico para a liofilização das amostras.

Ao CBA pela realização dos espectros RMN de hidrogênio.

Ao Dr. Afonso Leão de Souza pelo incentivo para a realização do meu mestrado.

À Dra. Lidia Medina da Central Analítica da UFAM pela orientação e à Carmen pelo apoio técnico.

À minha amiga Esperanza Guerra por ter me motivado ao estudo das abelhas e seus produtos.

À minha amiga Andreza Cruz Barreto pela sua sabedoria e bondade, pelo estímulo e pela sua presença incondicional nos bons e maus momentos.

Aos colegas e amigos do LAPAAM: Dulcimar, Rita, Magno, Banny, Kethelin, Sintia, Marycleuma, Sunia, Ellen, Patrícia, Rodrigo e Márcia com quem sempre tive a oportunidade de trocar conhecimentos e a quem sempre levarei no meu coração.

A todos os professores da pós- graduação pelos ensinamentos e amizade.

À Universidade Federal do Amazonas, à CAPES, à FAPEAM pelo apoio financeiro e bolsa concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas da Amazônia -INPA-, pelo apoio técnico para a realização da pesquisa.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As abelhas sem ferrão vêm ganhando atenção devido à sua importância como polinizadoras de espécies vegetais nativas e por representarem uma importante fonte de renda para os meliponicultores. Com o propósito de contribuir ao conhecimento da composição química e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell, 1919 (uruçú-boca-de-renda), espécie muito procurada na região, duas amostras de pólen foram coletadas durante dois períodos característicos da região Amazônica, o chuvoso (abril de 2008, pluviosidade de 300 mm) e o seco (agosto de 2008, pluviosidade de 50 mm). A composição centesimal indicou que as duas amostras apresentam um valor nutricional similar e dentro dos parâmetros recomendados pelo Ministério da Agricultura, com exceção do teor de carboidratos que foi 10 % superior ao valor de referência. Nas duas amostras de pólen, *Miconia dispar* (Melastomataceae) foi o pólen predominante (período chuvoso: 53,19 % e seco: 95,60 %). Outros tipos de pólen identificados foram da família Myrtaceae (período chuvoso 25,64% e seco 0,96%) e da espécie *Mimosa pudica* (Fabaceae; período chuvoso 16,81% e período seco 3,44%). A partir dessas amostras foram preparados extratos aquosos e etanólicos. Estes últimos foram fracionados por partição líquido-líquido, resultando nas frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica. A atividade antioxidante dos extratos e das frações foi determinada por dois ensaios: capacidade de seqüestro do radical livre difenilpicrilhidrazilo (DPPH·) e capacidade redutora de Fe(III). Em ambos os ensaios, observou-se que os extratos etanólicos foram os mais ativos, quando comparado aos aquosos. Das frações analisadas, as frações acetato de etila apresentaram a maior atividade antioxidante. O teor de fenólicos totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu confirmou que os compostos fenólicos se concentraram nessas frações. Perfis cromatográficos das frações purificadas por extração em fase sólida a partir dos extratos etanólicos de cada período foram obtidos por CLAE em fase reversa e mostraram-se bastante similares. Com o auxílio de padrões comerciais e utilizando o método da coeluição foi possível identificar a presença do fenilpropanoide, ácido *p*-cumárico e dos flavonóides: miricetina, quercetina e naringenina. O componente principal da fração obtida por extração em fase sólida do extrato etanólico da época de chuva foi ainda purificado por CLAE em fase reversa em escala semi-preparativa. Os dados espectroscópicos (RMN de <sup>1</sup>H) dessa substância indicaram tratar-se da quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).

Palavras-chave: *Melipona seminigra*; Meliponinae; Antioxidante; DPPH·; Polifenóis; CLAE; Perfil cromatográfico.

## ABSTRACT

Stingless bees have gained attention because their importance as pollinators of a wide range of native plant species and because they represent an important income source for meliponicultors. In order to contribute to the knowledge of the chemical composition and antioxidant activity of pollen collected by the stingless bee *Melipona seminigra* Cockerell, 1919 (uruçú-boca-de-renda), an economical specie in the Amazon region, two samples were collected during two distinguished weather season in the Brazilian Amazon, dry (august 2008, 50 mm) and rainy (april 2008, 300 mm) season. The centesimal composition analysis showed that both samples have a similar nutritional value and all values are in accord to the recommended by the Brazilian Ministry of Agriculture, but carbohydrate contents, which were ca 10 % above. In both samples of pollen, the main botanical source was *Miconia dispar* (Melastomataceae) (rainy season: 53.19% and dry season: 95.60%) followed by pollen of different Myrtaceae species (rainy: 25.64% and dry 0.96%) and *Mimosa pudica* pollen (Fabaceae; rainy: 16.81% and dry: 3.44%). Aqueous and ethanolic extracts from samples collected in the two different seasons were prepared and the ethanolic extracts were fractionated by liquid-liquid partition into hexanes, ethyl acetate and hydroalcoholic fractions. The antioxidant activity of the extracts and fractions was determined by two different methods: DPPH· radical scavenging assay and the ferric reducing antioxidant power assay. In both cases, the ethanolic extracts were more active than the aqueous ones. The fractions were also assayed and the ethyl acetate fractions were the most active ones. The total phenolics contents as determined by the Folin-Ciocalteu assay have confirmed that the phenolic compounds were concentrated into these fractions. Fingerprinting analysis by RP-HPLC of purified fractions obtained by solid phase extraction (RP-SPE) of ethanolic extracts of each characteristic seasonal period showed similar compositions. The phenylpropanoid, *p*-coumaric, and the flavonoids myricetin, quercetin and naringenin could be identified with the help of coelution method with authentic commercial standards. The main component of the fraction obtained by RP-SPE was purified by semi-preparative RP-HPLC and was identified by <sup>1</sup>H NMR data as quercitrin (quercetin 3-O-rhamnopyranoside).

Key words: *Melipona seminigra*; Meliponinae; Antioxidant activity; DPPH·, Phenolics; CLAE; Chromatographic profile.

## SUMÁRIO

Dedicatória .....	iv
Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Sumário .....	viii
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Esquemas .....	xiii
Lista de Figuras .....	xiv
Lista de Anexos .....	xvii
Lista de abreviaturas e siglas .....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 As abelhas Meliponinae: abelhas sem ferrão .....	1
1.1.1 Ecologia da relação abelha-planta .....	2
1.1.2 A abelha sem ferrão <i>Melipona seminigra</i> Cockerell, 1919 .....	4
1.2. O pólen apícola .....	6
1.2.1 Composição química do pólen apícola .....	8
1.3. Polifenóis e flavonóides .....	11
1.3.1. Estresse oxidativo e substâncias antioxidantes .....	18
1.3.2. Mecanismos da ação antioxidante .....	20
1.3.2.1. Capacidade de seqüestro de radicais livres .....	21
1.3.2.2. Capacidade de quelação de metais .....	24
1.3.3. Métodos de análise da atividade antioxidante .....	25
1.3.4. Substâncias antioxidantes em cargas de pólen apícola .....	27
1.3.5. Atividade biológica do pólen apícola .....	32
1.3.5.1. Atividade anti-bacteriana .....	32
1.3.5.2. Atividade anti-hipertensiva .....	32
1.3.5.3. Atividade anti-oxidante in vivo .....	33
1.3.5.4. Atividade imuno-estimulante .....	33
1.3.5.5. Atividade anti-osteoporose .....	34
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos .....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1. Coleta do material de trabalho .....	36
3.2. Análise da composição centesimal .....	37
3.2.1. Umidade .....	37
3.2.2. Proteínas .....	37
3.2.3. Lipídeos totais .....	40
3.2.4. Cinzas .....	41
3.2.5. Carboidratos .....	41

3.2.6. Cálculo do teor energético .....	41
3.3. Análise da origem botânica.....	42
3.4. Obtenção de extratos.....	42
3.4.1. Extratos etanólicos .....	42
3.4.2. Extratos aquosos.....	43
3.4.3. Extratos metanólicos .....	44
3.5. Fracionamento dos extratos etanólicos .....	44
3.6. Perfis cromatográficos por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) .....	45
3.6.1. Reagentes e solventes.....	45
3.6.2. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)-Fase normal .	45
3.6.3. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)-Fase reversa	46
3.6.4. Revelação de placas em CCDC.....	46
3.7. Análise da atividade antioxidante .....	47
3.7.1. Análise de fenólicos totais.....	47
3.7.2. Teste da atividade antioxidante pela capacidade de seqüestro do radical livre DPPH' .....	48
3.7.3. Teste da atividade antioxidante pela capacidade redutora do Ferro -Fe <sup>3+</sup> - (FRAP) .....	51
3.8. Perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	53
3.8.1. Sistema cromatográfico.....	54
3.8.2. Pré-tratamento das amostras .....	55
3.8.3. Desenvolvimento do método de análise de componentes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	57
3.8.4. Injeção de padrões.....	58
3.8.5. Injeção de mistura de padrões .....	58
3.8.6. Co-injeção de padrões .....	60
3.9. Isolamento de substâncias .....	60
3.9.1. Sistema cromatográfico.....	60
3.9.2. Pré-tratamento das amostras.....	61
3.9.3. Obtenção de frações por CLAE .....	61
3.10. Determinação estrutural do constituinte químico isolado .....	62
3.11. Análise estatística .....	62
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
4.1. Estudo da composição centesimal .....	63
4.2. Estudo da origem botânica .....	65
4.3. Rendimentos de substâncias extraíveis.....	67
4.3.1. Extratos etanólicos e aquosos .....	67
4.3.2. Fracionamento dos extratos etanólicos.....	68
4.4. Perfis químicos por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa .....	68
4.4.1. CCDC-Fase Normal .....	68
4.4.2. CCDC-Fase Reversa .....	71

4.5. Estudo da atividade antioxidante dos extratos etanólicos e suas frações .....	72
4.5.1. Teor de fenólicos totais .....	72
4.5.2. Estudo da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH· .....	76
4.5.3. Estudo da capacidade de redução de Fe(III) .....	79
4.6. Estudo dos perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	81
4.6.1. Pretratamento das amostras .....	81
4.6.2. Análise de componentes por CLAE.....	85
4.6.3. Comparação qualitativa dos perfis CLAE de fenólicos/flavonóides.....	86
4.6.4. Injeção de padrões de substâncias fenólicas.....	89
4.6.5. Estudo do efeito da matriz de dissolução nos tempos de retenção de substâncias fenólicas: injeção de mistura de padrões .....	90
4.6.6. Identificação das substâncias fenólicas: co-injeção de padrões .....	93
4.7. Identificação da substância fenólica isolada: análise do espectro de RMN <sup>1</sup> H.....	102
<b>CONCLUSÕES</b> .....	105
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	108
<b>ANEXOS</b> .....	117

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Requisitos físico-químicos do pólen apícola no Brasil.....	8
Tabela 2-	Classes de substâncias representativas presentes no pólen apícola.....	11
Tabela 3-	Diferentes classes de flavonóides e seus padrões de substituição.....	17
Tabela 4-	Distribuição de alguns compostos fenólicos em alimentos.....	18
Tabela 5-	Composição centesimal em 100 g de amostra <i>in natura</i> .....	63
Tabela 6-	Composição centesimal em 100 g de amostra seca.....	64
Tabela 7-	Porcentagem de freqüência (%) vs. tipos polínicos encontrados nas amostras liofilizadas do pólen coletado por <i>Melipona seminigra</i> durante a estação de chuva (Mchuva) e durante a estação de seca (Mseca) no meliponario do grupo de Pesquisas em Abelhas do INPA, Manaus, 2008.....	66
Tabela 8-	Teor de extrativos dos extratos etanólicos e aquosos do pólen coletado por <i>M. seminigra</i> .....	68
Tabela 9-	Comparação do rendimento das partições líquido-líquido para as amostras de pólen de <i>Melípona seminigra</i> na época de chuva (Mchuva) e de seca (Mseca).....	68
Tabela 10-	Dados de Absorbância em função da concentração de ácido gálico (mg/mL).....	72
Tabela 11-	Resultados comparativos do teor de fenólicos totais para os extratos/frações das amostras de pólen de <i>Melípona seminigra</i> coletados na época de chuva e de seca.....	73
Tabela 12-	Teor de fenólicos totais nos extratos etanólicos e aquosos expressos como g de ácido gálico/100 g de pólen seco de <i>Melípona seminigra</i> .....	74
Tabela 13-	Resultados comparativos da capacidade de sequestro do radical livre DPPH <sup>•</sup> dos extratos/frações de pólen de <i>Melípona seminigra</i> coletados na época de chuva (Mchuva) e de seca (Mseca).....	77
Tabela 14-	Resultados comparativos da capacidade de redução de Fe (III) dos extratos e das frações de pólen coletado pela abelha <i>Melípona seminigra</i> durante a estação de chuva e de seca.....	80
Tabela 15-	Correlação entre o teor de fenólicos totais e os resultados da	

	atividade antioxidante para os extratos etanólicos e as frações em acetato de etila.....	81
Tabela 16-	Tempos de retenção dos padrões das substâncias fenólicas injetadas. Volume de injeção 20 $\mu$ L. Concentração: 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ L...	89
Tabela 17-	Tempos de retenção dos padrões ácido <i>p</i> -cumárico, rutina, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina e kaempferol injetados em forma isolada e em uma mistura.....	93
Tabela 18-	Comparação entre os tempos de retenção no perfil cromatográfico (sem co-injeção) e os tempos de retenção nas co-injeções para as frações Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2 obtidas por pré-tratamento do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletado na época de chuva e de seca.....	100
Tabela 19-	Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ observados para 3-O-ramnosil-quercetrina em metanol deuterado (MeOD-d4).....	104
Tabela 20-	Cálculo do estatístico F para as amostras Mchuva e Mseca.....	118
Tabela 21-	Contraste de significação <i>t</i> entre os parâmetros físico-químicos das amostras Mchuva e Mseca.....	119

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-	Formação do ácido chiquímico.....	12
Esquema 2-	Rota do acetato para a formação de substâncias fenólicas simples.....	13
Esquema 3-	Biossíntese de flavonóides e estilbenos.....	15
Esquema 4-	Biossíntese das principais classes de flavonóides.....	16
Esquema 5-	Mecanismo do seqüestro do radical peroxinitrila por substâncias fenólicas.....	23
Esquema 6-	Substâncias químicas identificadas no pólen coletado por abelhas sem ferrão da sub-família Meliponinae.....	29
Esquema 7-	Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos obtidos a partir do pólen de <i>Melípona seminigra</i> .....	44
Esquema 8-	Estruturas das formas radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e sua forma reduzida.....	49
Esquema 9-	Estruturas do TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe (II) e Fe (III).....	52
Esquema 10-	Pré-tratamento dos extratos etanólicos do pólen de <i>Melípona seminigra</i> coletado na cidade de Manaus por Extração em Fase Sólida (SEP-PAK C18).....	57
Esquema 11-	Estrutura dos padrões de substâncias fenólicas injetadas.....	59
Esquema 12-	Esqueleto básico dos flavonóides (R= OH).....	88
Esquema 13-	Estrutura do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).....	104

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Entrada de ninho de abelha sem ferrão <i>Melipona seminigra</i> Cockerell, 1919.....	5
Figura 2-	Interior de ninho de abelha sem ferrão <i>Melipona seminigra</i> Cockerell, 1919.....	5
Figura 3-	Favos sinalados contendo pólen coletado por abelha sem ferrão <i>Melipona seminigra</i> Cockerell, 1919.....	7
Figura 4-	Pólen liofilizado obtido a partir do pólen coletado por <i>Melipona seminigra</i> na cidade de Manaus: a. Pólen coletado durante a estação de chuva (Mchuva); b. Pólen coletado durante a estação de seca (Mseca).....	37
Figura 5-	CCDC-FN das substâncias apolares nos extratos/frações do pólen coletado por <i>M. seminigra</i> durante a época de chuva. I: Revelador ácido fosfomolibdico; II: Revelador cloreto férrico. Extrato metanólico, MeOH (60°C, 5 minutos); Extrato etanólico, EtOH; Fração hexânica, Hex; Fração em acetato de etila, AcOEt; Fração hidroalcoólica, H <sub>2</sub> O/MeOH; Extrato aquoso, H <sub>2</sub> O.....	69
Figura 6-	CCDC-FN das substâncias apolares nos extratos/frações do pólen coletado por <i>Melipona seminigra</i> durante a época de seca. III: Revelador ácido fosfomolibdico; IV: Revelador cloreto férrico. Extrato metanólico, MeOH (60°C, 5 minutos); Extrato etanólico, EtOH; Fração hexânica, Hex; Fração em acetato de etila, AcOEt; Fração hidroalcoólica, H <sub>2</sub> O/MeOH; Extrato aquoso, H <sub>2</sub> O.....	70
Figura 7-	CCDC-FR das substâncias polares/fenólicas nos extratos/frações do pólen coletado por <i>Melipona seminigra</i> durante a época de chuva (V) e de seca (VI). Extrato metanólico, MeOH (60°C, 5 minutos); Extrato etanólico, EtOH; Fração hexânica, Hex; Fração em acetato de etila, AcOEt; Fração hidroalcoólica, H <sub>2</sub> O/MeOH; Extrato aquoso, H <sub>2</sub> O. Revelador NP-PEG.....	72
Figura 8-	Curva de calibração com ácido gálico.....	73
Figura 9-	Curva de calibração linear da %CS em função da Concentração (µg/mL) de quercetina.....	76
Figura 10-	Curva de calibração com padrão de Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O.....	79
Figura 11-	Cromatogramas das frações obtidas por extração em fase sólida do extrato etanólico do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletado no periodo de chuva (a) fração aquosa eluida com 5 mL de H <sub>2</sub> O/TFA pH 2,0; (b) primeira fração eluida com 5 mL de	

	ACN/H <sub>2</sub> O/TFA pH 2,0 e (c) segunda fração eluída com 5 mL de ACN/H <sub>2</sub> O/TFA pH 2,0. Comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm.....	83
Figura 12-	Cromatogramas das frações obtidas por extração em fase sólida do extrato etanólico do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletado no período de seca (a) fração aquosa eluída com 5 mL de H <sub>2</sub> O/TFA pH 2,0; (b) primeira fração eluída com 5 mL de ACN/H <sub>2</sub> O/TFA pH 2,0 e (c) segunda fração eluída com 5 mL de ACN/H <sub>2</sub> O/TFA pH 2,0. Comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm.....	84
Figura 13-	Perfil RPHPLC da fração purificada (Mch-EE-F2) a partir do extrato etanólico do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletada no período de chuva, (a) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm, (b) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 280 nm.....	85
Figura 14-	Perfil da fração purificada (Msec-EE-F2) a partir do extrato etanólico do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletada no período de seca, (a) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm, (b) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 280 nm.....	86
Figura 15-	Espectros de absorção na região do ultravioleta das substâncias padrão: ácido <i>p</i> -cumárico, rutina, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina e kaempferol.....	91
Figura 16-	Cromatograma da mistura de padrões selecionados.....	92
Figura 17-	Cromatogramas das co-injeções da fração Mc-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletado na época de chuva com os padrões (a) ácido <i>p</i> -cumárico, (b) rutina, (c) ácido sinápico. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50 $\mu$ L.....	94
Figura 18-	Cromatogramas das co-injeções da fração Mc-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletado na época de chuva com os padrões (d) miricetina, (e) quercetina. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50 $\mu$ L.....	95
Figura 19-	Cromatogramas das co-injeções da fração Mc-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletado na época de chuva com os padrões (f) naringenina, (g) apigenina, (h) kaempferol. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50 $\mu$ L. ....	96
Figura 20-	Cromatogramas das co-injeções da fração Ms-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de <i>Melipona seminigra</i> coletado na	

- época de seca com os padrões (a) ácido *p*-cumárico, (b) rutina, (c) ácido sinápico. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50 µL. .... 97
- Figura 21- Cromatogramas das coinjeções da fração Ms-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de seca com os padrões (d) miricetina, (e) quercetina. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50 µL..... 98
- Figura 22- Cromatogramas das co-injeções da fração Ms-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de seca com os padrões (f) naringenina, (g) apigenina, (h) kaempferol. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50 µL. .... 99
- Figura 23- Espectros de absorção no ultravioleta de: (a) padrão de ácido *p*-cumárico (tempo de retenção: 20,154 minutos); (b) pico eluído em 20,330 minutos no perfil cromatográfico da amostra Mch-EE-F2 e (c) pico eluído em 20,593 minutos no perfil cromatográfico da amostra Msec-EE-F2..... 101
- Figura 24- Cromatograma da fração Mch-EE-F2, obtida por pré-tratamento do extrato etanólico do pólen coletado por *Melipona seminigra* durante o período de chuva, resolvida por CLAE semi-preparativa em fase reversa. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: MeOH. Método isocrático: 45 % B. Tempo: 40 minutos. Fluxo: 12 mL/min..... 102

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A-</b>	Contraste de significação <i>t</i> para a comparação das médias dos parâmetros físico-químicos e da atividade antioxidante de duas amostras de pólen de <i>Melípona seminigra</i> (Mchuva e Mseca) coletadas no meliponário do Laboratório de Pesquisa em abelhas do INPA na cidade de Manaus.....	117
<b>ANEXO B-</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H em MeOD (d-4) em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).....	120
<b>ANEXO C-</b>	Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H em MeOD (d-4) em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina). δ: 5,0 a 7,0 ppm.....	121
<b>ANEXO D-</b>	Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H em MeOD (d-4) em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina). δ: 3,0 a 5,0 ppm.....	122
<b>ANEXO E-</b>	Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H em MeOD (d-4) em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina). δ: 0,0 a 1,5 ppm.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACN</b>	Acetonitrila.
<b>B.S.</b>	Base Seca.
<b>CCDC</b>	Cromatografia em camada delgada comparativa.
<b>CCDC-FN</b>	Cromatografia em camada delgada comparativa em Fase Normal
<b>CCDC-FR</b>	Cromatografia em camada delgada comparativa em Fase Reversa.
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
<b>%CS<sub>50</sub></b>	Porcentagem de capacidade de sequestro de 50 % do radical livre DPPH. Concentração do substrato que causa 50 % de perda da atividade do radical livre DPPH· (cor).
<b>DAHP</b>	Ácido 3-deoxi-D- <i>arabino</i> -heptulose 7-fosfato.
<b>DPPH·</b>	Radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazila.
<b>EC<sub>50</sub></b>	Parâmetro: "Efficient Concentration". Concentração do substrato que causa 50 % de perda da atividade do radical livre DPPH· (cor).
<b>FN</b>	Fase Normal
<b>FR</b>	Fase Reversa.
<b>FRAP</b>	"Ferric reducing/antioxidant power assay". Ensaio de capacidade de redução de Fe (III).
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography.
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M.
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E.
<b>MDA</b>	Malondialdehyde. Malondialdeído.
<b>MeOH</b>	Metanol.
<b>Mchuva</b>	Amostra de pólen coletado pela abelha <i>Melipona seminigra</i> na cidade de Manaus durante o periodo de chuva.
<b>Mseca</b>	Amostra de pólen coletado pela abelha <i>Melipona seminigra</i> na cidade de Manaus durante o periodo de seca.
<b>Mchuva-EE</b>	Extrato etanólico obtido do polen coletado pela abelha <i>Melipona seminigra</i> na cidade de Manaus durante o periodo de chuva (abril).
<b>Mseca-EE</b>	Extrato etanólico obtido do polen coletado pela abelha <i>Melipona seminigra</i> na cidade de Manaus durante o periodo de seca (agosto).
<b>NAD</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotido.
<b>NP</b>	Reagente para revelação de flavonóides "Natural Products" (difenilboriloxietilamina)
<b>PEG</b>	Polietilenglicol.
<b>PVDF</b>	Polivinildenedifluoreto (Fluoreto de polivinilideno).
<b>Rf</b>	Fator de retenção
<b>TBARS</b>	"Thiobarbituric acid-reactive substances". Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético.
<b>TPTZ</b>	2,4,6-(2-piridil)-1,3,5-triazina.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. As abelhas Meliponinae: abelhas sem ferrão

As abelhas pertencem à ordem dos Himenópteros, superfamília Apoidea. No Brasil a família Apidae, que é a que tem os hábitos sociais mais avançados apresenta quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae (Nogueira-Neto, 1997). Com algumas exceções, a característica comum dessas quatro subfamílias é ter, nas tíbias das pernas traseiras das fêmeas, uma concavidade denominada corbícula onde elas carregam o pólen das flores ou outras substâncias para os seus ninhos. Somente as fêmeas de Meliponinae têm o ferrão atrofiado impossibilitando o seu uso (Nogueira-Neto, 1997).

As abelhas Meliponinae, também conhecidas popularmente como Meliponíneos ou abelhas indígenas sem ferrão, estão distribuídas em todas as regiões tropicais, com maior diversidade de formas na região Neotropical (principalmente na região da bacia Amazônica) e Indo-Malaia. No Brasil existem 192 de espécies pertencentes à subfamília dos Meliponinae (Silveira et al., 2002). Já entre os Apinae a única espécie que atualmente habita no Brasil é *Apis mellifera* introduzida em 1839 em colônias vindas do Portugal (Nogueira-Neto, 1997).

A Meliponicultura ou criação de abelhas sem ferrão tem sido desenvolvida por séculos nas Américas. Povos indígenas aproveitavam os produtos dos Meliponíneos muito antes da colonização e da introdução das abelhas melíferas do gênero *Apis* (Cortopassi-Laurino, 2006). O mel dos Meliponíneos é muito valorizado por ser

considerado medicinal e, no mercado pode alcançar preços maiores que o mel de *A. mellifera*. Da mesma forma, a própolis e o pólen dessas abelhas são considerados de valor terapêutico (Bankova et al., 2007; Silva et al., 2006). A Meliponicultura vem ganhando mais atenção no Brasil e no mundo por promover o aumento da renda familiar uma vez que do ponto de vista biológico as abelhas nativas cumprem uma importante função de polinização e de preservação de milhares de espécies vegetais nos trópicos (Imperatriz-Fonseca, 2005; Queiroz-Cámara, 2004).

### **1.1.1. Ecologia da relação abelha-planta**

Estima-se que no Brasil as abelhas sociais provavelmente são responsáveis por 30 a 50% de todas as interações entre plantas e visitantes florais (Biesmejer et al., 2005). Essa relação de mutualismo entre abelhas e plantas é importante porque as abelhas encontram nas plantas suas principais fontes de alimento: o néctar e o pólen, e as plantas se beneficiam pela polinização, isto é, o transporte dos grãos de pólen das anteras de uma flor até o estigma da mesma, ou de outra flor, processo que permite a formação de frutos e sementes e, portanto a preservação de muitas espécies vegetais (Krell, 1996).

As flores altamente adaptadas para serem polinizadas por um grupo de animais tendem a apresentar algum tipo de atrativo em comum para que eles se aproximem dos órgãos produtores (anteras) e receptores (estigmas) de pólen. Estas características são associadas a aspectos do polinizador. A evolução do grupo das abelhas é considerada associada à irradiação das angiospermas, sendo que os dois grupos existem pelo menos desde o final do Mesozóico. Algumas características no corpo das abelhas são consideradas modificações associadas à coleta de recursos

florais, como o aparelho bucal modificado e a presença de corbícula (concaidade no par de pernas posteriores) nas fêmeas. As abelhas são capazes de detectar colorações na região do ultra-violeta, mas não são capazes de distinguir a cor vermelha. Por esta razão, as flores polinizadas podem nunca apresentar coloração exclusivamente vermelha, mas podem apresentar “guias” para a fonte de pólen e néctar que são visíveis sob luz ultra-violeta (Endress, 1994).

Vários estudos têm sido feitos visando determinar as fontes de recursos alimentícios usadas pelos Meliponíneos na região Amazônica (Absy e Kerr, 1977; Absy et al., 1980; Absy et al., 1984; Kerr, Absy e Marques-Souza., 1986; Cortopassi-Laurino, 2004, Marques-Souza, 1993; Marques-Souza, Absy, Kerr, 2007). Em forma similar às outras abelhas sociais, os Meliponíneos são generalistas no uso dos recursos florais, o que lhes permite adaptar-se ao uso das diferentes espécies vegetais disponíveis ao longo do ano. No entanto, os resultados de diferentes pesquisas indicam que independente dessas abelhas visitarem muitas espécies vegetais, só umas poucas formam parte significativa da sua dieta direta. Essa observação é corroborada para várias espécies de Meliponíneos. Absy e Kerr (1980) encontraram que no caso de *Melipona seminigra merrillae* 61 % dos tipos de pólen em amostras de pólen corbicular pertenciam a uma só espécie vegetal. Quando quantificados, um dos tipos é claramente o dominante (46-100 %) e os outros são espécies acessórias presentes em menor quantidade (< 16 %).

Em geral, plantas das famílias Myrtaceae, Melastomataceae, Solanaceae e Leguminosae (Mimosoideae) são fontes muito importantes de pólen e néctar para todas as espécies de *Melipona* nos neotrópicos. Outras famílias de plantas que participam na dieta das Melíponas são Anacardiaceae, Caesalpiniaceae,

Burseraceae, Euphorbiaceae, Guttiferae, Leguminosae (Faboideae) e Moraceae (Ramalho, 1989, Ramalho, 1990). Marques-Souza (1993) observou que durante vários meses a família Myrtaceae foi mais procurada para obtenção de pólen por cinco espécies de abelhas amazônicas. *Myrcia amazonica* e *Myrcia* sp, foram as principais fontes de pólen para *Melipona seminigra merrillae*, *Melipona rufiventris paraensis*, *Melipona compressipes manaosensis*, *Trigona williana* e *Frieseomelitta varia*. Os resultados dessa pesquisa indicaram floração durante todo o ano para as espécies *Myrcia amazônica*, *Eugenia* sp, e *Syzigium jambolanum*. Outras espécies da mesma família, com períodos de floração curtos como *Eugenia patrisii*, Myrtaceae, *Psidium acutangulum*, *Psidium* sp, proporcionam uma fonte alternativa de alimento às abelhas amazônicas durante a diminuição da produção de pólen e néctar nos períodos chuvosos (Marques-Souza, Absy e Kerr., 2007).

### **1.1.2. A abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell 1919.**

A abelha *Melipona seminigra* Cockerell, 1919 pertence à subfamília Meliponinae, tribo Meliponini, gênero *Melipona*. No Estado do Amazonas, *M. seminigra* pode ser encontrada desde Paricatuba (no baixo Purus), ao oeste até a região dos rios Camanaú e Curiaú; na região de Manaus e, ao norte ao longo do rio Negro –porém os limites não são conhecidos- (Peralta et al., 1999).

Essa espécie faz a entrada do seu ninho em forma de trombeta radiada e curta, dando uma característica bem peculiar à espécie, sendo conhecida popularmente como uruçú-boca-de-renda ou jandaíra (Figura 1-2). O número de indivíduos presentes na colônia é de aproximadamente 1300, são pouco agressivas,

produzem mel de ótima qualidade e podem produzir até 3 Litros de mel/colméia/ano (Portugal-Araújo, 1978; Carvalho-Zilse, 2006).

A abelha *Melipona seminigra* se destaca na Amazônia por ter grande importância como polinizadora e dispersora de sementes (Bacelar-Lima, et al., 2006), por ter seus produtos (mel e pólen) utilizados na alimentação e na medicina popular, além de serem vendidos como complementos da renda familiar (Carvalho-Zilse, 2006). No entanto, essa espécie é muito procurada por meleiros (extrativistas) e segundo Kerr (2002) é classificada como presumivelmente ameaçada de extinção, sendo por tanto, a criação em cativeiro uma boa estratégia para sua preservação.



**Figura 1. Entrada de ninho de abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell, 1919**



**Figura 2. Interior de ninho de abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell, 1919**

Estudos indicam que *M. seminigra* é potencial polinizadora de várias espécies vegetais, tais como tarumã (*Vitex cymosa* – Verbenaceae), *Mouriria ulei*

(Melastomataceae), *Aparisthmium cordatum*, *Bellucia grossularioides*, *Cássia grandis*, *Cecropia sp.*, *Leucaena sp.*, *Matayba sp.*, *Miconia myrianthera*, *Myrcia amazônica*, *Tapirira guianensis*, *Stryphnodendron guianensei*, dentre outras (Portugal-Arújo, 1978; Marques-Souza et al., 2002).

## 1.2. O pólen apícola

O pólen das flores é um alimento fundamental na dieta das abelhas, devido à presença de aminoácidos, açúcares, proteínas, vitaminas, minerais e elementos menores que se requerem para o funcionamento reprodutivo e a atividade laboral dentro da colméia (Pernal & Currie, 2000).

O pólen para consumo humano é o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares (Brasil, 2001). O pólen apícola pode ser coletado em duas formas:

1. O uso de armadilhas à entrada da colméia permite a retirada parcial da carga de pólen que as abelhas carregam nas corbículas. O pólen retirado das armadilhas é submetido à secagem e, portanto se denomina “pólen apícola desidratado”.
2. O pólen misturado com mel, enzimas provenientes das secreções hipofaríngeas das abelhas, parcialmente fermentado é recuperado dos potes de armazenamento no interior da colméia e submetido a processos de estabilização. Este produto é conhecido como “pão de abelhas” e no Brasil também é chamado como samora, saburá ou samburá (Figura 3), (Nogueira-Neto, 1997).



**Figura 3. Favos sinalados contendo pólen coletado por abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell, 1919**

Estudos indicam que existem diferenças entre o “pólen apícola desidratado” e o “saborá”. O pólen coletado e conservado nos favos dentro da colméia apresenta em particular, um maior teor de aminoácidos livres. Tem sido proposto que isso acontece devido à adição de enzimas provenientes das glândulas hipofaríngeas das abelhas e à presença de algumas leveduras e bactérias do gênero *Bacillus* que conseguem hidrolisar parcialmente as proteínas do pólen. O pólen armazenado na colméia é um alimento essencial para os processos de cria e de secreção da geléia real (Del Risco, 2008; Nogueira-Neto, 1997;).

A maior parte do pólen de abelhas para consumo humano é obtida de *Apis mellifera*. No entanto, o pólen dos Meliponíneos é muito apreciado na cultura popular, sendo utilizado como alimento e medicamento em comunidades rurais (Kerr et al., 1996; Nogueira-Neto, 1997; Roubik, 1989). Tradicionalmente o pólen apícola é utilizado para combater o retardo no crescimento, envelhecimento, cansaço físico, arteriosclerose, reumatismo e prostatite (Del Risco, 2008).

### 1.2.1. Composição química do pólen apícola

A composição relativa do pólen apícola varia ao longo do ano em função das espécies vegetais visitadas pelas abelhas durante sua coleta, portanto diz-se que sua composição é espécie - específica (Souza et al., 2004; Campos, 2003; Almaraz-Abarca et al., 2007a), dessa forma é de esperar uma variação na composição dos componentes químicos. Vários estudos, especialmente do pólen coletado por *Apis mellifera* têm mostrado uma grande diversidade na composição química como resultado de diferenças nas plantas de origem, e diferentes períodos de coleta (Somerville, 2001). No entanto, de forma geral, o pólen é composto principalmente por proteínas, lipídeos, açúcares, fibras, sais minerais, aminoácidos e vitaminas. No Brasil, o Anexo V da Instrução Normativa No. 3 de 19 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001) estabelece os parâmetros físico - químicos do pólen apícola (Tabela 1).

**Tabela 1. Parâmetros físico-químicos do pólen apícola no Brasil.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Umidade do pólen apícola	Máximo 30,0%
Umidade do pólen apícola desidratado	Máximo 4,0%
Cinzas	Máximo 4,0%; m/m, na base seca
Lipídeos	Máximo 1,8%; m/m, (b.s.)
Proteínas	Mínimo 8,0%; m/m, (b.s.)
Açúcares totais	Máximo 14,5% a 55,0%; m/m, (b.s.)
Fibra bruta	Mínimo 2,0%; m/m, (b.s.)
Acidez livre	Máximo 300 mEq/Kg
pH	4 a 6

Fonte: Brasil, 2001

Em relação ao pólen de Meliponíneos amazônicos – praticamente no único estudo do tipo disponível - Souza et al (2004) avaliaram os constituintes nutricionais do pólen das espécies *Melipona seminigra merrillae* (jandaíra), *Melipona*

*compressipes manaosensis* (jupará) e *Melipona rufiventris paraensis* (uruçú-boca-de-ralo). As amostras apresentaram concentração de proteína entre 15,7 % e 23,8 %; cinzas entre 1,8% e 2,6 %; lipídeos entre 1,9 % e 9,3 %, glicídios entre 24,2 % e 57,4 % expressados como porcentagem em 100 g de amostra *in natura*. Em particular a espécie *M. seminigra* apresentou um valor de proteína de  $23,8 \pm 0,3$  %. A proporção dos diferentes componentes nas amostras indicou que o pólen dessas espécies pode ser considerado como suplemento alimentar de considerável valor nutritivo.

Análises do pólen coletado por *A. mellifera* indicam que a fração protéica contém aminoácidos essenciais como treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, histidina, lisina, arginina e triptofano, uma grande variedade de enzimas, especialmente amilase, invertase, certas fosfatases e transferases, assim como cofactores enzimáticos como biotina, glutatona e NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo). Também estão presentes auxinas, brasinas, giberelinas e quininas. Entre as vitaminas encontram-se a vitamina C, E, vitaminas do complexo B, incluindo niacina, biotina, ácido pantoténico, riboflavina (B<sub>2</sub>) e piridoxina (B<sub>6</sub>). Os minerais principais são K, Na, Ca, Mg, P e S. Entre os elementos traças acham-se: Al, B, Cu, I, Fe, Mn, Ni, Si, Ti e Zn (Krell, 1996; Linskens e Jorde, 1997; Somerville, 2001).

O pólen apícola contém lipídeos em quantidades variáveis. Se o produto vem de plantas anemófilas (cuja polinização se realiza pelo vento) o pólen resulta pobre em lipídeos e apresenta teores próximos a 2,0 %. O teor desses componentes aumenta no caso de plantas entomófilas. A maior fonte de lipídeos está representada pelos componentes da exina (parede externa dos grãos de pólen). Em

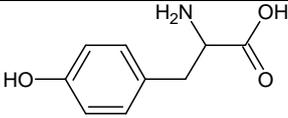
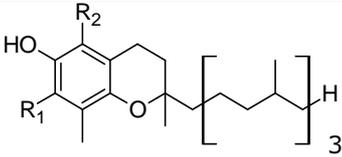
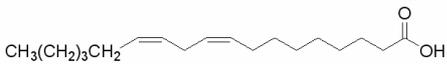
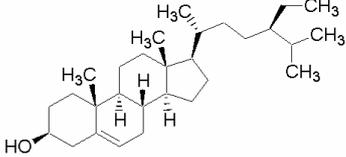
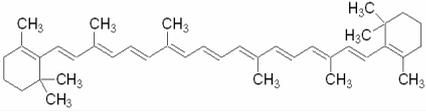
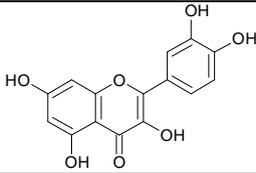
função da sua origem botânica, a diversidade de fração lipídica consiste em fosfolipídeos, glicerídeos, ácidos graxos livres (ácido linoléico, linolênico e araquidônico), esteróides, ceras, vitaminas lipossolúveis e pigmentos. Hidrocarbonetos e terpenos fazem parte de óleos essenciais e conferem o aroma distintivo a certos tipos de pólen (Del Risco, 2008; Krell, 1996). Serra-Bonvehi (1997) estudou pólen de *A. mellifera* com predominância de pólen da espécie vegetal *Cistus ladaniferus* e encontrou que os principais ácidos graxos determinados por cromatografia gasosa corresponderam aos ácidos graxos insaturados C<sub>18:2</sub> (ácido linoléico), C<sub>18:3</sub> (ácido linolênico) e C<sub>18:1</sub> (ácido oléico).

Outros componentes presentes no pólen são os carotenóides (tetraterpenos) e seus derivados oxigenados, as xantofilas. O sistema conjugado de ligações  $\pi$  confere cor aos carotenóides, sendo que alguns tipos de pólen podem tomar deles cores amarela, laranja e vermelha. O procedimento de extração, o efeito do ar e luz (radiação na região de absorção no UV) podem influir no tipo de carotenóides encontrados em certos extratos. Com frequência o pólen contém carotenóides e flavonóides, sendo que a presença dos últimos é uma constante. Os flavonóides também conferem cor a alguns tipos de pólen. As flavonas e isoflavonas conferem cor amarela e as antocianinas conferem cor vermelha e roxa. A presença de carotenóides e flavonóides tem sido relacionada com uma função de proteção de tecidos vegetais contra fatores oxidantes (Dewick, 2002; Harborne, 2001).

Entre os constituintes químicos do pólen de abelhas que são de especial interesse para o ser humano, encontram-se os flavonóides. Polifenólicos e flavonóides estão presentes em muitos alimentos de origem vegetal e durante vários anos têm sido propostos como antioxidantes efetivos. Esses componentes exercem vários benefícios à saúde humana (Scalbert e Williamson, 2000; Hollman, 2001;

Manach et al., 2004; Cieslik et al., 2006). Estudos indicam a presença no pólen principalmente de derivados de ácidos fenólicos, flavonóis glicosilados e flavonas (Almaraz-Abarca, 2007b; Campos et al., 2003; Lins et al., 2003; Silva et al., 2006). A Tabela 2 apresenta algumas das classes de substâncias encontradas em cargas de pólen apícola.

**Tabela 2. Classes de substâncias representativas presentes no pólen apícola.**

Classe de substância	Estrutura da substância	Nome da substância
Aminoácidos livres		Fenilalanina
Vitaminas		R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =Me, α-tocoferol R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =Me, β-tocoferol R <sup>1</sup> =Me, R <sup>2</sup> =H, γ-tocoferol R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H, δ-tocoferol
Ácidos graxos		Ácido linoléico
Esteróides		β-sitosterol
Carotenóides		β-caroteno
Flavonóides		Quercetina

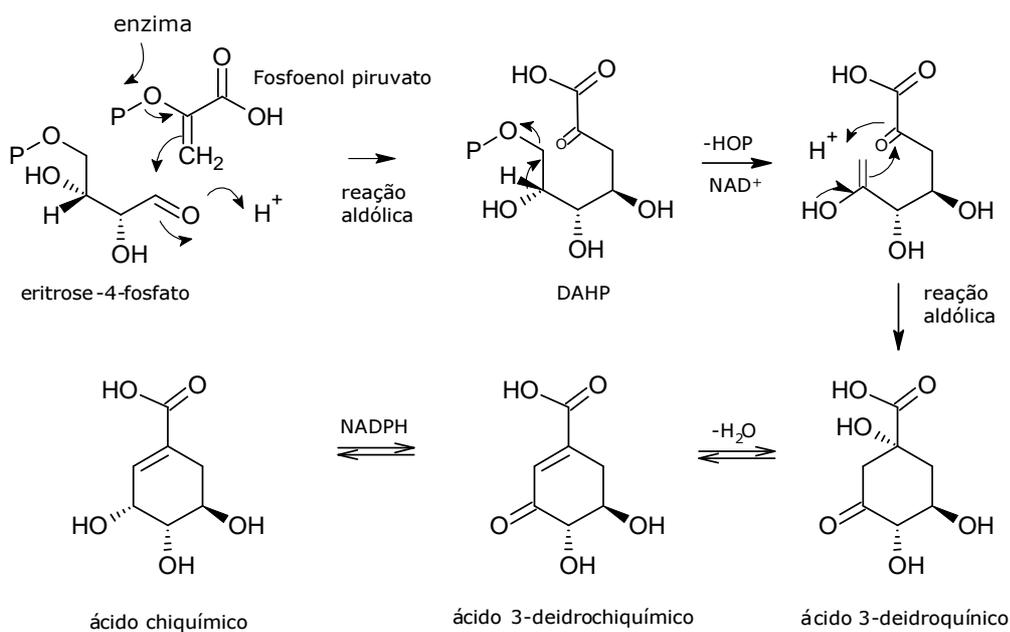
Fonte: Krell, 1996; Linskens e Jorde, 1997; Somerville, 2001

### 1.3. Polifenóis e flavonóides

As substâncias fenólicas pertencem ao grupo de compostos presentes nas plantas conhecidos como metabólitos especiais ou metabólitos secundários. O termo fenólico é usado para indicar a presença de um ou mais substituintes hidroxilicos

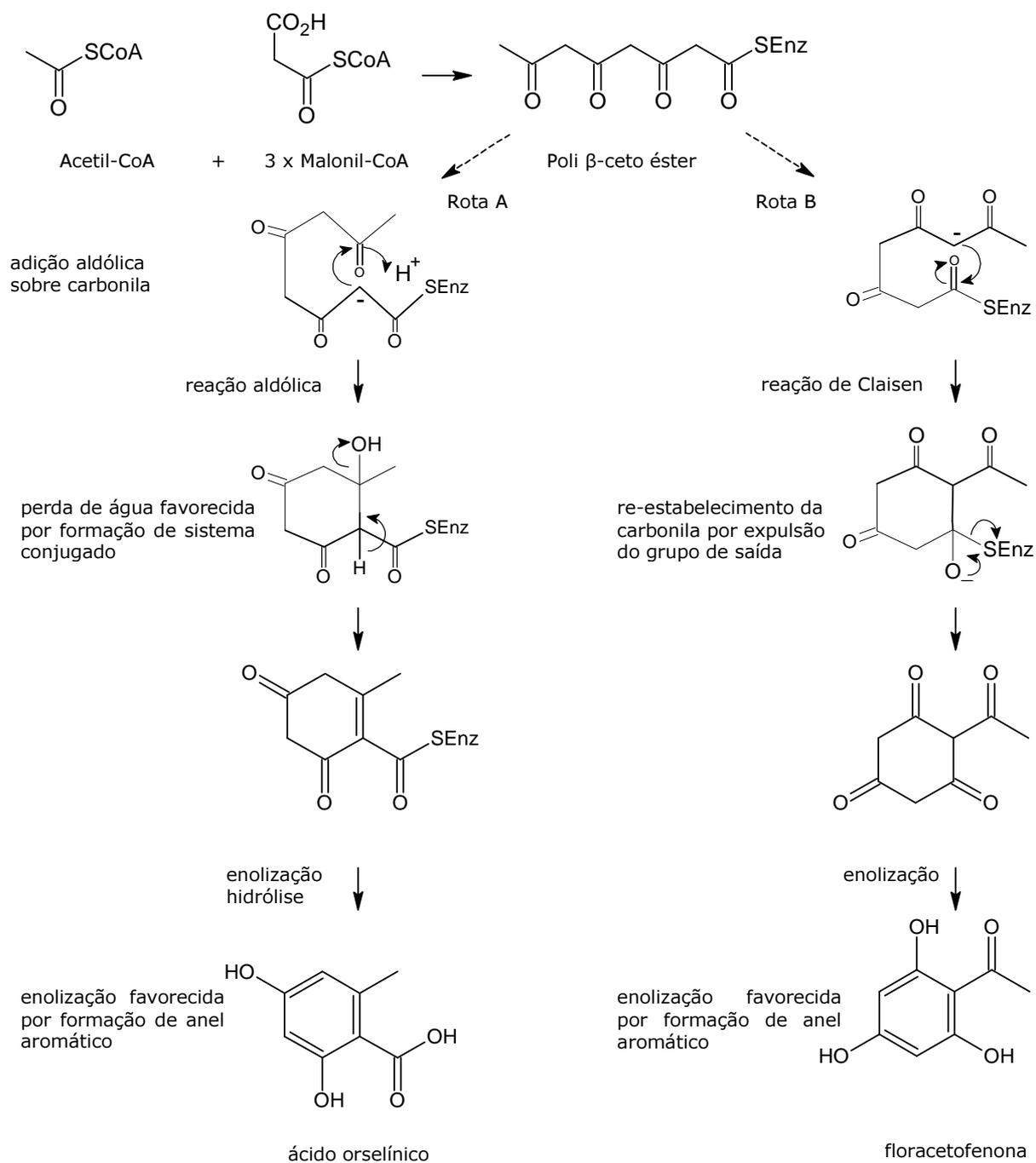
(OH) ligados a um anel aromático em substâncias que ocorrem frequentemente como glicosídeos, combinados com unidades de açúcar. Compostos com vários grupos hidroxilas são nomeados como polifenóis. Os polifenóis estão usualmente presentes em plantas exercendo papel importante na morfologia e fisiologia vegetais, na medida em que estão relacionados a diversos aspectos de crescimento e reprodução vegetal (Bravo, 1998). As substâncias fenólicas desempenham várias funções nas plantas, podendo agir como barreiras estruturais, filtros de luz, sistemas de defesa contra herbívoros/patógenos, atratoras de insetos polinizadores e como promotoras de relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio (Wildman, 2001).

Biossinteticamente as substâncias fenólicas devem sua origem a um ou mais dos três seguintes precursores: eritrose-4-fosfato, fosfoenol piruvato e/ou acetil coenzima A. A eritrose-4-fosfato e o fosfoenol piruvato são responsáveis pela rota do ácido chiquímico (Esquema 1), enquanto o acetil Co-A e sua forma ativada (malonil coenzima A) geram a rota do acetato (Esquema 2).



**Esquema 1. Formação do ácido chiquímico.**  
Fonte: Dewick, 2002

A rota do ácido chiquímico é a mais significativa nas plantas superiores para a síntese de fenóis enquanto que a rota do acetato é predominante em plantas inferiores, fungos e bactérias (Wildman, 2001).

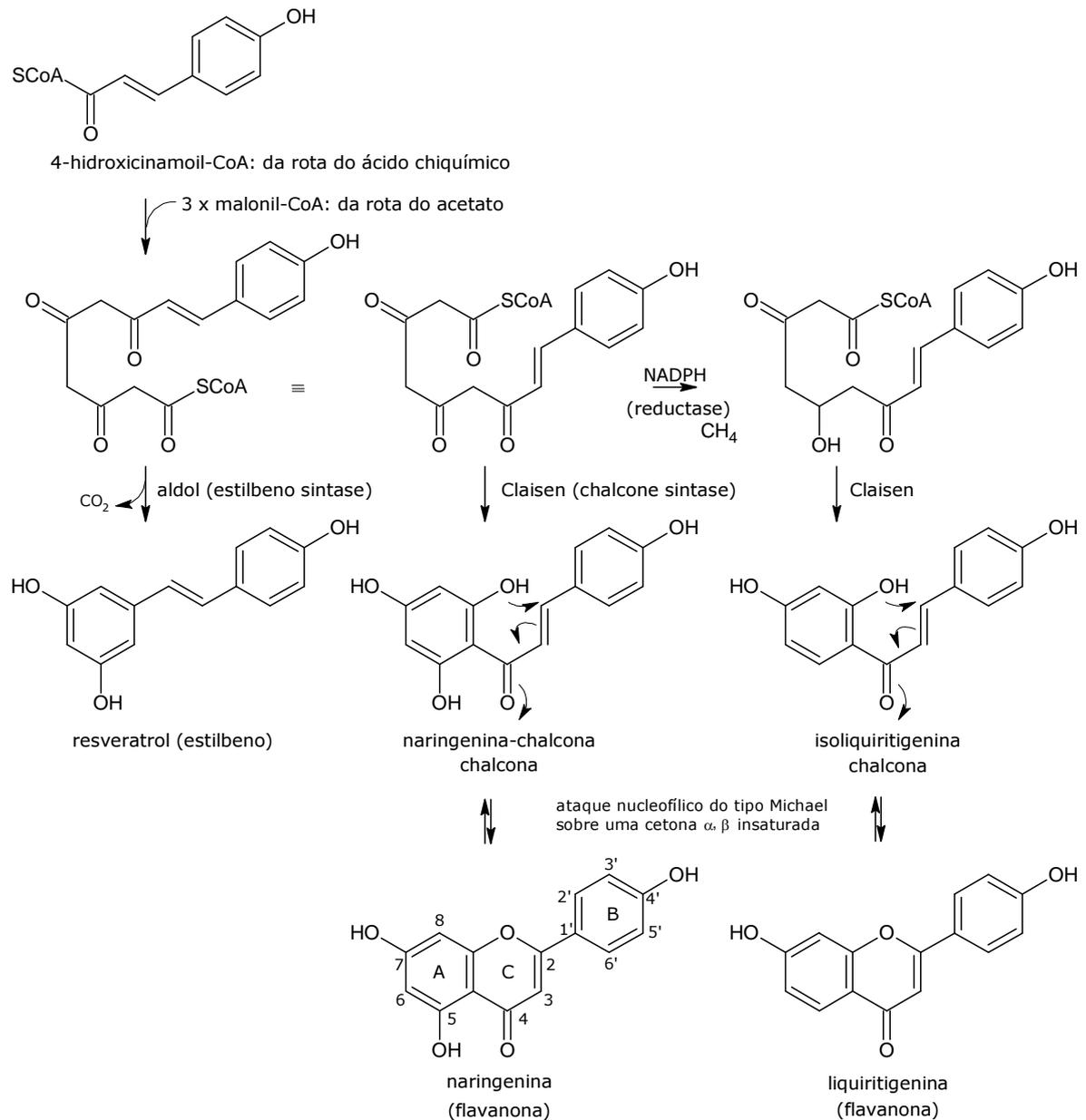


**Esquema 2. Rota do acetato para a formação de substâncias fenólicas simples**  
**Fonte: Dewick, 2002**

Pela rota do ácido chiquímico são sintetizados os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, lignanas, ligninas, fenilpropenos, quinonas e cumarinas. A rota do acetato fornece unidades  $C_2$  ativadas (malonil-CoA) e conduz à formação de fenóis simples, antraquinonas, antranóis e tetraciclinas. A combinação do chiquimato e do acetato, na forma de  $C_6C_3 + (C_2)_n$ , gera uma ampla variedade de classes de substâncias fenólicas como flavonóides, estilbenos, estilpironas, isoflavonóides, flavolignóides e taninos condensados (Dewick, 2002).

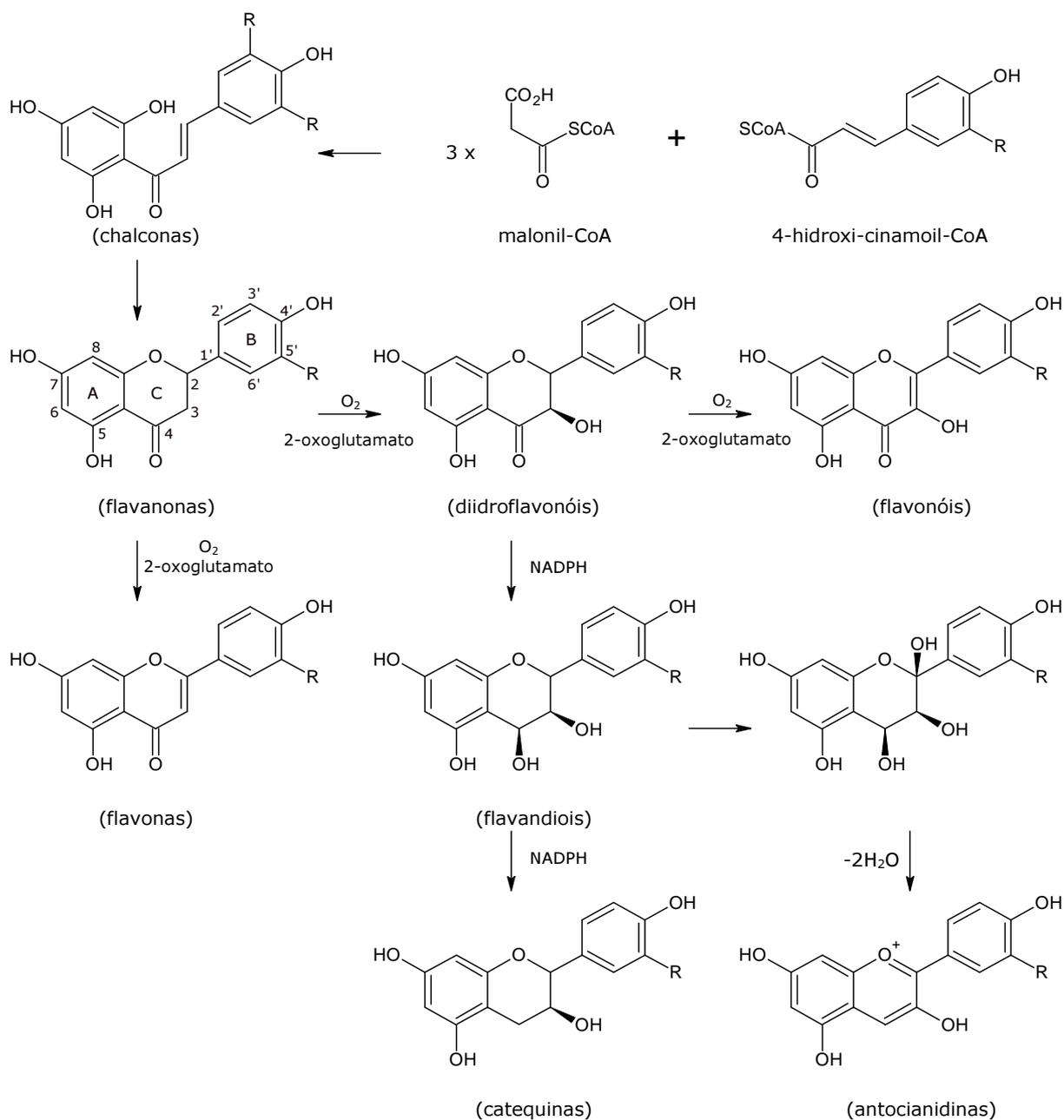
Baseado em sua estrutura química os polifenóis podem ser divididos em pelo menos dez diferentes classes, sendo que as principais são os flavonóides, taninos, ácidos fenólicos e derivados. Dentre essas classes, os flavonóides estão entre os compostos que maior atenção tem recebido devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas como antiinflamatórios, antioxidantes, antimutagênicos e anticarcinogênicos (Narayana et al., 2001; Stalikas, 2007).

A estrutura básica dos flavonóides contém 15 carbonos ( $C_6C_3C_6$ ), com dois anéis aromáticos nomeados A e B. O anel A é derivado da via do acetato enquanto que o anel B e a ponte de 3 carbonos são derivados da rota do ácido chiquímico. O Esquema 3 apresenta a biossíntese dos flavonóides e dos estilbenos a partir de um fenilpropeno ativado, o 4-hidroxi-cinamoil-CoA (derivado da rota do ácido chiquímico) e de 3 moléculas de malonil-CoA (provenientes da rota do acetato) que agem como extensão da cadeia (Dewick, 2002).



**Esquema 3. Biosíntese de flavonóides e estilbenos.**  
**Fonte: Dewick, 2002**

Os flavonóides podem ser encontrados como agliconas livres ou na forma de O-heterosídeos ou C-heterosídeos. Dentre os aproximados 4000 flavonóides já descritos, as maiores classes são flavonóis, flavonas, antocianidinas e isoflavonas. (Cerqueira et al., 2007). Essas substâncias, entre outras, são geradas a partir da oxidação (bem seja adicionando oxigênio ou removendo hidrogênio para formar uma nova dupla ligação) ou da redução (adição de hidrogênio) das chalconas como apresentado no Esquema 4.



**Esquema 4. Biossíntese das principais classes de flavonóides**

Fonte: Dewick, 2002

Os flavonóides variam com o número e a distribuição dos grupos hidroxilas, assim como com o grau de alquilação e glicosilação. Na Tabela 3 são apresentados exemplos de alguns flavonóides representativos.

Tabela 3. Diferentes classes de flavonóides e seus padrões de substituição.

<b>Composto</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>2'</b>	<b>3'</b>	<b>4'</b>	<b>5'</b>
<b>Flavonas</b>							
Apigenina	H	OH	OH	H	H	OH	H
Luteolina	H	OH	OH	H	OH	OH	H
<b>Flavononas</b>							
Naringenina	H	OH	OH	H	H	OH	H
<b>Flavonóis</b>							
Quercetina	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Rutina	O-R	OH	OH	H	OH	OH	H
Kaempferol	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Miricetina	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
<b>Isoflavonas</b>							
Genisteina	-	OH	OH	H	H	OH	H
Daidzeina	-	H	O-Glu	H	H	OH	H

Fonte: Narayana et al., 2001; R: rhamnosil( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)glicose; O-Glu: O-glicose

O interesse da comunidade científica pelos compostos fenólicos aumentou depois da divulgação dos resultados de um estudo epidemiológico realizado nos anos 80 na Europa, que evidenciou a aparente compatibilidade de uma dieta alta em graxas com uma incidência baixa de aterosclerose coronária, atribuída ao consumo regular de vinho tinto e/ou suco de uvas, ambos com um alto conteúdo de flavonóides (“paradoxo francês”) (Núñez-Sellés, 2005; Criqui, 1994). Diversos estudos epidemiológicos posteriores têm sugerido associações entre uma dieta com alimentos ricos em polifenóis e a prevenção de doenças (Harnafi e Amrani, 2007; Scalbert, et al., 2005), por exemplo, o consumo de chá, rico em catequinas pode evitar o câncer (Steinmetz, 1996) e disfunções cardíacas (Tjiburg, 1997), frutas e verduras estão associadas à prevenção de câncer (Steinmetz, 1996; Renaud et al., 1992) e a soja, que contem genisteina e daidzeina pode impedir o aparecimento de câncer de mama e osteoporose (Adlercreutz et al., 1997, Wildman, 2001, Yamaguchi, 2002). A Tabela 4 apresenta a distribuição de alguns compostos fenólicos em alimentos (King e Young, 1999).

Tabela 4. Distribuição de alguns compostos fenólicos em alimentos.

Classes o subclasses	Compostos	Alimentos	Quantidade
<b>Flavonóides</b>			
Flavonóis	quercetina, kaempferol, miricetina	Azeitona	270-830 mg/Kg
		Cebola	347 mg/Kg
		Brócolis	102 mg/Kg
		Feijão	49 mg/Kg
		Chá (preto)	20 mg/L
Flavonas	apigenina, luteolina	Aipo	130 mg/Kg
		Azeitona	6-29 mg/Kg
Flavanóis	catequina, epicatequina	Vinho tinto	274 mg/L
		Maçã	23-30 mg/Kg
Isoflavonas	Genisteina, daidzeina	Soja	888-2407 mg/Kg
		Tofu	280-499 mg/Kg
		Leite de soja	105-251 mg/L
<b>Ácidos fenólicos</b>			
Ácidos hidroxicinâmicos	caféico, ferúlico, clorogênico	Pêra	44-1270 mg/Kg
		Batata	100-190 mg/Kg
		Café	56 g/Kg
Ácidos hidroxibenzóicos	elágico, gálico	Morango	21-89 mg/Kg
<b>Taninos</b>	polímeros de catequina e epicatequina	Lentilha	3800 mg/Kg
		Vinho tinto	2567 mg/L
		Vinho branco	239 mg/L

Fonte: King e Young, 1999.

### 1.3.1. Estresse oxidativo e substâncias antioxidantes

O desenvolvimento e o progresso de múltiplas doenças como aterosclerose, diabetes, câncer, hipertensão, doenças inflamatórias, neurológicas e pulmonares têm sido relacionados com a existência de estresse oxidativo agudo no organismo. O estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes tornam-se insuficientes frente à excessiva produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ROS/RNS). Embora ROS e RNS estejam normalmente envolvidas na regulação de processos fisiológicos, sua excessiva produção leva a modificações em biomoléculas, provocando alterações em suas estruturas e funções. Têm sido relatadas como principais reações *in vivo*, a degradação do DNA e a peroxidação de

lipídeos que compõem as membranas plasmáticas e lipoproteínas (Cerqueira et al., 2007). Vários estudos e revisões têm sido feitos em relação às evidências desses danos e à identificação de biomarcadores (Augusto, 2006; Vasconcelos et al., 2007; Schulz et al., 2000).

De modo geral, os sistemas de defesa antioxidante dos organismos vivos podem ser divididos em três subclasses (Nunez-Sellés, 2005):

i). Mecanismo preventivo: proteínas que têm um núcleo coordenado, como ferro e cobre, ou com a capacidade de se ligar a esses metais, como albumina, metalotioneína, ceruloplasmina (cobre), e ferritina, transferrina, mioglobina (ferro), previnem a produção do radical hidroxil ou minimizam a participação de metais na geração de radicais.

ii). Mecanismo de reparo: Enzimas que reparam ou eliminam bio-moléculas degradadas pelas ROS como por exemplo, as enzimas glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), metionina sulfoxido reductase (MSR), endonucleases e DNA glicosilases.

iii). Mecanismo de seqüestro de radicais: enzimas com a capacidade de capturar excessos de espécies reativas de oxigênio, como exemplo, cita-se a as enzimas catalase (ação sobre  $H_2O_2$ ) e superóxido dismutase (SOD, com ação sobre  $O_2^\bullet$ ); entidades químicas com a capacidade de inibir radicais, por exemplo: ácido úrico, bilirrubina, ácidos graxos poli-insaturados, e substâncias presentes nos alimentos como vitaminas C (ácido ascórbico, com ação sobre ozônio e hidroxila), vitamina E

( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  tocoferol com ação sobre radicais peroxila), carotenóides e certos polifenóis.

A maioria das defesas antioxidantes não enzimáticas não é sintetizada por animais. Devido a isso, essas defesas devem ser obtidas a partir da dieta alimentar. É por essa razão que existe uma relação íntima entre nutrição e defesa antioxidante. O reino vegetal representa uma imensa fonte de substâncias com potencial atividade antioxidante *in vivo*, no entanto é necessário enfatizar que muitas substâncias de origem vegetal podem também apresentar atividade pró-oxidante (Cerqueira, 2007, Nunez-Sellés, 2005). Como exemplo, cita-se o caso do  $\alpha$ -tocoferol que segundo estudos *in vitro*, em doses elevadas pode agir como pró-oxidante, caso não haja concentrações equivalentes de outros antioxidantes para regenerar o radical  $\alpha$ -tocoferila a  $\alpha$ -tocoferol (Cerqueira, 2007).

### **1.3.2. Mecanismos da ação antioxidante**

Espécies de radicais livres como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), radical peroxila ( $LOO^{\cdot}$ ) e óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) são formadas permanentemente nos organismos aeróbios a partir de fontes exógenas ou endógenas. A reatividade destas espécies com biomoléculas é variável, sendo algumas estáveis e pouco reativas como, por exemplo, o radical superóxido e outras altamente reativas, como o radical hidroxila. Existem evidências de que ROS/RNS estão relacionadas com os processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com conseqüências diretas sobre muito processos patológicos (Vasconcelos, et al, 2007).

Muitos dos efeitos benéficos dos polifenóis relacionados à prevenção de diversas enfermidades estão associados à própria natureza química deste grupo de

substâncias. Devido à sua estrutura, polifenóis são em geral bons agentes redutores, e juntamente com outros agentes redutores encontrados na dieta (vitamina C, E e carotenóides) podem proteger os tecidos e as estruturas celulares de danos oxidativos.

Em geral, considera-se que os polifenóis desempenham efeitos benéficos na saúde através de vários mecanismos que incluem: (i) inibição direta de radicais livres, interrompendo, por exemplo, a reação radicalar da peroxidação lipídica, (ii) proteção e regeneração de outros antioxidantes (iii) quelação de íons metálicos, tornando-os indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (Bravo, 1998; Cieslik, 2006).

#### **1.3.2.1. Capacidade de seqüestro de radicais livres**

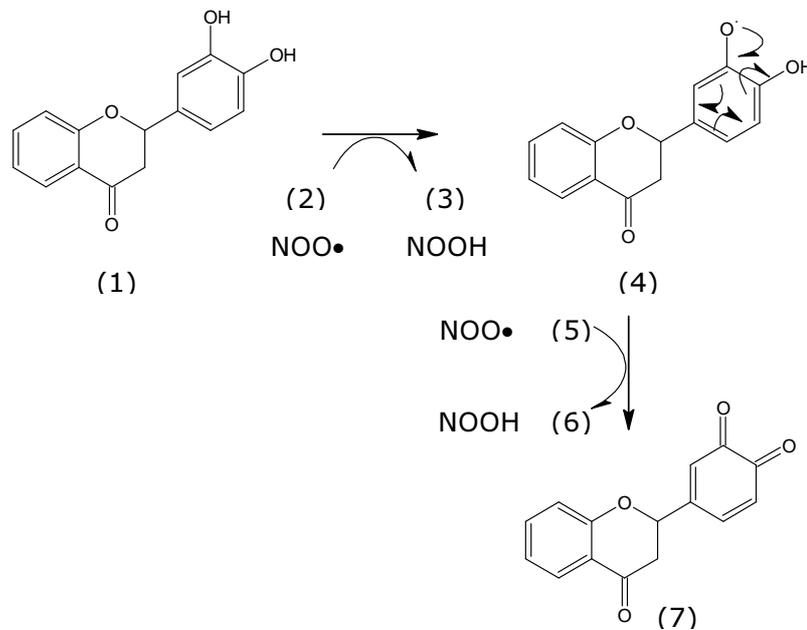
A progressão da peroxidação de componentes lipídicos pode conduzir à formação de hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, peróxidos, epóxidos e aldeídos. Entre esses produtos, alguns exercem efeitos deletérios, como o malonilaldeído e o 4-hidroxinonal, que inativam fosfolipídeos, proteínas e DNA (Cerqueira, 2007; Loureiro et al, 2002).

Os radicais alquilperoxila produzidos pela oxidação de lipoproteínas e ácidos graxos são formados por uma série de reações em cadeia que consiste em três etapas: iniciação, propagação e finalização (Wildman, 2001). A iniciação ocorre pela abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) de um ácido graxo (RH) por espécies radicalares ( $\text{X}\bullet$ ) (1). O radical resultante ( $\text{R}\bullet$ ) por sua vez reage rapidamente com oxigênio molecular para formar radical peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) (2).

O radical peroxila abstrai um hidrogênio de outro ácido graxo insaturado para formar um novo radical e um hidroperóxido de lipídeo (ROOH) (3). Uma vez que um novo radical é formado, a reação ocorre em cadeia, resultando em muitos peróxidos lipídicos a partir da reação inicial. A cadeia de reação termina quando as espécies propagadoras reagem com outros radicais livres ou com substâncias antioxidantes como polifenóis para formar produtos não radicalares (PNR) (4) como aldeídos, cetonas e epóxidos (Loureiro et al, 2002).



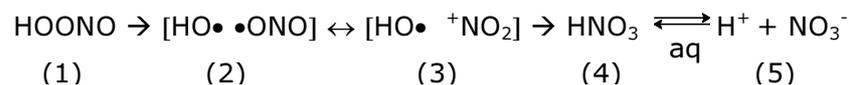
A relação entre a estrutura e a atividade anti-radicalar dos compostos fenólicos tem sido objeto de vários estudos. No caso do radical livre peroxinitrila (ONOO•), espécie química envolvida na aparição de numerosos processos fisiológicos como doenças inflamatórias, aterosclerose, artrite reumatóide, disfunções miocárdiais e diabetes auto-imune, estudos teóricos permitiram propor que os flavonóides agem seguindo o mecanismo apresentado no Esquema 5 (Calgarotto et al., 2007):



**Esquema 5. Mecanismo do seqüestro do radical peroxinitrila por substâncias fenólicas**

O flavonóide 3', 4' dihidroxilado (1), reage inicialmente com o radical livre peroxinitrila (2) para produzir o ácido peroxinitroso (3). O radical flavonóide produzido (4) reage com uma segunda molécula de peroxinitrila (5) e produz outra molécula de ácido peroxinitroso (6) assim como o flavonóide oxidado (7).

O ácido peroxinitroso (1) tem formas de ressonância (2 e 3) que conduzem à formação de ácido nítrico (4). O ácido nítrico em solução aquosa é dissociado em  $H^+$  e  $NO_3^-$ , espécies não tóxicas (5) (Calgarotto et al., 2007).



Embora divergentes, os resultados de vários grupos indicam que certos componentes estruturais como grupos hidroxila e instaurações em posições específicas, ângulos de torção, tamanho da molécula e caráter hidrofóbico, são significativos em relação à atividade antioxidante frente a alvos biológicos

específicos. Em particular, a atividade antioxidante de flavonóides tem sido correlacionada aos grupos hidroxila nas posições 3', 4' do anel B, a dupla ligação em conjugação com um grupo cetônico no carbono 4 do anel C e os grupos hidroxila dos carbonos 5 e 7 do anel A (Calgarotto et al., 2007; Cao et al., Da Silva, et al., 2004; 1997; Dugas et al., 2000; Lien et al., 1999; Rice-Evans et al., 1996). Tem sido proposto que essas características conduzem ao radical flavonóide, formado durante a reação de radicais livres, a uma estrutura relativamente estável sendo que o potencial antioxidante de um flavonóide será determinado por sua possibilidade de gerar um radical estável. No caso dos ácidos fenólicos, a estrutura hidroxifenólica conjugada com a dupla ligação da cadeia de ramificação tem sido proposta como o principal componente da atividade antioxidante (Rice-Evans, 1996).

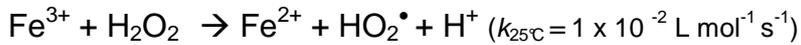
#### 1.3.2.2. Capacidade de quelação de metais

Outro mecanismo de ação antioxidante de substâncias polifenólicas de especial relevância é a capacidade de se ligar a metais tais como íons ferro e cobre, impedindo ou minimizando a participação desses em reações que conduzem à produção de radicais livres.

A reação de Fenton contribui de maneira importante na geração *in vivo* de espécies reativas de oxigênio. Um sistema contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e um sal de Fe(II) é capaz de oxidar diversas moléculas orgânicas. Um mecanismo possível para esta reação é (Aguiar et al., 2007):



De forma paralela à reação de Fenton, traços de Fe(III) também podem reagir com peróxido de hidrogênio, embora esta seja uma reação mais lenta que aquela com Fe (II).



Os sistemas de Fenton são especialmente relevantes em patologias nas quais se verifica o acúmulo de ferro, como por exemplo, a hemocromatose e a  $\beta$ -talassemia, sendo bem conhecida a correlação existente entre estas enfermidades e os efeitos oriundo de danos oxidativos (Mauricio, 2006).

No entanto, é de salientar que a interação dos polifenóis com metais pode conferir aos mesmos uma característica pró-oxidante em alguns casos. Compostos dos grupos dos flavonóides e dos ácidos fenólicos, por exemplo, demonstraram ser antioxidantes inibindo a formação de radicais peroxil e hidroxil em diferentes sistemas oxidantes. Porém na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  os mesmos se revelaram pró-oxidantes (Cao et al., 1997), com a conseqüente geração de espécies químicas que produzem danos em componentes celulares e que estão associadas à aparição de doenças.

### **1.3.3. Métodos de análise da atividade antioxidante**

A capacidade antioxidante de alimentos, nutracêuticos e outros suplementos dietéticos têm recebido atenção recentemente pela indústria, científicos e consumidores devido aos potenciais benefícios para a saúde. A atividade antioxidante tem sido atribuída principalmente à presença de substâncias de baixo peso molecular como carotenóides, tocoferóis, ácido ascórbico e substâncias

fenólicas. Vários testes químicos *in vitro* têm sido desenvolvidos para medir a atividade antioxidante de uma substância (Sun e Tanumihardjo, 2007). Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. Em todos esses ensaios, o radical é gerado ou adicionado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimoluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (Electron Spin Resonance) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (Vasconcelos et al., 2007).

De acordo com a reação química usada, os métodos podem ser agrupados em duas classes: métodos com transferência de hidrogênio e métodos com transferência de elétron. Métodos com transferência de hidrogênio incluem o método de capacidade de absorbância de radicais de oxigênio (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC), o parâmetro antioxidante de seqüestro total de radicais (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter, TRAP) e inibição induzida da auto-oxidação de lipoproteína de baixa densidade (Low Density Lipoprotein, LDL). Métodos com transferência de elétrons incluem o ensaio de poder redutor de Fe(III) (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP), teste do ABTS [radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal diamónico], ensaio da capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, Trolox equivalent antioxidant capacity assay, TEAC) e o método de sequestro do radical livre 2,2'-difênil-1-picrylhidrazilo (DPPH) (Fukumoto e Mazza, 2000; Molineaux, 2004; Sun e Tanumihardjo, 2007; Vasconcelos et al., 2007).

#### 1.3.4. Substâncias antioxidantes em cargas de pólen apícola

Estudos de vários grupos de pesquisa relativas às propriedades antioxidantes de pólen apícola confirmam uma alta atividade anti-radicalar para esse produto. A atividade antioxidante do pólen tem sido correlacionada com a presença de flavonóides e de outros compostos fenólicos (Almaraz-Abarca et al., 2004, Almaraz-Abarca et al., 2007a, Campos et al., 2003, Carpes et al., 2007, Dauguet et al., 1993, Markham e Campos, 1996; Markham et al., 1997; Serra Bonhevi, 2001; Silva et al., 2007; Tomas-Lorente et al., 1992).

No pólen apícola estão presentes principalmente flavonóis glicosilados (Almaraz-Abarca et al., 2004; Almaraz-Abarca et al., 2007a; Campos et al., 2003; Dauguet et al., 1993; Markham e Campos, 1996; Markham et al., 1997; Serra Bonhevi, 2001; Tomas-Lorente et al., 1992), agliconas (Lins et al., 2003; Silva et al., 2007) e ácidos hidroxicinâmicos (Campos, 1997 *apud* Almaraz-Abarca et al., 2003, p.46; Almaraz-Abarca et al., 2004). Além dos flavonóides quercetina, kaempferol, luteolina e seus derivados, flavonóides glicosilados específicos, característicos de alguns pólenes florais como 7 e 8-O-metil-herbacetina-3-O-soforósido têm sido isolados (Markham e Campos, 1996). Os flavonóis O-diglicosilados com ligações glicosídicas 1 → 2, parecem ser compostos exclusivos do pólen já que não têm sido encontrados nos tecidos somáticos (Vogt e Taylor, 1995).

Diferente da maioria das pesquisas, o pólen coletado pelas abelhas sem ferrão *Melipona subnitida* (jandaíra) no Estado da Paraíba e por *Scaptotrigona bipunctata* (canudo), no Estado de Ceará (regiões semi-áridas do nordeste do Brasil), revelaram a presença dos flavonóides selagina, tricetina, isorhamnetina,

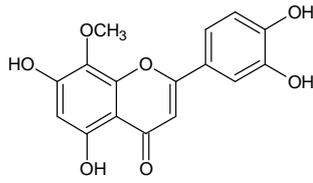
metoxiherbacetina e naringenina no primeiro caso (Silva et al., 2006), e miricetina, diidromiricetina, quercetina e isorhamnetina no segundo caso (Lins et al., 2003), somente na forma de agliconas (Esquema 6). Silva e colaboradores (2006) identificaram nas cargas de pólen coletado por *Melipona subnitida* com predominância de pólen das famílias Mimosaceae e Fabaceae outros compostos como  $\beta$ -sistosterol e D-manitol (Esquema 6), sendo que este último foi encontrado em alta concentração (34,9 % m/m). A atividade antioxidante do extrato/frações do pólen coletado por *M. subnitida* frente ao radical DPPH diminuiu na ordem: fração em acetato de etila > extrato em etanol > fração em hexano, fato que indicou que a fração em acetato de etila, rica em flavonóides é melhor inibidora de espécies reativas de oxigênio.

Carpes e colaboradores (2007) em estudos sobre o pólen coletado por *Apis mellifera* nos estados de Alagoas e Paraná encontraram, respectivamente, 8,1 mg/g e 10,0 mg/g de fenólicos totais (expressos em mg de ácido gálico/g de peso seco). A determinação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos no sistema  $\beta$ -caroteno – ácido linoléico indicou um índice de atividade antioxidante de 83,3% para o extrato do pólen apícola de Alagoas extraído com etanol 70 % e um índice de atividade antioxidante de 81,0 % para o extrato de pólen apícola de Paraná extraído com etanol 60 %.

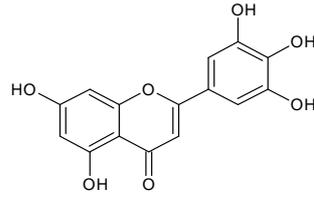
---

**Melípona subnitida**

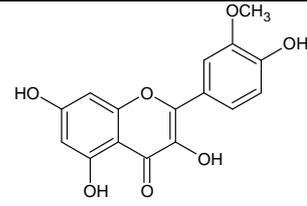

---



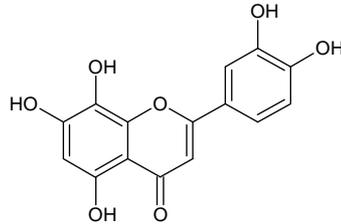
selagina



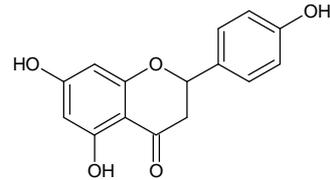
tricetina



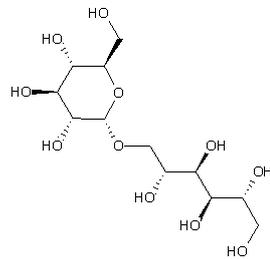
isoramnetina



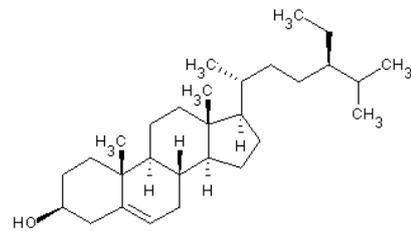
metoxiherbacetina



naringenina



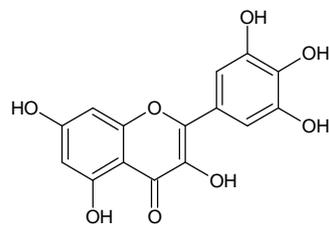
D-manitol

 $\beta$ -sitosterol

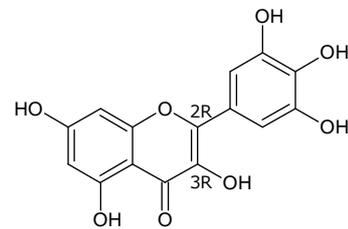
---

**Scaptotrigona bipumctata**

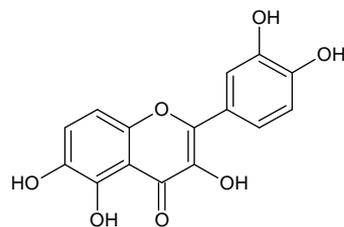

---



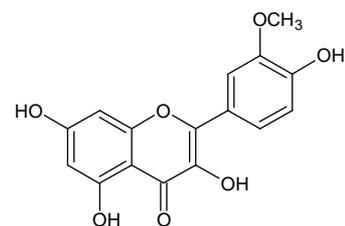
miricetina



diidromiricetina



quercetina



isoramnetina

---

**Esquema 6. Substâncias químicas identificadas no pólen coletado por abelhas sem ferrão da sub-família Meliponinae.**

Nagai et al (2005) investigaram a atividade antioxidante do pólen de *A. mellifera* com predominância da espécie vegetal *Cistus ladaniferus*. A capacidade antioxidante da fração solúvel em água (WSF), fração solúvel em água quente (HWF) e fração solúvel em etanol (ESF) foram testadas através de vários métodos. No teste de auto-oxidação do ácido linoléico, os extratos apresentaram maior atividade antioxidante que o ácido ascórbico (5 mM) e atividade similar àquela do  $\alpha$ -tocoferol (1mM). No ensaio de inibição do ânion radical superóxido através do método da xantina-oxidase as frações solúveis em água (WFS) e (HWF) foram as mais ativas. A inibição do ânion hidroxila com base no método da deoxiribose e a inibição do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH $\cdot$ ) foi maior no caso do ESF.

Altos teores de constituintes fenólicos são frequentemente acompanhados por alta capacidade antioxidante do pólen, no entanto, tal como acontece com outros produtos alimentícios e de acordo com registros de vários pesquisadores (Almaraz-Abarca et al., 2004; Campos et al., 2003; Leja et al., 2007 e Silva et al., 2006; e), não existe uma correlação direta entre flavonóides e atividade antioxidante. O decréscimo gradual da atividade anti-radicalar no pólen armazenado durante quatro anos não foi acompanhado por uma redução paralela de flavonóides e alguns pólenes com alto teor de fenólicos não apresentam atividade anti-radicalar significativa (Campos et al., 2003). Esse fato foi explicado pela heterogeneidade na composição qualitativa dos pólenes apícolas, a presença de substâncias pro-oxidantes, como íons metálicos que estão presentes naturalmente nesses produtos e pela grande variedade de fatores que afetam os ensaios de atividade antioxidante como temperatura, pressão do oxigênio e composição lipídica.

É relevante considerar que: (i) em certas circunstâncias, por exemplo, em presença de íons metálicos, as substâncias polifenólicas podem agir como pró-oxidantes apresentando efeitos nocivos sobre componentes celulares e alvos biológicos; (ii) a atividade antioxidante *in vitro* não necessariamente implica proteção contra danos oxidativos *in vivo* e da mesma forma, pequena atividade antioxidante *in vitro*, não necessariamente significa que um composto não tenha ação antioxidante *in vivo*. Um exemplo ilustrativo é o caso do extrato etanólico do pólen coletado por *A. mellifera* com predominância de pólen da espécie vegetal *Cistus ladaniferus*, que em estudos realizados por Campos et al (2003) apresentou uma atividade antiradicalar frente ao DPPH relativamente baixa ( $EC_{50} > 500$  mg/ml) em comparação com outras substâncias testadas, no entanto, outros estudos demonstraram que o extrato aquoso desse pólen tem um efeito anabólico sobre componentes ósseos em ratos *in vivo* e *in vitro* (atividade anti-osteoporose) em um comportamento único entre os produtos apícolas (Yamaguchi, 2006a; Yamaguchi et al., 2006b).

Além das considerações anteriores, as propriedades biológicas dos polifenóis somente serão aproveitadas se a biodisponibilidade dos mesmos for favorável. A estrutura química dos polifenóis e a composição da microflora intestinal determinam a taxa e a extensão da absorção e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma (Scalbert e Williamson, 2000).

### 1.3.5. Atividade biológica do pólen apícola

#### 1.3.5.1. Atividade anti-bacteriana

Carpes e colaboradores (2007) determinaram o teor de fenóis totais em amostras de pólen de *Apis mellifera* dos Estados de Alagoas e Paraná e encontraram 8,1 mg/g e 10,0 mg/g respectivamente (expressados em mg de ácido gálico/g de peso seco). Extratos etanólicos (soluções de 40, 50, 60, 70, 80 e 90 % de etanol) dos pólenes das duas regiões foram testados frente aos *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* sp utilizando o ensaio de difusão em disco. O crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* foi inibida pelo extrato etanólico do Estado de Alagoas nas concentrações de solvente entre 50 e 80 % e *Klebsiella* sp foi inibida pelo extrato com 90 % de etanol. O extrato etanólico com 60 % de etanol da amostra do estado de Paraná inibiu o *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* sp.

#### 1.3.5.2. Atividade anti-hipertensiva

Estudos *in vitro* (Nagai et al., 2007) têm revelado que extratos enzimáticos de amostras de pólen apícola contendo predominantemente a espécie vegetal *Cistus ladaniferus* L, têm capacidade de inibir a ACE (Angiotensine Converting Enzyme) em forma similar aos alimentos fermentados de soja. Os hidrolisados na concentração de 100 mg/mL apresentaram atividade inibitória (EC<sub>50</sub>) da ACE superior ao 90 %.

### **1.3.5.3. Atividade anti-oxidante *in vivo***

Estudos com animais têm mostrado que o consumo de pólen apícola por ratos diminui o nível dos produtos de oxidação lipídica, malondialdeído (MDA) e dienos conjugados nos eritrócitos, fato que foi correlacionado com a atividade antioxidante do pólen apícola (Campos et al., 2003). As substâncias antioxidantes presentes no pólen exercem um efeito protetor sobre os eritrócitos ao reagirem com os radicais livres e prevenindo as etapas de propagação dando lugar a produtos não reativos.

Almaraz-Abarca e colaboradores (2007a) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de pólen apícola de *Prosopis juliflora* utilizando um sistema *in vivo* por quantificação de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado homogeneizado de ratos intoxicados com bromobenzeno. A atividade antioxidante foi menor à da vitamina E (substância de referência). Os pesquisadores determinaram que em condições *in vivo* e, aquelas onde o estado de oxidação não é induzido, uma alta concentração de flavonóis no extrato de *P. juliflora* pode ter efeitos pró-oxidantes.

### **1.3.5.4. Atividade imuno-estimulante**

Tem sido demonstrada atividade de imuno-estimulação sobre os níveis primários e secundários de IgM (Imunoglobulina M) e IgE (Imunoglobulina E) em coelhos alimentados por um mês com dietas contendo pólen apícola. A atividade tem sido relacionada à presença de antioxidantes presentes no pólen, especialmente flavonóides (Campos et al., 2003).

### 1.3.5.5. Atividade anti-osteoporose

Frações de diferentes pesos moleculares foram obtidas a partir de extratos aquosos do pólen coletado por *A. mellifera* com predominância da espécie vegetal *Cistus ladaniferus* (Hamamoto et al., 2006; Yamaguchi et al., 2006b,). A fração de peso molecular menor que 1000 da foi testada para determinar o efeito sobre a proliferação de células osteoblásticas. Foi determinado um aumento no número de células osteoblásticas e no conteúdo de DNA. Observou-se um efeito inibitório sobre a resorção osteoclástica dos ossos, e um aumento da massa óssea (Yamaguchi et al., 2007a). O consumo do extrato aquoso do pólen apícola de *Cistus ladaniferus* mostrou ter um efeito preventivo na perda de massa óssea em ratas diabéticas e ovariectomizadas, sugerindo que o pólen dessa espécie vegetal tem um efeito na prevenção da osteoporose (Yamaguchi et al., 2007b; Yamaguchi et al., 2007c). Especulou-se que o componente ativo no extrato solúvel em água obtido de pólen de *C. ladaniferus* é transportado no intestino e atua sobre células osteoblásticas nos tecidos ósseos. Foi proposto que se o componente ativo é transportado no intestino, não pode ser uma substância com alto peso molecular. Os extratos analisados tiveram um efeito estimulante sobre a formação de ossos e efeito inibitório sobre a resorção óssea, exibindo um comportamento único entre os demais produtos apícolas. O pólen apícola é usado como um fator nutricional e assim, os pesquisadores sugeriram que seu consumo poderia ajudar na prevenção da perda de massa óssea com o aumento da idade nas mulheres. (Yamaguchi et al., 2007b; Yamaguchi et al., 2007c).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral:

Contribuir com o estudo da composição química e da atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell, 1919 durante as estações de chuva e de seca na cidade de Manaus.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a composição centesimal do pólen *in natura* (proteínas, lipídeos, umidade, cinzas e carboidratos).
- Identificar as principais espécies vegetais presentes nas amostras de pólen *in natura*.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e das frações do pólen através do método do seqüestro do radical livre 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH·) e do ensaio de capacidade redutora de Fe (III) (FRAP).
- Determinar o perfil químico das amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Isolar e identificar os constituintes fenólicos das amostras de pólen.

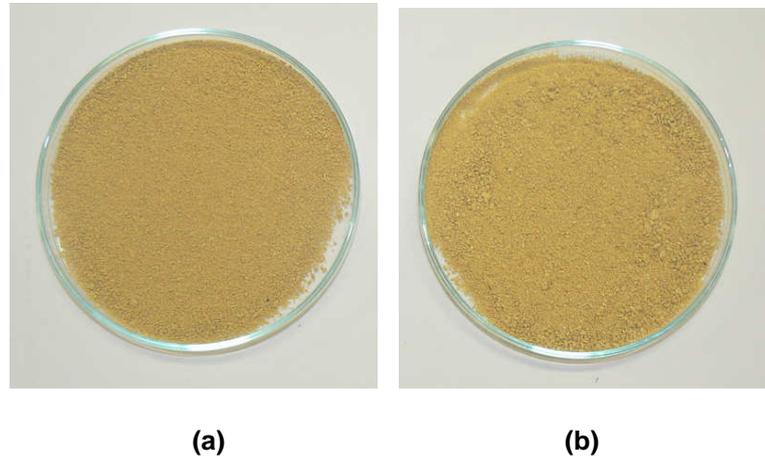
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta do material de trabalho

Duas amostras de pólen foram coletadas das colméias da abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell, 1919, do meliponario do grupo de Pesquisas em Abelhas do INPA, Manaus, Amazonas durante o ano de 2008 em dois períodos diferentes e caracterizados como época de chuva e de seca na região amazônica. A primeira amostra foi coletada no mes de abril com uma pluviosidade de 300 mm (INMET, 2009). Para isso entre três e cinco potes de pólen foram removidos de cinco colméias seleccionadas (102, 105, 115, 146, 153) usando luvas, sacolas e colher de plástico. Os potes foram levados ao laboratório e abertos para separar o pólen da cera. Dessa forma foram coletados 279 g de pólen de cor amarela, consistência pastosa e aroma característico. O material foi armazenado em recipientes de vidro previamente higienizado e transportado em caixa de isopor até a Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. A amostra de pólen foi homogeneizada e liofilizada imediatamente em aparelho Thermo 450 Electron Corporation, MODULYOD-115. O material seco foi mantido sob refrigeração (12 °C) até sua análise e a amostra foi denominada como Mchuva (Figura 4a).

A segunda amostragem foi feita em agosto de 2008, mes caracterizado por uma pluviosidade de 50 mm (INMET, 2009). Entre dois e cinco potes foram removidos de sete colméias seleccionadas (163,165,161, 150, 160, 136, 135) e assim foram coletados 208 g de pólen de cor amarela, consistência pastosa e aroma característico em forma similar ao pólen coletado no mês de abril de 2008. O material foi armazenado, transportado e liofilizado imediatamente em aparelho

Thermo 450 Electron Corporation, MODULYOD-115. O material seco foi mantido sob refrigeração (12 °C) até sua análise e a amostra foi denominada como Mseca, (Figura 4b).



**Figura 4. Pólen liofilizado obtido a partir do pólen coletado por *Melípona seminigra* na cidade de Manaus: a. Pólen coletado durante a estação de chuva (Mchuva); b. Pólen coletado durante a estação de seca (Mseca).**

### 3.2. Análise da composição centesimal

A composição centesimal incluiu a determinação do teor de umidade, proteínas, lipídeos totais, carboidratos totais e cinzas. A análise de umidade foi determinada por liofilização. As proteínas, lipídeos totais e cinzas foram determinados pelos procedimentos propostos pela Instrução Normativa No. 3 de 2001 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2001). Os carboidratos totais foram determinados por subtração.

#### 3.2.1. Umidade

O teor de umidade foi determinado por liofilização em aparelho Thermo 450 Electron Corporation, MODULYOD-115. Os cálculos foram feitos com base na diferença entre a massa inicial e a massa final até se obter peso constante.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(M_f - M_i)}{M_i} \times 100 \% \quad (1)$$

M<sub>f</sub>= Massa final (produto seco)

M<sub>i</sub>= Massa inicial (*in natura*)

### 3.2.2. Proteínas

Os valores para proteína foram calculados a partir dos teores de nitrogênio total determinado pelo método Kjeldahl, segundo a AOAC (AOAC, 1980), usando o fator de conversão de 6,25.

O método Kjeldahl consiste em três etapas:

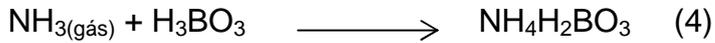
a. Digestão: O nitrogênio orgânico (N) é transformado em sulfato de amônia sob aquecimento, através de reação com ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e uma mistura catalítica que contém sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P.A), selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> P.A) e sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, P.A, isento de Nitrogênio).



b. Destilação: após a digestão o material deixa-se esfriar e adiciona-se uma pequena quantidade de água para lavar as paredes do tubo digestor. Em seguida são adicionados 10 mL de solução aquosa de NaOH (60% m/m) e o tubo se adapta no aparelho de destilação. Nesta etapa ocorre a seguinte reação:



Cinquenta mililitros (50 mL) do destilado são adicionados a um erlenmeyer contendo 10 mL de solução saturada de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). Esse ácido é utilizado para a adsorção da amônia. Equação (4).



c. Titulação: a solução é titulada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,1 N) até a viragem da cor do indicador verde de bromocresol ( $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ , P.A.). A porcentagem de Nitrogênio total se calcula utilizando a Equação (5).

$$\% \text{ Nitrogênio total} = \frac{(V \times 0,0055)}{M} \times 100 \% \quad (5)$$

V=Volume gasto de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N

M=massa da amostra em gramas

A porcentagem de proteína da amostra é calculada através da multiplicação do resultado anterior pelo fator de 6,25, utilizado para calcular proteínas em alimentos que não possuem um fator de conversão específico (como no caso do pólen apícola) (TACO, 2006).

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrogênio total} \times 6,25 \quad (6)$$

### 3.2.3. Lipídeos totais

O teor de lipídeos totais foi determinado com o método de Bligh-Dyer (Bligh; Dyer, 1959), que é aplicável a qualquer tipo de alimento sempre que este não apresente um teor de umidade superior a 10 %.

O procedimento consiste em pesar 3,0 g de amostra homogeneizada seguida por adição de 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. A amostra é extraída com agitação durante 30 minutos. Depois disso, são agregados 10 mL mais de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio a 1,5 % com agitação vigorosa. A solução deixa-se em repouso para separar as camadas (3) naturalmente. A solução metanólica (superior) é descartada. A fase em clorofórmio é filtrada utilizando-se papel filtro qualitativo (adicionar 1 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Uma alíquota de 5 mL é transferida para um bécker de 50 mL previamente tarado. O solvente é evaporado em estufa a 100 °C. Depois de 45 minutos a amostra é esfriada em dessecador e pesada. A diferença de massas é utilizada para calcular a porcentagem de lipídeos totais utilizando a equação (7)

$$\% \text{ Lipídeos totais} = \frac{\text{ML (g)} \times 4}{\text{Mi (g)}} \times 100 \% \quad (7)$$

ML= Massa de lipídeos (g)

Mi= Massa inicial da amostra (g)

### 3.2.4. Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 600 °C por 2 horas e 30 minutos, de acordo com a AOAC (1980). A diferença de massa inicial e final é utilizada para o cálculo das cinzas (Eq 8).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{N}{M} \times 100 \% \quad (8)$$

N= Massa das cinzas (g)

M= Massa inicial da amostra (g)

### 3.2.5. Carboidratos

O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, proteína, lipídeos totais e cinzas (Equação 9), (TACO, 2006).

$$\% \text{ carboidratos} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídeos} + \% \text{ cinzas}) \quad (9)$$

### 3.2.6. Cálculo do teor energético

A energia alimentar é expressa em kilocalorias (kcal). O valor energético é calculado a partir dos teores em proteínas, lipídeos e carboidratos, utilizando os coeficientes que levam em consideração o calor de combustão para cada um desses grupos de compostos. Foram utilizados os coeficientes de 4, 4 e 9 kcal/g, respectivamente, para proteínas, carboidratos e lipídeos (TACO, 2006).

$$\text{Kcal} = (4 \times \text{g proteína} + 4 \times \text{g carboidratos} + 9 \times \text{g lipídeos}) \text{ Kcal/g} \quad (10)$$

### **3.3. Análise da origem botânica**

Amostras de pólen liofilizado (2,0 g) foram submergidas em ácido acético glacial e os sedimentos foram preparados para análise palinológica usando o método de acetólise de Erdtman (Salgado, 1971), que consiste na hidrólise ácida aplicada aos grãos de pólen através de uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico (9:1). Este elimina o conteúdo celular e facilita a visualização e o reconhecimento dos caracteres morfológicos. Para cada amostra foram montadas várias lâminas de parafina e observadas sob microscópio. Entre 500 e 600 grãos de pólen foram contados para estabelecer as freqüências dos tipos de pólen. Os tipos de pólen foram identificados pela Dra. Maria Lucia Absy por comparação com lâminas da palinoteca do Laboratório de Palinologia do INPA, Manaus, Amazonas.

### **3.4. Obtenção de extratos**

Os extratos das duas amostras de pólen apícola coletadas durante a estação de chuva e de seca (abril e agosto de 2008) foram obtidos a partir do material liofilizado.

#### **3.4.1. Extratos etanólicos**

Para a preparação dos extratos etanólicos, uma quantidade de 45,0 g de pólen seco foi extraída com etanol absoluto quatro vezes (relação pólen/solvente 1:10 m/v) em banho de ultra-som durante 15 minutos seguida por maceração

durante 1 dia. Os sobrenadantes foram filtrados sob vácuo e posteriormente centrifugados a 8000 rpm a 20 °C. Os extratos foram concentrados a pressão reduzida (temperatura máxima de 45 °C), secos em estufa a 40 °C e liofilizados, quando necessário. O teor de extrativos (TE) foi calculado dividindo-se a massa final do extrato etanólico seco (g) pela quantidade inicial de pólen seco (g), (Eq 11). Os extratos em etanol foram codificados como Mchuva-EE e Mseca-EE.

$$\%T.E = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \% \quad (\text{Eq 11})$$

$M_f$  = Massa de extrato etanólico seco

$M_i$  = Massa inicial pólen seco

### 3.4.2. Extratos aquosos

Para a preparação dos extratos aquosos, uma quantidade de 10,0 g de pólen seco foi extraída com água destilada quatro vezes (relação pólen/solvente 1:10 m/v) em banho de ultra-som durante 15 minutos seguida por maceração durante 1 dia. Os sobrenadantes foram filtrados sob vácuo e posteriormente centrifugados a 8000 rpm a 20 °C. Os extratos foram secos por liofilização. O teor de extrativos (TE) foi calculado dividindo-se a massa final do extrato aquoso seco (g) pela quantidade inicial de pólen seco (g), (Eq 12). Os extratos aquosos foram codificados como Mchuva-AQ e Mseca-AQ.

$$\%T.E = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \% \quad (12)$$

$M_f$  = Massa de extrato aquoso seco

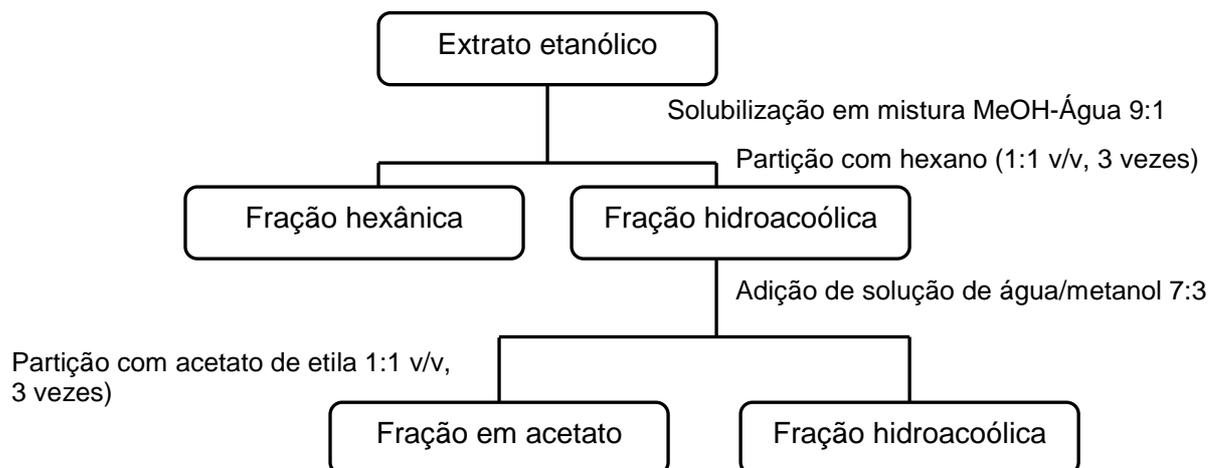
$M_i$  = Massa inicial pólen seco

### 3.4.3. Extratos metanólicos

Para a preparação dos extratos metanólicos, uma quantidade de 1,0 g de pólen seco foi extraída com 10 mL de metanol a 60 °C durante cinco minutos. O sobrenadante foi filtrado e os extratos codificados como Mchuva-ME e Mseca-ME (Wagner; Bladt, 1996).

### 3.5. Fracionamento dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos foram solubilizados em mistura metanol/água 9:1, (relação massa/solvente 1:32) e fracionados através de partição líquido-líquido em funil de separação com hexano por três vezes. A seguir adicionou-se água à fração hidroalcoólica para obter uma solução Metanol/Água 7:3. Esta solução foi extraída com acetato de etila por três vezes. Após evaporação a pressão reduzida e liofilização obtiveram-se a fração hexânica (Mchuva-HX, Mseca-HX), acetato de etila (Mchuva-AC, Mseca-AC), e hidroalcoólica (Mchuva-HA, Mseca-HA), (Esquema 7), (Silva et al., 2006).



**Esquema 7. Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos obtidos a partir do pólen de *Melipona seminigra*.**

Os extratos aquosos e etanólicos, juntamente com as frações geradas no fracionamento líquido-líquido dos extratos em etanol foram submetidos à caracterização por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), análise do teor de fenólicos totais, testes *in vitro* de atividade antioxidante (capacidade de seqüestro do radical livre DPPH· e capacidade de redução de Fe (III)). Os extratos em metanol foram analisados por CCDC.

### **3.6. Perfis cromatográficos por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)**

#### **3.6.1. Reagentes e solventes**

Os solventes utilizados no trabalho foram previamente purificados por destilação fracionada e quando necessário foram tratados com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para retirar o excesso de umidade após a destilação.

#### **3.6.2. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) – Fase Normal**

Análise de componentes apolares: Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica-gel 60, em fase normal, com indicador de fluorescência  $F_{254}$  (Merck), com altura de eluição de 10 cm. A fase móvel consistiu em uma mistura de hexano/éter etílico/ácido acético (80:16:4). A distância de eluição desde a origem foi de 9 cm e a análise foi feita sob condições de saturação da cuba cromatográfica. Aplicaram-se 2,0  $\mu\text{L}$  dos extratos/frações na concentração de 25 mg/mL. Utilizou-se o ácido fosfomolibdico em solução etanólica como revelador geral e cloreto férrico como revelador específico para substâncias fenólicas.

### 3.6.3. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) – Fase Reversa

Análise de componentes polares: Foram utilizadas cromatoplaças de sílica modificada em fase reversa (RP-18), com indicador de fluorescência F<sub>254</sub> da Merck, com altura de eluição de 10 cm. A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol e água acidificada com ácido trifluoroacético (pH 2,0) na proporção 7:3. A distância de eluição desde a origem foram 9 cm e a análise foi feita sob condições de saturação da cuba cromatográfica. Aplicaram-se 2 uL dos extratos/frações na concentração de 25 mg/mL. Utilizou-se NP-PEG como revelador específico para flavonóides.

### 3.6.4. Revelação de placas em CCDC

Para análise do perfil cromatográfico das amostras por CCDC foram utilizados como reveladores: irradiação de luz UV (254 nm e 365 nm); solução de anisaldeído e ácido sulfúrico alcoólico a 10 % aquecido a 110 °C, solução de FeCl<sub>3</sub> alcoólico a 1 %. Para revelação dos lipídeos foi utilizada uma solução de ácido fosfomolibdico a 10 % em metanol. Como revelador específico de flavonóides foi utilizada uma solução alcoólica de éster do ácido aminoetil-difenil-bórico (NP) a 10 %, seguido por solução alcoólica de polietilenglicol (PEG) a 5 % sob luz UV (366 nm).

### 3.7. Análise da atividade antioxidante

#### 3.7.1. Análise de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada mediante a metodologia espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu (Velioglu et al., 1998) utilizando ácido gálico como padrão de referência.

Preparo da curva de calibração com ácido gálico: Foi preparada uma solução mãe de ácido gálico na concentração de 1,0 mg/mL e a partir dela foram obtidas soluções de 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL por diluição sucessiva.

Preparo das amostras: Foram preparadas soluções de cada extrato/fração na concentração de 1,0 mg/mL.

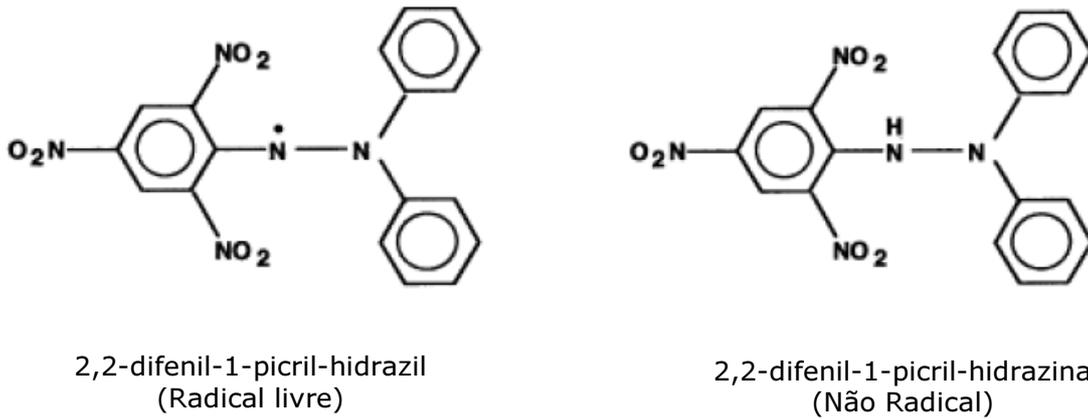
Reagentes: Foi preparada uma solução de bicarbonato de sódio 6,0 % em água Milli-Q e uma solução de reagente Folin-Ciocalteu (10,0 % v/v) em água Milli-Q.

Metodologia: O ensaio consiste em transferir 200 µL da solução padrão de ácido gálico, extrato ou fração para um frasco âmbar e adicionar 1,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10,0 % m/v, em água purificada) recém preparado, após cinco minutos são adicionados 1,5 mL de solução tampão de bicarbonato de sódio (6,0 %). As amostras são incubadas durante 90 minutos em ausência de luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/Visível Femto 800XI a 725 nm. Como branco utilizou-se água Milli-Q.

Cálculo do teor de fenólicos totais: Uma curva de calibração foi construída a partir dos dados de absorvância obtidos das soluções padrão de ácido gálico. O coeficiente de regressão linear foi determinado pelo método de mínimos quadrados. Através da interpolação dos valores de absorvância dos extratos e das frações na curva de calibração, calcula-se o teor de fenólicos totais expressos em gramas (g) de ácido gálico por mL de solução (AG g/mL). O teor de fenólicos totais nos extratos etanólicos e aquosos foi determinado levando em consideração a massa inicial de pólen seco e os rendimentos durante o processo extrativo, de tal forma que o resultado foi expresso em gramas de ácido gálico por grama de pólen seco (AG g/g pólen seco).

### **3.7.2. Teste da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH.**

A determinação da capacidade de sequestro de radicais livres foi feita utilizando o método de Blois (1958) modificado por Brand-Williams (1995) que utiliza o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH $\cdot$ ). Esse radical é caracterizado por ser estável devido ao deslocamento de um elétron não compartilhado sobre a molécula como um todo. O radical DPPH $\cdot$  apresenta coloração roxa profunda e máximo de absorção em 517 nm. Quando a solução de DPPH $\cdot$  reage com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio (reduzidor ou substância antioxidante) passa à forma reduzida e perde a coloração característica (Figura 8). O ensaio reproduz assim, as reações que ocorrem em um sistema oxidante. Os resultados são apresentados comumente como a concentração (massa) de substrato que causa 50 % de perda da atividade (cor) do radical DPPH $\cdot$ , (% CS<sub>50</sub>, em  $\mu\text{g/mL}$ ), (Molineux, 2004; Brand-Williams et al., 1995; Braça *et al.*, 2002).



**Esquema 8. Estruturas das formas radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e sua forma reduzida.**

Ensaio preliminar:

Foi necessário fazer um ensaio preliminar para determinar a faixa de concentrações de cada extrato e fração na qual se tem uma resposta linear da concentração em função da absorbância e que por tanto, permite estimar a % CS<sub>50</sub>. Para isso aplicou-se a metodologia indicada:

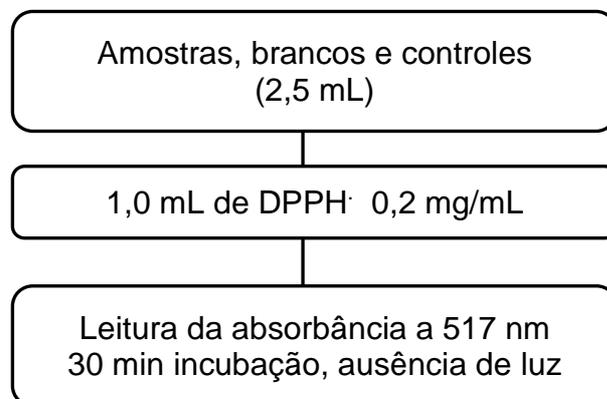
- Preparo das amostras: Foram preparadas soluções-mãe de cada extracto e fração em metanol grau HPLC na concentração de 1,0 mg/mL.
- Preparo de diluições de prova: A partir das soluções-mãe foram feitas duas diluições, uma de 0,25 e outra de 0,025 mg/mL.
- Preparo da solução de DPPH: Foi preparada uma solução de DPPH em metanol na concentração de 0,2 mg/mL. A solução foi preparada no momento da análise.
- Leitura de absorbância: 2,5 mL de cada extrato ou fração (na concentração de 0,25 e 0,025 mg/mL) foram misturados com 1,0 mL de solução de DPPH. A absorbância de cada solução foi lida em 517 nm em espectrofotômetro Femto 800 XI depois de 30 minutos de incubação em ausência de luz.

Com os valores da absorvância estimou-se a faixa de trabalho, que consistiu em uma série de diluições (pelo menos cinco diluições) para cada extrato ou fração.

Determinação da atividade antioxidante:

- Amostras: A partir das soluções-mãe de cada extrato e fração foram preparadas series de diluições em metanol grau HPLC (pelo menos cinco diluições).
- Branco: como branco utilizou-se 2,5 mL da solução mais concentrada de cada sequencia de diluição.
- Controle positivo: Utilizou-se a quercetina como padrão de referência da atividade antioxidante. Para isso foram preparadas soluções metanólicas de quercetina de 20; 10; 5,0; 2,5 e 1,25 µg/mL por diluições sucessivas a partir de uma solução-mãe de 1,0 mg/mL.
- Controle negativo: como controle negativo foi utilizado 2,5 mL de metanol grau HPLC.
- Solução de DPPH: Foi preparada uma solução de DPPH· em metanol na concentração de 0,2 mg/mL. A solução foi preparada no momento da análise.

Procedimento:



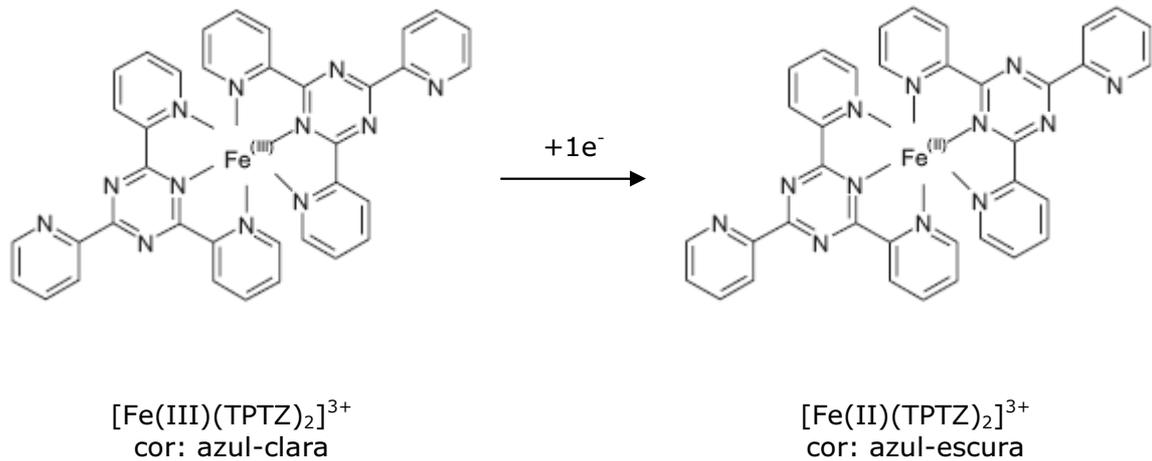
Cálculo da atividade antioxidante: As absorvâncias em 517 nm foram convertidas em porcentagem da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH· (%CS) usando a seguinte fórmula (Eq. 13).

$$\%CS = 100 - \left( \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100}{A_{\text{controle}}} \right) \quad (13)$$

Com os valores de % CS calculados foram construídos gráficos da %CS para cada série em função da concentração e dessa forma obteve-se a equação da reta para o cálculo da %CS<sub>50</sub> (µg/mL).

### **3.7.3. Teste da atividade antioxidante pela capacidade redutora do Ferro -Fe<sup>3+</sup>- (FRAP)**

O método FRAP (“ferric reducing/antioxidant power assay”), determina a capacidade redutora de Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup> das substâncias antioxidantes, via avaliação da redução do complexo [Fe<sup>3+</sup>(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> (ferritripiridiltriazina) a ferroso-tripiridiltriazina [(Fe<sup>2+</sup>-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (Esquema 9). A reação é observada pela coloração azul do complexo [(Fe<sup>2+</sup>-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> com um máximo de absorção em 595 nm (Benzie, et al., 1996; Luximon-Ramman, 2002). Os valores são expressos em mM de Fe<sup>2+</sup> por g de peso seco.



**Esquema 9. Estruturas do TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe (II) e Fe (III).**

Curva de calibração de sulfato ferroso ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): A partir de uma solução de sulfato ferroso na concentração 2 mM foram preparadas soluções de 1000, 500, 250 e 125  $\mu\text{M}$ .

Preparo das amostras: Foram preparadas soluções de cada extrato/fração em MeOH grau HPLC na concentração de 1,0 mg/mL.

Preparo dos reagentes: O reagente FRAP consiste na mistura de uma solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM, uma solução de TPTZ [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] 10 mM e uma solução de tampão de HOAc/  $\text{O}^- \text{Ac}$  0,3 M pH 3,6 na proporção 1:1:10.

Metodologia: 100  $\mu\text{L}$  da amostra foram transferidas para um frasco, depois adicionados 300  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q seguido de 3,0 mL do reagente complexante FRAP. Após 4 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro Femto 800 XI em 595 nm.

Cálculo da concentração de Fe<sup>2+</sup>: Os valores da concentração em  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup> foram obtidos por interpolação na curva de calibração de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O. Os valores de capacidade de redução de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> são expressos em  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup>/g extrato seco.

### **3.8 Perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Várias revisões têm sido publicadas sobre a aplicação de metodologias à análise de compostos fenólicos (Stalikas, 2007). Em particular, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência vem sendo aplicada à obtenção do perfil químico de amostras de pólen apícola (Campos et al., 2008). As colunas em fase reversa são as mais utilizadas porque apresentam melhor separação das diferentes classes de fenólicos. Quase exclusivamente são utilizadas fases estacionárias do tipo C<sub>18</sub>, de 100 até 250 mm de comprimento, diâmetro interno de 3,9 até 4,6 mm e tamanho de partícula entre 3 e 10  $\mu\text{m}$ . Uma melhor simetria de picos, maiores resoluções e eficiências de coluna são obtidas através de do uso de sílicas com grupos silanois residuais mínimos (“endcapped”) sobre a superfície (Stalikas, 2007).

A análise de extratos brutos contendo substâncias fenólicas como no caso de extratos orgânicos de pólen apícola pode diminuir o tempo de vida da coluna. Nestes casos faz-se necessário o uso de uma pré-coluna contendo a mesma fase estacionária e o desenvolvimento de metodologias de “clean-up” ou pré-purificação (Stalikas, 2007).

O desenvolvimento de metodologias padronizadas para análise de extratos e frações do pólen apícola de abelhas sem ferrão utilizando a técnica por CLAE é importante porque permite:

- Monitorar a composição química de extratos
- Comparar a composição química de extratos de diferentes períodos de coleta
- Avaliar a ocorrência de componentes que podem ter atividade específica (Campos et al., 2003)
- Avaliar alterações químicas durante a estocagem
- Confirmar a identidade botânica (Almaraz-Abarca, et al., 2007a; Campos et al., 2003)

### **3.8.1. Sistema cromatográfico**

Equipamento: As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido SHIMADZU Prominence LC-20A, equipado com um injetor automático SIL-20A, detector UV-VIS-DAD SPD-M20A, bomba quaternária LC-10AT Vp e software LC Solutions.

Coluna: Foi utilizada uma coluna LiChrospher® 100 RP-18 “endcapped” com tamanho de partícula de 5 µm, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno.

Fase Móvel: Utilizaram-se gradientes não lineares de Água Milli-Q/TFA pH 2,0 e ACN com fluxo de 1,0 mL/min para o desenvolvimento de gradientes exploratórios assim como para os sistemas que permitem a resolução dos componentes. A água acidificada foi preparada por adição de TFA concentrado à água purificada Milli-Q. O pH foi ajustado a pH 2,0. Volume de injeção de 50 µL. O tempo de corrida foi de 35 minutos para os gradientes exploratórios e de 75 minutos para a obtenção dos perfis químicos. A detecção foi feita a 254, 280 e 354 nm.

### 3.8.2. Pré-tratamento das amostras

Foram realizadas análises cromatográficas em camada delgada comparativa em fase reversa com os extratos etanólicos e as frações em acetato de etila utilizando como fase móvel uma mistura de MeOH e água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) a pH 2,0 na proporção 7:3 e como revelador FeCl<sub>3</sub>. As placas revelaram a presença de substâncias que são fortemente retidas na fase estacionária (origem) e que não tem caracter fenólico. Por tanto, para liberar os extratos dos componentes mais apolares que podem danificar a coluna se desenvolveu um pré-tratamento de purificação por extração em fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE), utilizando cartuchos SEP-PAK com sílica modificada C18 (comprimento= 1,0 cm, marca Waters Associates).

Foram feitos vários ensaios modificando variáveis que influenciam o processo de extração em fase sólida como: a quantidade de massa do extrato/fração aplicada, a forma de solubilização da amostra, o volume da fase móvel, o pré-acondicionamento do cartucho e a velocidade de eluição.

Massa de extrato: A massa do extrato aplicada no cartucho variou entre 5 e 10 mg.

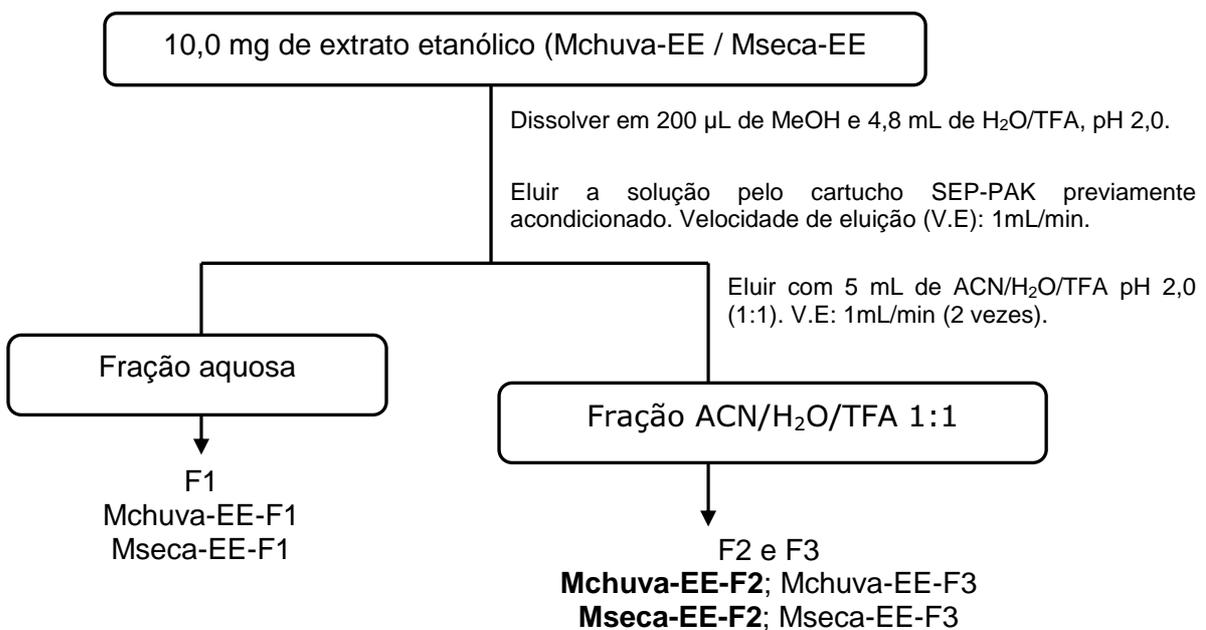
Forma de solubilização da amostra: As amostras foram solubilizadas em (i) MeOH-HPLC (ii) MeOH- H<sub>2</sub>O-TFA em proporções variáveis (iii) Acetona.

Pré-acondicionamento do cartucho SEP-PAK C18: O cartucho foi acondicionado por lavagem com 10 mL de acetona destilada e secagem. Após isso, eluíram-se 6 mL de MeOH grau HPLC e 6 mL de Água /TFA pH 2,0.

Volume de eluição e coleta: O volume de cada fase móvel que consegue eluir a totalidade dos componentes de cada faixa de polaridade foi determinado eluindo quantidades variáveis de solvente entre 2,0 e 5,0 mL. As fases móveis empregadas para eluir as diferentes classes de substâncias foram:

- Água acidificada com TFA pH 2,0
- ACN: Água acidificada com TFA pH 2,0 (1:1 v/v).

O pré-tratamento otimizado utilizado para a purificação e análise do perfil químico das amostras apresenta-se no Esquema 10.



**Esquema 10. Pré-tratamento dos extratos etanólicos do pólen de *Melípona seminigra* coletado na cidade de Manaus por Extração em Fase Sólida (SEP-PAK C18).**

As frações coletadas (F1, F2 e F3) foram analisadas através de um gradiente exploratório utilizando como fase móvel A: água acidificada com TFA pH 2,0 e como fase móvel B: ACN nas seguintes condições: 0-5 min (5 % B), 5-20 min (5-100 % B), 20-25 min (100 % B), 25-30 min (100-5 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 25 µL.

### **3.8.3. Desenvolvimento do método de análise de componentes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A resolução dos componentes das frações eluídas (F2) com ACN:H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0 (1:1), foi conseguida através de várias tentativas, modificando os tempos de corrida cromatográfica assim como os gradientes de eluição da fase móvel. A fração F2 correspondente à época de chuva foi denominada como Mch-EE-F2 e a da época de seca como Msec-EE-F2.

O método desenvolvido consistiu em um sistema gradiente não linear utilizando como fase móvel A: TFA pH 2,0 e como fase móvel B: ACN nas seguintes condições: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50 µL. Devido à natureza aromática dos compostos fenólicos, eles apresentam uma absorção intensa na região UV do espectro, sendo este método espectral especialmente importante para sua identificação e análise quantitativa (De Ugaz, 1994). No entanto, não existe um comprimento de onda único ideal para detectar todas as classes de fenólicos porque elas apresentam máximos de absorção em diferentes valores (Andersen e Markham 2006). O comprimento de onda selecionado para a análise depende da absorção observada para cada amostra. Neste trabalho a detecção de uma maior absorção e de um maior número de picos foi observada em 254 nm, portanto esse comprimento de onda foi tomado em geral como referência para a análise dos resultados cromatográficos.

#### 3.8.4. Injeção de padrões

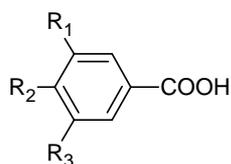
Na tentativa de identificar os componentes presentes nas frações F2 eluídas com ACN/H<sub>2</sub>O/TFA (1:1 v/v; pH 2,0) foram injetados padrões autênticos das seguintes substâncias fenólicas (Esquema 11): ácido gálico, ácido 3,4-diidrobenzóico, ácido clorogênico, catequina, (-)-epicatequina, ácido caféico, ácido siríngico, (-)-epigallocatequina, ácido *p*-cumárico, miricetina, quercetina, (+/-)-naringenina, apigenina, kaempferol, ácido sinápico (todos SIGMA) e rutina (MERCK). Para isso foram preparadas soluções-mãe de 2,0 mg/mL em MeOH grau HPLC e a partir delas foram preparadas soluções de 0,1 mg/mL que foram filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e submetidas à análise cromatográfica nas mesmas condições descritas no item 3.8.3. O volume de injeção foi de 20 µL.

#### 3.8.5. Injeção de mistura de padrões

Para analisar o efeito da matriz sobre os tempos de retenção de alguns padrões selecionados foi preparada uma mistura contendo ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina, kaempferol e rutina na concentração de 0,1 mg/mL. A mistura foi filtrada em membrana PVDF e foi resolvida utilizando o sistema descrito no item 3.8.3. Volume de injeção 20 µL.

## ACIDOS FENÓLICOS

## DERIVADOS DO ÁCIDO BENZÓICO



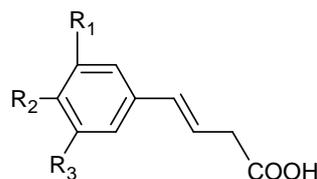
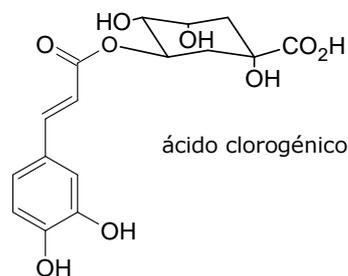
ácido gálico: 1=OH 2=OH 3=OH

ácido 3,4 hidroxibenzoico:

1=OH 2=OH 3=H

Ácido siríngico: 1=OCH<sub>3</sub> 2=OH 3=OCH<sub>3</sub>

## DERIVADOS DO ÁCIDO CINÁMICO

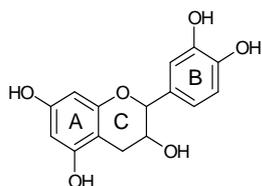


ácido p-cumárico: 1=H 2=OH 3=H

ácido caféico: 1=OH 2=OH 3=H

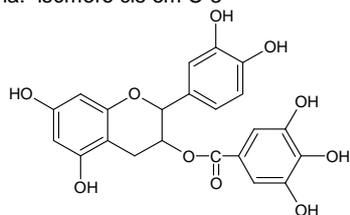
ácido sinápico: 1= OCH<sub>3</sub> 2=OH 3=OCH<sub>3</sub>

## FLAVANÓIS



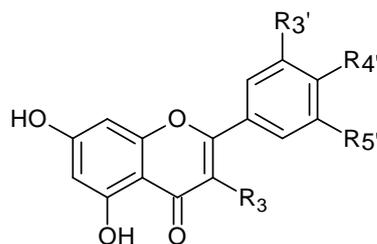
(+)-Catequina: isômero trans em C-3

Epicatequina: isômero cis em C-3



Epigallocatequina

## FLAVONÓIS



miricetina:

3'=OH 4'=OH 5'=OH 3=OH

quercetina:

3'=OH 4'=OH 5'=H 3=OH

rutina:

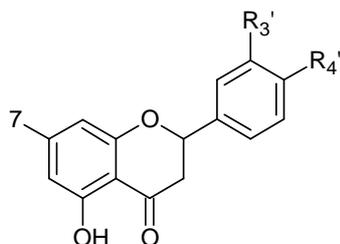
3'=OH 4'=OH 5'=OH

3=Glc-Rha

kaempferol:

3'=H 4'=OH 5'=H 3=OH

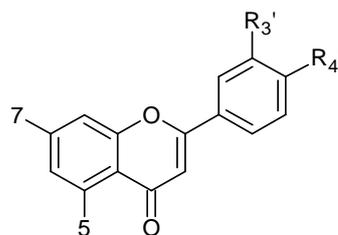
## FLAVANONAS



naringenina:

3'=H 4'=OH 7=OH

## FLAVONAS



apigenina:

3'=H 4'=OH 5=OH 7=OH

**Esquema 11. Estrutura dos padrões de substâncias fenólicas injetadas.**

### 3.8.6. Co-injeção de padrões

Para confirmar a presença de alguns padrões selecionados foi empregado o método da co-eluição, onde foram feitas co-injeções das seguintes substâncias: ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina, kaempferol e rutina. Para isso, foram preparadas oito alíquotas da fração F2 purificada pelo pré-tratamento descrito na secção 3.8.2., tanto para a amostra da época de chuva como de seca, e a cada uma foi adicionada uma quantidade conhecida de padrão. Cada alíquota foi resolvida com o sistema cromatográfico descrito no item 3.8.3. O aumento da intensidade dos picos no cromatograma original da fração fenólica em um tempo de retenção já identificado para um padrão autêntico permitiu sugerir a presença da substância na amostra.

## 3.9. Isolamento de substâncias

### 3.9.1. Sistema cromatográfico

Equipamento: As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido SHIMADZU, composto por duas bombas LC-6AD, detector UV-VIS SPD-10A VP, controlador SCL-10A e software CLASS-VP.

Coluna: Para ajustar o sistema na escala semi-preparativa foi utilizado um sistema de duas colunas Shim-pack PREP-ODS (H) Shimadzu 100 RP-18 “endcapped”, com tamanho de partícula de 5 µm. Uma coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno foi utilizada para fazer um ensaio preliminar e ajustar as condições

cromatográficas. A coluna semi-preparativa de 250 mm de comprimento e 20 mm de diâmetro interno foi utilizada para obter as frações purificadas.

Fase Móvel: Utilizou-se como fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O/TFA (pH 2,0) (45:55 v/v) em modo isocrático, com fluxo de 12 mL/min, tempo de corrida 40 minutos e volume de injeção de 500 µL. A detecção foi feita em 254 e 280 nm.

### **3.9.2. Pré-tratamento das amostras**

Tomou-se 20 mg da fração purificada com ACN:H<sub>2</sub>O/TFA pH:2,0 (1:1 v/v) pelo procedimento descrito na seção 3.8.2, correspondente à época de chuva e dissolveu-se em 1,5 mL de metanol grau HPLC. A solução foi diluída com água na proporção 2:1 v/v. A amostra foi filtrada em membrana PVDF para sua posterior injeção no cromatógrafo.

### **3.9.3. Obtenção de frações por CLAE**

A partir da fração eluída com ACN:H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0 (1:1 v/v), (época de chuva), foram coletadas seis frações. O solvente foi evaporado a pressão reduzida (temperatura máxima 40 °C) e as frações secas. A fração No. 4 foi selecionada para a obtenção dos espectros de Resonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN) devido à maior quantidade.

### **3.10. Determinação estrutural do constituinte químico isolado**

A substância isolada foi identificada por meio da análise do seu espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ). Os espectros de RMN foram obtidos por um espectrômetro de RMN Varian INOVA 500 de 11,7 T. A amostra foi dissolvida em 0,7 mL de metanol (d-4). Devido à pouca concentração da amostra, foi utilizado o experimento de pré-saturação de solvente (PRESAT).

### **3.11. Análise estatística**

As diferenças significativas entre as amostras de pólen coletadas durante os períodos de seca e de chuva foram determinadas pelo teste  $t$  (Miller e Miller, 2002). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas no nível de  $P \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudo da composição centesimal

Os resultados das análises da composição centesimal das amostras de pólen da abelha sem ferrão *M. seminigra* coletadas durante o mês de abril de 2008 (estação de chuva, amostra denominada Mchuva) e durante o mês de agosto de 2008 (estação de seca, amostra denominada Mseca) são apresentados na Tabela 5. As análises foram realizadas por triplicata. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 5. Composição centesimal em 100 g de amostra *in natura*.**

Parâmetro	Mchuva	Mseca	Valor de Referencia (Brasil, 2001)
Umidade (g)	51,27 % $\pm$ 0,55	40,76 % $\pm$ 0,59	Máximo 30 %
Proteína (g)	9,69 % $\pm$ 0,28	11,62 % $\pm$ 0,01	--
Lipídeos (g)	4,66 % $\pm$ 0,12	5,31 % $\pm$ 0,14	--
Cinzas (g)	1,97 % $\pm$ 0,01	2,23 % $\pm$ 0,02	--
Carboidratos (g)	32,41 %	40,08 % $\pm$ 0,00	--

Os resultados indicam que a amostra coletada durante a época de chuva tem um teor de umidade consideravelmente maior que a amostra do período de seca. Nos dois casos, as amostras apresentam valores de umidade superiores ao valor limite estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 2001) e, portanto para serem destinadas ao consumo humano devem ser submetidas a procedimentos de estabilização (por ex., secagem) para diminuir o risco de contaminação microbológica.

Análises realizadas com o pólen de *M. seminigra* coletado em dezembro de 2000 no município de Itacoatiara-AM (Souza et al., 2004) indicaram um teor de umidade de 46,8 %, proteínas de 23,8%, cinzas de 1,8 %, lipídeos de 3,4 % e glicídeos de 24,2% com conteúdo energético de 222,4 kcal. Em relação a essa pesquisa, as amostras estudadas neste trabalho apresentam valores similares de umidade e cinzas. No entanto, observa-se uma diferença significativa em relação ao teor de proteínas que no caso de Mchuva e Mseca é consideravelmente menor, (9,69%  $\pm$  0,28 e 11,62 %  $\pm$  0,01 na base úmida).

Uma vez que as amostras são secas, os níveis dos constituintes nutricionais são expressos como apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6. Composição centesimal em 100 g de amostra seca.**

Parâmetro	Mchuva	Mseca	Valor de Referencia (Brasil, 2001)
Umidade (g)	Max 4%	Max 4 %	Máximo 30,0 %
Proteína (g)	19,89 % $\pm$ 0,58	19,61 % $\pm$ 0,02	Mínimo 8,0 % B.S.
Lipídios (g)	9,56 % $\pm$ 0,25	8,97 % $\pm$ 0,23	Mínimo 1,8 % B.S.
Cinzas (g)	4,04 % $\pm$ 0,02	3,77 % $\pm$ 0,03	Máximo 4 % B.S.
Carboidratos (g)	66,5 % $\pm$ 0,00	67,7 % $\pm$ 0,00	14,0 a 55,0 % B.S
Energia (kcal)	432	430	--
Ph	3,96 $\pm$ 0,01	3,81 $\pm$ 0,01	4 a 6

(n=3)

A comparação dos teores de proteínas apresentados na Tabela 6 com alguns alimentos da região amazônica como castanha do amazonas (20,77 %) e peixes em geral com uma concentração media em torno de 20 % de proteina (Aguiar, 1996), sugere que uma vez seco, o pólen coletado por *M. seminigra* constitui um suplemento alimentar de considerável valor nutritivo (Souza et al., 2004).

Para determinar se as diferenças observadas entre as amostras Mchuva e Mseca são significativamente diferentes foi aplicado o contraste estatístico  $t$  (Anexo A). Para o tamanho de amostra empregado neste trabalho ( $n=3$ ), com  $n-1$  graus de liberdade e um nível de significância de 0,05, os valores experimentais de  $t$  indicaram que as amostras de chuva e de seca constituem duas amostras significativamente diferentes. Pode-se dizer então que as amostras exibem uma variação significativa na composição centesimal que deve ser provavelmente acompanhada por diferenças na origem botânica.

#### **4.2. Estudo da origem botânica**

A análise palinológica das amostras Mchuva e Mseca permitiu estabelecer diferenças em relação à origem botânica para cada um dos períodos de coleta (Tabela 7). Para a amostra liofilizada Mchuva, o pólen da espécie *Miconia dispar* (Melastomataceae) foi predominante com 53,19 %, seguido por pólen de espécies da família Myrtaceae (Myrtaceae) com 25,64 % e por pólen de *Mimosa pudica* (Fabaceae) com 16,81 %. Outros pólenes presentes em quantidade minoritária nessa amostra foram *Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude (Arecaceae) 1,81 %, *Spondia mombim* L. (Anacardiaceae) 1,38 %, *Tabebuia* sp (Bignoniaceae) 0,64 % e *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. spp (Burseraceae) 0,53 %. No caso da amostra Mseca o pólen predominante foi novamente *Miconia dispar* (Melastomataceae), mas a frequência relativa aumentou para 95,60 %, seguido por *Mimosa pudica* (Fabaceae) 3,44 % e pólen de espécies da família Myrtaceae (Myrtaceae) 0,96 %.

**Tabela 7. Porcentagem de frequência (%) vs. tipos polínicos encontrados nas amostras liofilizadas do pólen coletado por *Melipona seminigra* durante a estação de chuva (Mchuva) e durante a estação de seca (Mseca) no meliponário do grupo de Pesquisas em Abelhas do INPA, Manaus, 2008.**

Tipos polínicos	Família	Frequência (%)	
		Mchuva	Mseca
<i>Miconia díspar</i>	Melastomataceae	53,19	95,60
<i>Myrtaceae</i> sp.	Myrtaceae	25,64	0,96
<i>Mimosa pudica</i>	Fabaceae	16,81	3,44
<i>Maximiliana maripa</i>	Arecaceae	1,81	-
<i>Spondia mombim</i>	Anacardiaceae	1,38	-
<i>Tabebuia</i> sp.	Bignoniaceae	0,64	-
<i>Protium heptaphyllum</i>	Burseraceae	0,53	-

Estudos têm determinado que os meliponíneos são generalistas no uso dos recursos florais, mas independente dessas abelhas visitarem muitas espécies vegetais, só umas poucas formam parte significativa da sua dieta. Essa observação é confirmada pelos resultados obtidos com Mchuva e Mseca, onde apesar das diferenças de porcentagens entre os dois períodos, o pólen das espécies *Miconia díspar*, *Mimosa pudica* e da família Myrtaceae são as fontes principais para a abelha *M. seminigra*. Em um estudo anterior, Marques-Souza e colaboradores (2002) determinaram que na Amazônia Central, *M. seminigra* (Cockerell, 1919) coletou pólen das espécies *Miconia myrianthera* (Melastomataceae) e *Myrcia amazonica* (Myrtaceae) durante o ano todo. No presente estudo, constatou-se que nos dois períodos de amostragem (abril e agosto) o pólen coletado e armazenado por *M. seminigra* na cidade de Manaus, apresentou um tipo polínico predominante da família Melastomataceae (*Miconia díspar*), indicando que essa espécie de abelha tem preferência por esses tipos de grãos de pólen e conseqüentemente constituem seu nicho ecológico nas condições estudadas.

Pesquisas recentes têm mostrado que o pólen, além de representar um suplemento alimentar, também pode ser considerado como uma fonte potencial de

substâncias polifenólicas (Campos et al., 2003; Serra-Bonvehí, et al., 2001; Silva et al., 2006). Os compostos polifenólicos e flavonóides estão amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal e são considerados como antioxidantes efetivos. Vários estudos sugerem que esses compostos podem ser importantes na redução da incidência de doenças degenerativas tais como o câncer e a aterosclerose (Steinmetz, 1996; Bravo, 1998).

O perfil químico dos flavonóides/polifenólicos no pólen tem sido associado com a origem botânica. Campos e colaboradores, (2003) demonstraram que cada pólen floral apresenta seu próprio perfil cromatográfico de flavonóides/polifenólicos e uma atividade antioxidante específica. Esses pesquisadores determinaram que a taxa predominante em uma mistura de pólenes pode ser identificada por comparação de perfis de referência de pólenes florais autênticos com o perfil do pólen coletado por abelhas. No presente trabalho, é de esperar, portanto, que os perfis de flavonóides/polifenólicos das amostras Mchuva e Mseca coletadas por *M. seminigra* obtidos por CLAE se correspondam com o perfil do componente majoritário (*Miconia dispar*) e esse perfil cromatográfico possa ser utilizado como parâmetro para constatar a identidade botânica de novas amostras.

### **4.3. Rendimentos de substâncias extraíveis**

#### **4.3.1. Extratos etanólicos e aquosos**

Os resultados indicam que a amostra da época seca apresenta rendimento superior que a amostra de chuva tanto em etanol como em água (Tabela 8).

**Tabela 8. Teor de extrativos dos extratos etanólicos e aquosos do pólen coletado por *M. seminigra*.**

Extrato	Mchuva		Mseca	
	Massa (g)	%	Massa (g)	%
EE (Extrato etanólico)	9,73	21,60 %	12,58	27,93 %
EAQ (Extrato aquoso)	1,86	18,62 %	2,48	24,85 %

#### 4.3.2. Fracionamento dos extratos etanólicos

Para o estudo da atividade antioxidante e do perfil químico das amostras, parte da massa dos extratos etanólicos foi submetida a fracionamento por extração líquido-líquido. A composição percentual das diferentes frações em relação à massa final apresenta-se na Tabela 9.

**Tabela 9. Comparação do rendimento das partições líquido-líquido para as amostras de pólen de *Melipona seminigra* na época de chuva (Mchuva) e de seca (Mseca).**

Extrato	Mchuva		Mseca	
	Massa (g)	%	Massa (g)	%
Fração Hexânica	2,24	28,06 %	1,79	24,46 %
Fração Acetato de Etila	3,09	38,83 %	2,30	31,50 %
Fração Hidroalcoólica	2,64	33,09 %	3,21	44,03 %
Massa total	7,97	100,0 %	7,30	100,0 %

Os resultados obtidos da partição líquido-líquido indicaram que não existe grande diferença entre as duas amostras.

#### 4.4. Perfis químicos por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

##### 4.4.1. CCDC-Fase Normal

Os extratos e frações correspondentes a época de chuva apresentaram o comportamento exibido na Figura 5.



Os resultados das CCDC-FN indicam que o fracionamento por partição líquido-líquido foi eficiente, permitindo a separação das substâncias apolares daquelas de media e alta polaridade.

A Figura 6 apresenta os resultados da CCDC-FR dos extratos e das frações correspondentes à época de seca.

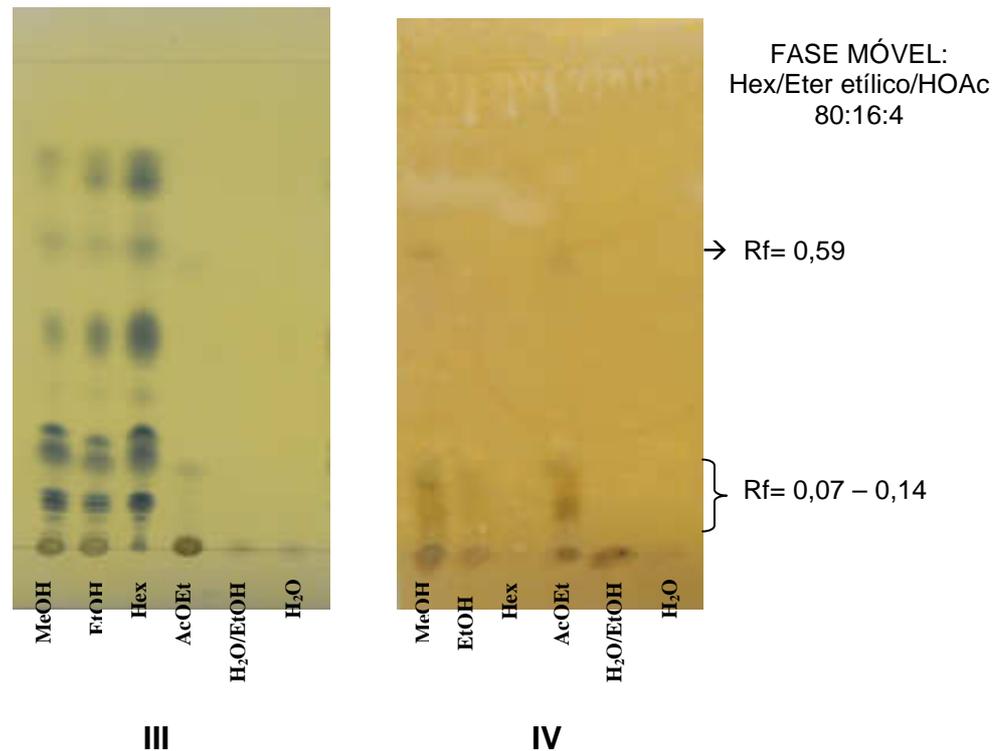


Figura 6. CCDC-FN das substâncias apolares nos extratos/frações do pólen coletado por *Melipona seminigra* durante a época de seca. III: Revelador ácido fosfomolibdico; IV: Revelador cloreto férrico. Extrato metanólico, MeOH (60°C, 5 minutos); Extrato etanólico, EtOH; Fração hexânica, Hex; Fração em acetato de etila, AcOEt; Fração hidroalcoólica, H<sub>2</sub>O/MeOH; Extrato aquoso, H<sub>2</sub>O.

Essas amostras apresentaram um comportamento similar à amostra coletada durante a época de chuva, quando reveladas com ácido fosfomolibdico. No entanto, há diferença entre os perfis observados na placa II e na placa IV, revelados com cloreto férrico. O perfil cromatográfico da placa IV indica que essa amostra tem certos componentes fenólicos que migram com a fase móvel (manchas com Rfs

entre 0,07 e 0,14 nas aplicações IV-MeOH, IV-EtOH, IV-AcOEt e mancha em  $R_f=0,59$  observada nas aplicações IV-MeOH e IV-AcOEt), o que não ocorreu com a amostra da época de chuva.

Em relação aos solventes de extração, os perfis dos componentes apolares em metanol e em etanol sugerem que os dois solventes têm poder de extração equivalente (aplicações MeOH, EtOH para a amostra da época de chuva e de seca). É de salientar que o método de extração a quente (60 °C, 5 minutos) configura-se como um procedimento rápido para o monitoramento de componentes no pólen em contraste com o método de maceração que requer um tempo muito maior.

#### **4.4.2. CCDC-Fase Reversa**

Como observado nas placas V e VI (Figura 7), foi possível detectar substâncias fluorescentes quando reveladas com NP-PEG no UV (365 nm), esse comportamento é próprio dos flavonóides (Wagner e Bladt, 1996). As duas amostras apresentam duas manchas coincidentes em  $R_f=0,34$  e  $R_f=0,48$  (aplicações V-MeOH, V-EtOH e VI-MeOH, VI-EtOH e VI-AcOEt), os outros componentes são revelados com cores e intensidades diferentes, indicando que a CCDC-FR permite um monitoramento rápido dos perfis de flavonóides em amostras de pólen. Salienta-se que as frações em acetato de etila, tanto na amostra da época de chuva como na da época de seca concentraram os componentes com características fenólicas e, a CCDC utilizando como revelador NP-PEG sugere que estes sejam flavonóides.

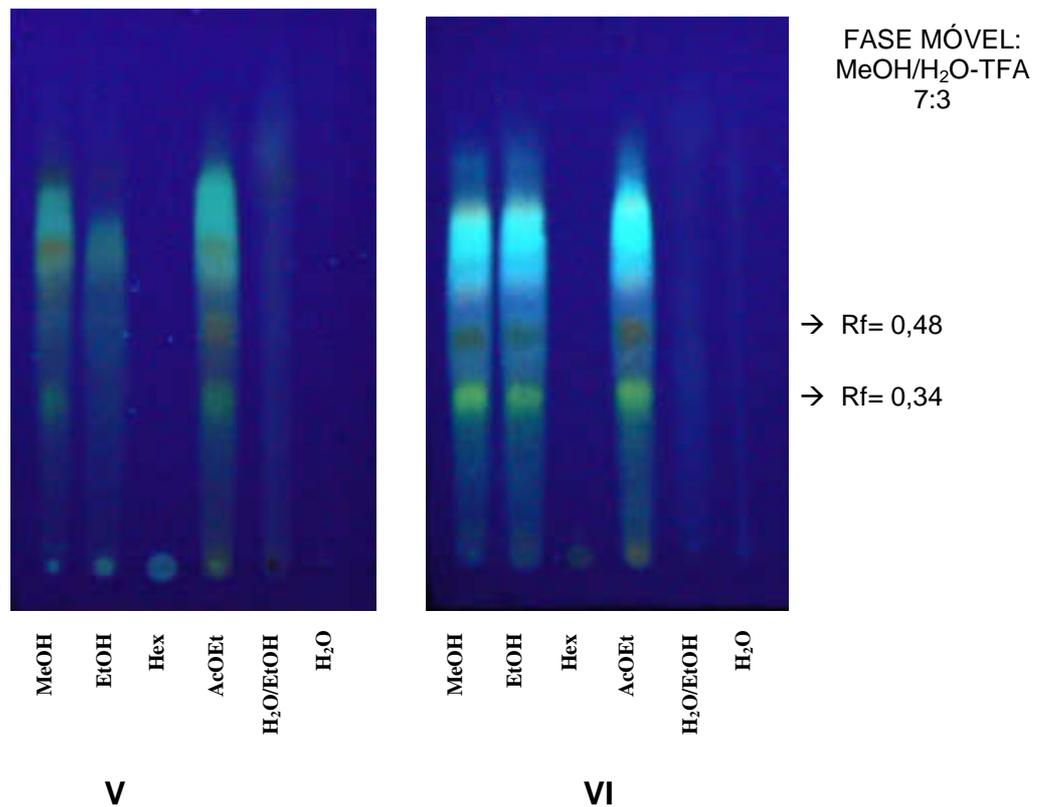


Figura 7. CCDC-FR das substâncias polares/fenólicas nos extratos/frações do pólen coletado por *Melipona semingra* durante a época de chuva (V) e de seca (VI). Extrato metanólico, MeOH (60°C, 5 minutos); Extrato etanólico, EtOH; Fração hexânica, Hex; Fração em acetato de etila, AcOEt; Fração hidroalcoólica, H<sub>2</sub>O/MeOH; Extrato aquoso, H<sub>2</sub>O. Revelador NP-PEG.

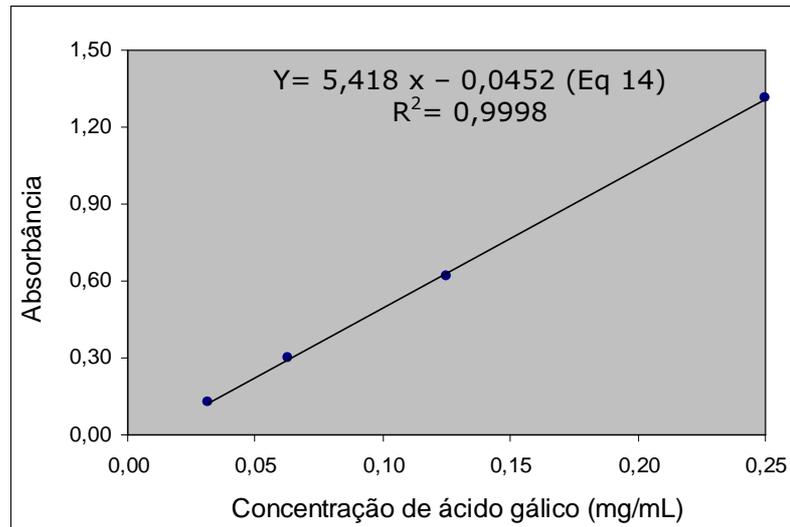
#### 4.5. Estudo da atividade antioxidante dos extratos etanólicos e suas frações

##### 4.5.1. Teor de fenólicos totais

Curva de calibração com ácido gálico: A partir dos dados de absorvância em função da concentração de ácido gálico (mg/mL) (Tabela 10) foi construída uma curva de calibração (Figura 8).

Tabela 10. Dados de Absorvância em função da concentração de ácido gálico (mg/mL).

Conc. (mg Acido Gálico/mL)	A1	A2	A média ± DP
0,250	1,300	1,326	1,313 ± 0,018
0,125	0,622	0,621	0,622 ± 0,001
0,063	0,293	0,306	0,300 ± 0,010
0,031	0,113	0,137	0,125 ± 0,017



**Figura 8. Curva de calibração com ácido gálico.**

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) da Equação 14 apresentou um valor próximo a 1 indicando uma boa correlação linear.

O teor de fenólicos totais foi estimado por interpolação dos dados de absorbância dos extratos/frações na reta de regressão (Equação 14) da curva de calibração de ácido gálico. Os resultados são expressos como mg de ácido gálico/mL de solução, (Tabela 11).

**Tabela 11. Resultados comparativos do teor de fenóis totais para os extratos/frações das amostras de pólen de *Melípona seminigra* coletados na época de chuva e de seca.**

Amostra	Concentração $\pm$ DP (mg A.G/mL)
<b>Época de chuva</b>	
Extrato Etanólico	0,062 $\pm$ 0,004
Fração em Hexano	0,040 $\pm$ 0,005
Fração em Acetato	<u>0,098 <math>\pm</math> 0,002</u>
Fração hidrometanólica	0,036 $\pm$ 0,005
Extrato aquoso	0,030 $\pm$ 0,005
<b>Época de seca</b>	
Extrato Etanólico	0,079 $\pm$ 0,003
Fração em Hexano	0,036 $\pm$ 0,005
Fração em Acetato	<u>0,222 <math>\pm</math> 0,006</u>
Fração hidrometanólica	0,064 $\pm$ 0,003
Extrato aquoso	0,034 $\pm$ 0,005

**A.G: ácido gálico**

O teor de fenólicos totais tanto para a amostra Mchuva como Mseca foi maior nas frações em acetato de etila. Essa fração segundo os resultados de CCDC-FR concentrou seletivamente substâncias antioxidantes, presumivelmente flavonóides. Esse resultado é coerente com dados de literatura que indicam que o acetato de etila é um solvente apropriado para concentrar substâncias fenólicas, em particular flavonóides e facilitar sua identificação por técnicas cromatográficas (CCD, CLAE), (Wagner e Bladt, 1996). Os resultados indicam que a amostra da época de seca apresentou um teor de fenólicos totais superior ao da amostra da época de chuva. Para efeitos de comparação com dados publicados na literatura, o teor de fenólicos totais nos casos dos extratos etanólicos e aquosos foram expressos em g de ácido gálico/100 g de pólen seco (Tabela 12).

**Tabela 12. Teor de fenólicos totais nos extratos etanólicos e aquosos expressos como g de ácido gálico/100 g de pólen seco de *Melípona seminigra*.**

Extrato	Mc (chuva)	Ms (seca)
	g Ac. Gálico / 100 g polen seco	g Ac. Gálico / 100 g polen seco
Extrato etanólico	1,34	2,19
Extrato Aquoso	0,43	0,85

O teor de fenólicos totais foi maior para a amostra da época de seca que para aquela coletada durante a época de chuva. Para cada amostra os extratos aquosos apresentaram teores de fenólicos totais inferiores aos extratos etanólicos.

Estudos realizados com pólen coletado por *Apis mellifera* na Espanha (Serra Bonvehí, et al., 2001) indicaram um valor médio de fenólicos totais (F.T) de 1,24 g de ácido gálico/100 g de pólen seco (método espectrofotométrico). As amostras desse estudo foram classificadas como monoflorais com predominância do pólen da espécie vegetal *Cistus ladaniferus*. Pesquisas no Brasil (Carpes, et al., 2008) com

pólen coletado por *Apis mellifera* nos Estados de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentaram um teor médio de F.T. de 30,77 mg ácido gálico por grama de pólen seco. As amostras foram caracterizadas como heteroflorais e contendo predominantemente pólen da família Asteraceae seguida de Brassicaceae, Myrtaceae e Arecaceae. Em relação a esses estudos, os teores de fenólicos totais dos extratos em etanol do pólen coletado por *M. seminigra* na cidade de Manaus durante a estação de chuva e de seca exibem valores que são superiores ao valor médio de F.T. das amostras da Espanha e inferior ao médio de F.T. do pólen do Sul do Brasil para a espécie *Apis mellifera*. Segundo Serra-Bonvehí e colaboradores (2001) resultados maiores ou iguais a 1,2 g de ácido gálico por 100 gramas de pólen seco são elevados em comparação com outros alimentos, constituindo o pólen coletado por *Melipona seminigra* uma fonte importante de substâncias polifenólicas.

As variações observadas no teor de fenólicos podem ser atribuídas às diferenças na origem botânica. Os resultados deste trabalho sugerem que um aumento da participação do pólen dominante de *Miconia díspar* possa ser responsável pelo aumento de fenólicos totais em 169 % da amostra da época de seca, em comparação com a amostra da época de chuva, já que os outros componentes majoritários presentes na amostra de chuva (*Mimosa pudica*, Myrtaceae) diminuem para dar lugar a uma composição praticamente monofloral na amostra do período de seca. Diferenças na natureza e níveis das substâncias polifenólicas/flavonóides indicariam que a efetividade, como antioxidantes (seqüestradores de radicais livres), de vários pólenes florais e portanto das misturas de pólen coletadas e armazenadas pelas abelhas, pode variar amplamente como exposto por Campos e colaboradores (2003). No presente trabalho as evidências indicam que o pasto apícola identificado fornece pólenes que apresentam

considerável teor de substâncias fenólicas e sua composição varia no tempo. No entanto, para estabelecer se esse pasto apícola é o melhor, faz-se necessário comparar amostras de diferentes anos e de diferentes lugares.

#### 4.5.2. Estudo da capacidade de sequestro do radical livre DPPH·

A partir da equação da reta dos gráficos da porcentagem de capacidade de seqüestro do radical livre DPPH· (%CS) em função da concentração (das series de diluições dos extratos, frações e do controle positivo) foi estimado o parâmetro %CS<sub>50</sub> em µg/mL, que expressa a concentração (massa) de substrato que causa 50 % de perda da atividade (cor) do radical DPPH·.

Cálculo da %CS<sub>50</sub> de quercetina (Controle Positivo): Com os valores calculados de % CS em função da concentração de quercetina (µg/mL) foi construído o gráfico da Figura 9.

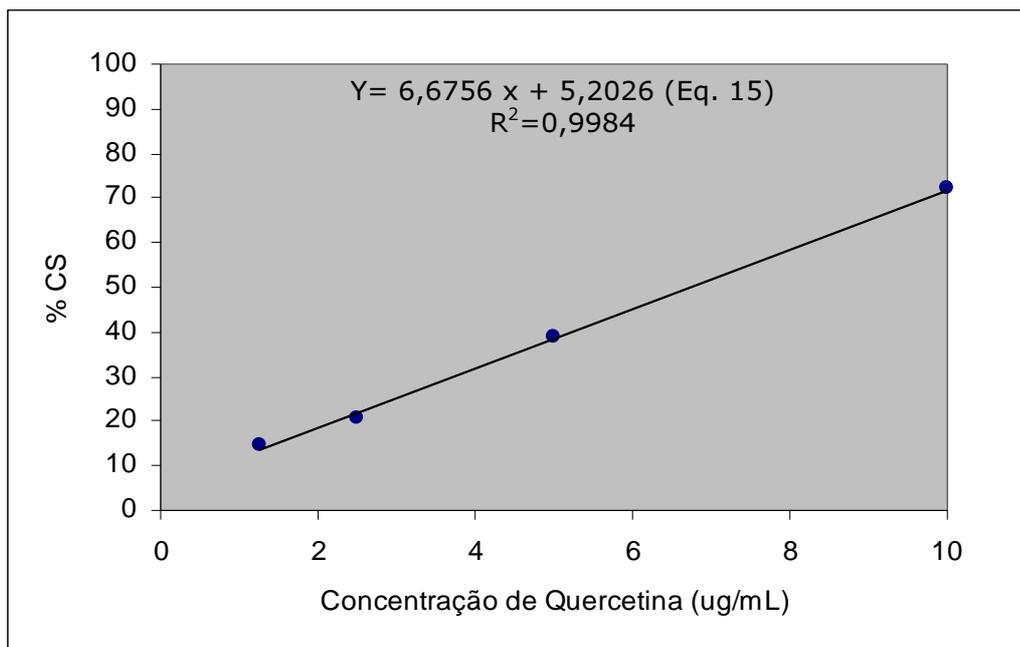


Figura 9. Curva de calibração linear da %CS em função da Concentração (µg/mL) de quercetina

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) da Equação 15 apresentou um valor próximo a 1 indicando uma boa correlação linear.

O valor calculado de %CS<sub>50</sub> para a quercetina a partir da equação da reta (Eq. 15) foi de  $6,71 \pm 0,21$  µg/mL. Esse dado constitui uma referência da atividade antioxidante de uma substância de caráter polifenólico com reconhecidas propriedades antioxidantes como é a quercetina.

$$\%CS_{50} = X = \frac{50 - 5,2026}{6,6756} = 6,71 \pm 0,21 \text{ µg/mL}$$

As frações em acetato de etila apresentaram a maior capacidade de seqüestro (%CS<sub>50</sub>) frente ao radical livre DPPH<sup>·</sup>, seguidas pelos extratos em etanol (Tabela 13). As frações em hexano e os extratos aquosos não apresentaram atividade antioxidante a concentrações inferiores a 3500 µg/mL e por esse motivo os seus valores de %CS<sub>50</sub> não foram determinados (Tabela 13).

**Tabela 13. Resultados comparativos da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH<sup>·</sup> dos extratos/frações de pólen de *Melípona seminigra* coletados na época de chuva (Mchuva) e de seca (Mseca).**

Amostra	%CS <sub>50</sub> (µg/mL)
<b>Estação de chuva</b>	
Extrato etanólico	322,2 ± 0,011
Fração em hexano	>3500
Fração em acetato	33,38 ± 0,892
Fração hidrometanólica	780,9 ± 0,035
Extrato aquoso	> 3500
<b>Estação de seca</b>	
Extrato etanólico	144,5 ± 0,010
Fração em hexano	>3500
Fração em acetato	24,58 ± 0,949
Fração hidrometanólica	1525 ± 0,116
Extrato aquoso	> 3500
<b>Substância de Referência</b>	
Quercetina	6,71 ± 0,210

A análise da atividade antioxidante através do método fotométrico com o radical DPPH· vem sendo utilizada em vários estudos com produtos apícolas como pólen (Campos et al., 2003; Leja et al., 2007; Silva et al., 2006), própolis (Kumazawa, 2004) e mel (Meda, 2005). Em relação ao pólen de Meliponíneos, praticamente o único estudo que permite estabelecer comparações com a presente pesquisa foi realizado por Silva e colaboradores, (2006) com pólen coletado por *Melipona subnitida* no Estado da Paraíba. A amostra foi classificada manualmente em cargas de cor amarelo e cargas de cor marrom. A análise palinológica mostrou que *Mimosa gemmulata* (Mimosaceae) foi a espécie predominante (98,95 %) nas cargas amarelas enquanto que grãos de Fabaceae (89,84%) predominaram nas cargas marrons. A capacidade de seqüestro do radical livre foi expressa como EC<sub>50</sub> (µg/mL). Os extratos/frações mostraram atividade antioxidante frente ao radical DPPH· na seguinte ordem: fração acetato de etila>extrato em etanol>fração em hexano. Os valores de EC<sub>50</sub> foram 41,9 ± 0,2; 104,5 ± 0,5; 212,0 ± 0,5 µg/mL para as cargas amarelas e 43,7 ± 0,3; 106,1 ± 1,3; 236,5 ± 2,3 µg/mL para as cargas marrons.

Os pólenes coletados por *M. seminigra* na cidade de Manaus durante as estações de chuva e de seca apresentaram um comportamento similar. A ordem de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH· foi: fração em acetato de etila>extrato em etanol>fração hidroalcoólica. As frações em hexano apresentaram atividade antioxidante desprezível com esse teste e a menor atividade determinada foi para a fração hidroalcoólica. As frações em acetato de etila da amostra coletada no período de chuva (%CS<sub>50</sub>= 33,38 ± 0,892 µg/mL) e de seca (%CS<sub>50</sub> 24,58 ± 0,949 µg/mL), que resultaram serem as mais ativas neste estudo, apresentaram uma diferença significativa entre os dois períodos de coleta como determinado pelo teste *t*

(Anexo A) num nível de confiança de 95 % ( $P=0,05$ ). Portanto, pode-se afirmar que nas condições analisadas a amostra da época de seca é mais ativa que a amostra da época de chuva.

#### 4.5.3. Estudo da capacidade de redução de Fe (III)

A partir dos dados de absorvância em função da concentração de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\mu\text{M}$ ) foi construída uma curva de calibração (Figura 10).

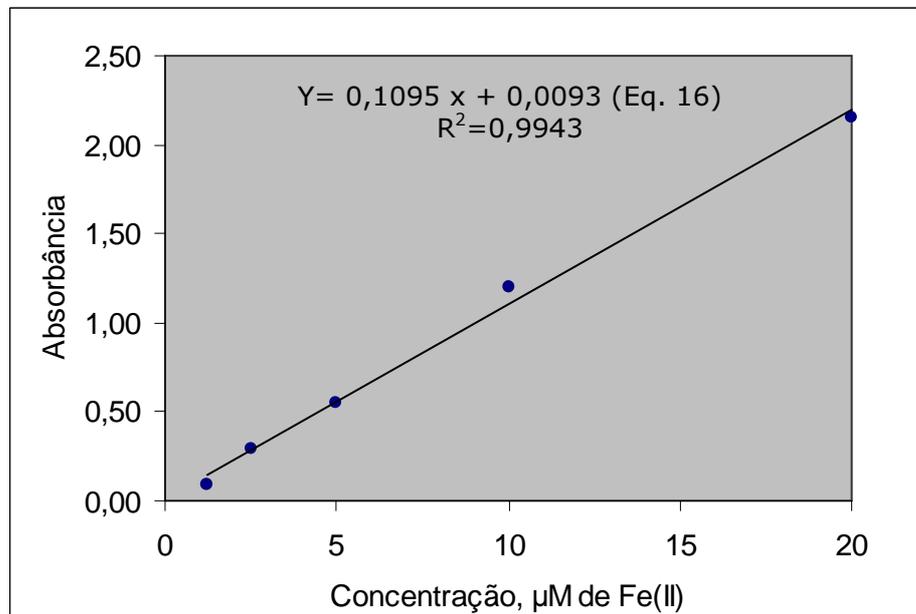


Figura 10. Curva de calibração com padrão de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) da Equação 16 apresentou um valor próximo a 1 indicando uma boa correlação linear.

Os valores de absorvância para cada extrato/fração foram interpolados na curva de calibração com  $\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e os resultados da capacidade redutora de Fe (III) foram expressos como  $\mu\text{M}$  de Fe(II)/g de extrato seco.

A tabela 14 apresenta os resultados da variação na capacidade de redução de Fe (III) dos extratos e das frações do pólen coletado por *Melipona seminigra* em função do período de coleta.

**Tabela 14. Resultados comparativos da capacidade de redução de Fe (III) dos extratos e das frações de pólen coletado pela abelha *Melipona seminigra* durante a estação de chuva e de seca.**

Amostra	Mchuva	Mseca
	$\mu\text{M Fe (II)} \pm \text{DP}$	$\mu\text{M Fe (II)} \pm \text{DP}$
Extrato em etanol	$1,53 \pm 0,01$	$3,42 \pm 0,01$
Fração em hexano	$0,06 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$
Fração em acetato	$6,77 \pm 0,40$	$10,85 \pm 0,04$
Fração hidroalcoólica	$0,49 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,08$
Extrato aquoso	$0,03 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$

Valores maiores de Fe (II) ( $\mu\text{M}$ ) detectados no meio reacional indicam uma maior capacidade das substâncias presentes para reduzir Fe (III) e formar complexos estáveis com Fe (II). Os resultados da capacidade de redução de Fe (III) a Fe (II) dos extratos/frações de *M. seminigra* tanto para Mchuva como para Mseca seguem a ordem: fração em acetato de etila>extrato em etanol>fração hidroalcoólica>hexano>extrato aquoso. Comparativamente a atividade dos extratos/frações foi maior para a Mseca, com exceção da fração hidroalcoólica na qual a amostra da chuva foi mais ativa. Em todos os casos as diferenças são estatisticamente significativas determinadas pelo teste *t* a um nível de confiança de 95 % ( $P=0,05$ ). A eficácia dos extratos/frações do pólen da abelha *M. seminigra* dependerá da estabilidade dos complexos formados com Fe(II), já que em certas condições biológicas (presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pode-se apresentar um efeito pró-oxidante que levaria a reações indesejáveis do tipo Fenton (formação de radicais livres hidroxilos e peroxilicos) (Mauricio, 2006).

A partir dos resultados pode-se dizer que houve uma correlação positiva entre os teores de fenólicos totais dos extratos etanólicos e a atividade antioxidante determinada pelo método de seqüestro do radical livre DPPH-e pelo método da capacidade de redução do Fe (III), tal como pode ser visualizado na Tabela 15.

**Tabela 15. Correlação entre o teor de fenólicos totais e os resultados da atividade antioxidante para os extratos etanólicos e as frações em acetato de etila.**

Amostra	Mchuva			Mseca		
	F.T. <sup>(a)</sup>	%CS <sub>50</sub> µg/mL	µM Fe (II)	F.T. <sup>(a)</sup>	%CS <sub>50</sub> µg/mL	µM Fe (II)
Extrato em etanol	0,062	322,2	1,53	0,079	144,5	3,42
Fração em acetato	0,098	33,38	6,77	0,222	24,58	10,85

<sup>(a)</sup> Fenólicos totais expressos como como mg de ácido gálico / mL de solução.

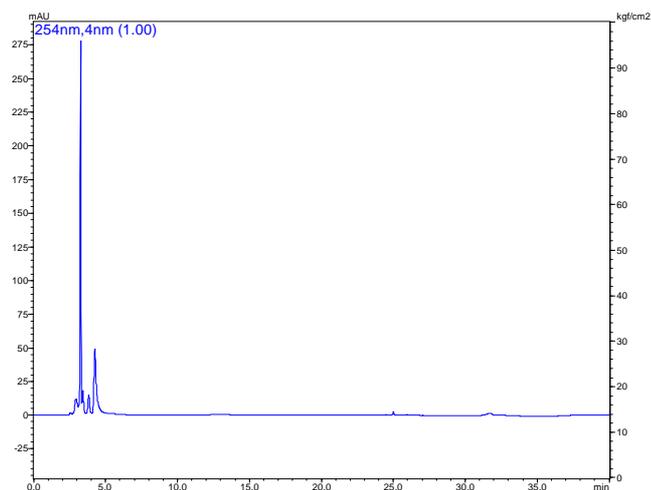
Esses resultados podem ser atribuídos à variação na origem botânica das amostras coletadas durante o período de chuva e o período de seca. Os resultados observados sugerem que uma maior porcentagem do pólen de *Miconia dispar* estaria contribuindo no aumento do teor de F.T assim como também no aumento da capacidade de seqüestro de radicais livres e de redução de Fe(III) para a amostra Mseca.

#### **4.6. Estudo dos perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

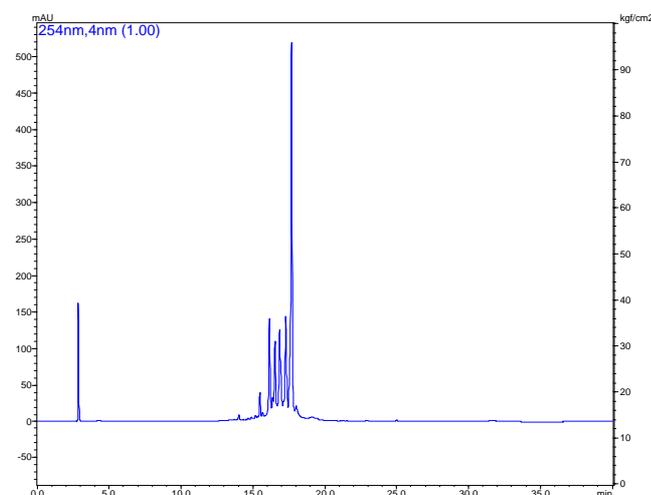
##### **4.6.1. Pré-tratamento das amostras:**

O estudo da atividade antioxidante revelou que os extratos etanólicos e as frações em acetato de etila são as amostras mais ativas. Essas amostras foram submetidas a um pré-tratamento conforme descrito no item 3.8.2 da metodologia.

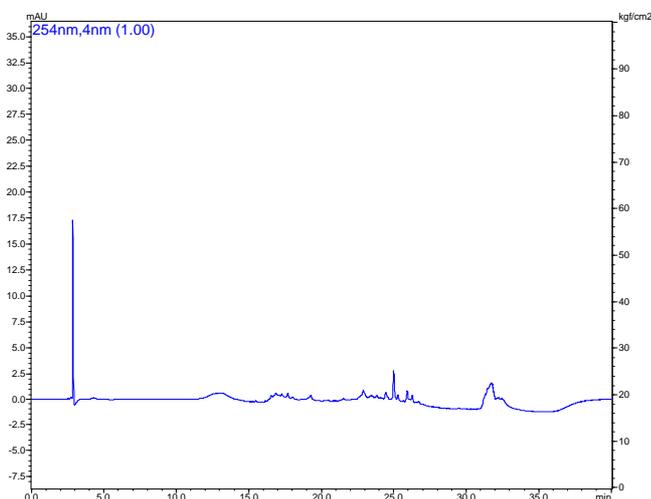
Os cromatogramas correspondentes ao pré-tratamento dos extratos etanólicos do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de chuva e na época de seca seguindo o procedimento descrito são apresentados nas Figuras 11 e 12. Pode-se observar que a fração aquosa (F1) é livre de componentes de média polaridade. No caso das duas frações eluídas com ACN:H<sub>2</sub>O-TFA 1:1 observa-se que a primeira fração eluída com 5,0 mL dessa fase móvel (F2) concentra a totalidade dos componentes de média polaridade e não foi necessário utilizar um volume adicional de solvente. Portanto, as frações purificadas pelo pré-tratamento SEPPAK selecionadas para a resolução dos seus componentes por CLAE foram as frações F2 correspondentes a cada época de amostragem, amostras denominadas como Mch-EE-F2 (época de chuva) e Msec-EE-F2 (época de seca).



a- Mch-EE-F1

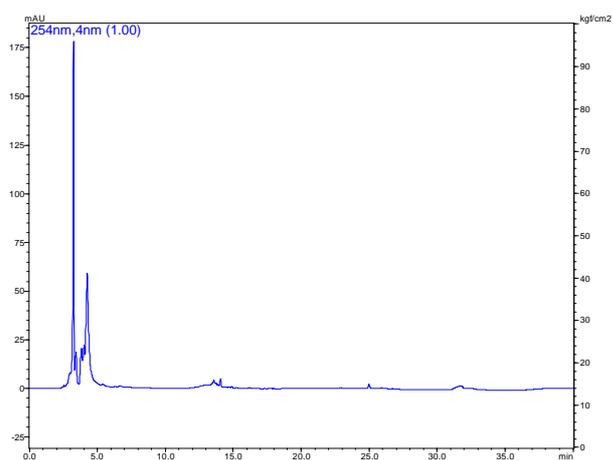


b- Mch-EE-F2

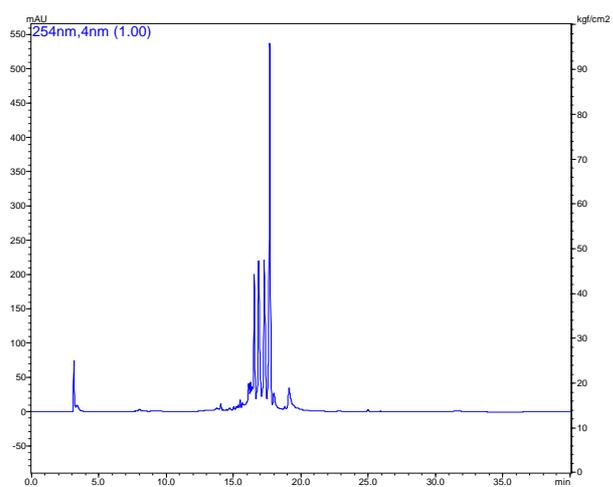


c- Mch-EE-F3

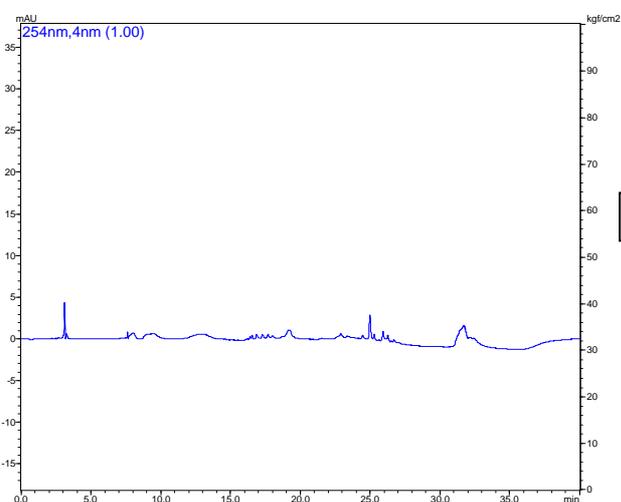
Figura 11. Cromatogramas das frações obtidas por extração em fase sólida do extrato etanólico do pólen de *Melipona seminigra* coletado no período de chuva (a) fração aquosa eluída com 5 mL de H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0; (b) primeira fração eluída com 5 mL de ACN/H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0 e (c) segunda fração eluída com 5 mL de ACN/H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0. Comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm.



a- Msec-EE-F1



b- Msec-EE-F2



c- Msec-EE-F3

Figura 12. Cromatogramas das frações obtidas por extração em fase sólida do extrato etanólico do pólen de *Melipona seminigra* coletado no período de seca (a) fração aquosa eluída com 5 mL de H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0; (b) primeira fração eluída com 5 mL de ACN/H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0 e (c) segunda fração eluída com 5 mL de ACN/H<sub>2</sub>O/TFA pH 2,0. Comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm.

#### 4.6.2. Análise de componentes por CLAE

As Figuras 13 e 14 apresentam os cromatogramas obtidos para as amostras purificadas Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2 em 254 e 280 nm. Os picos assinalados nos cromatogramas foram utilizados como parâmetros de comparação entre os períodos de coleta de chuva e de seca nos dois comprimentos de onda.

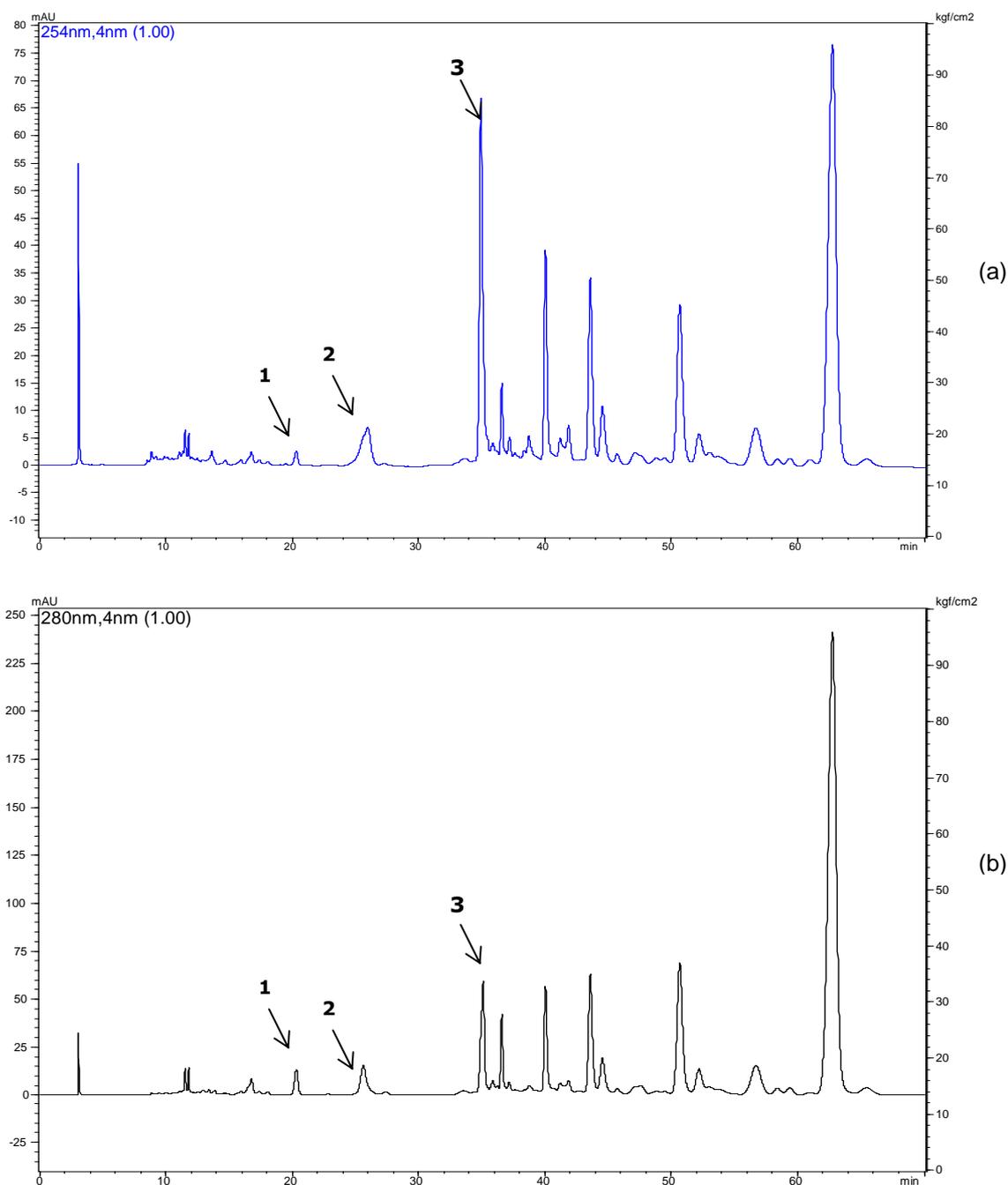


Figura 13. Perfil RPHPLC da fração purificada (Mch-EE-F2) a partir do extrato etanólico do pólen de *Melipona seminigra* coletada no período de chuva, (a) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm, (b) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 280 nm.

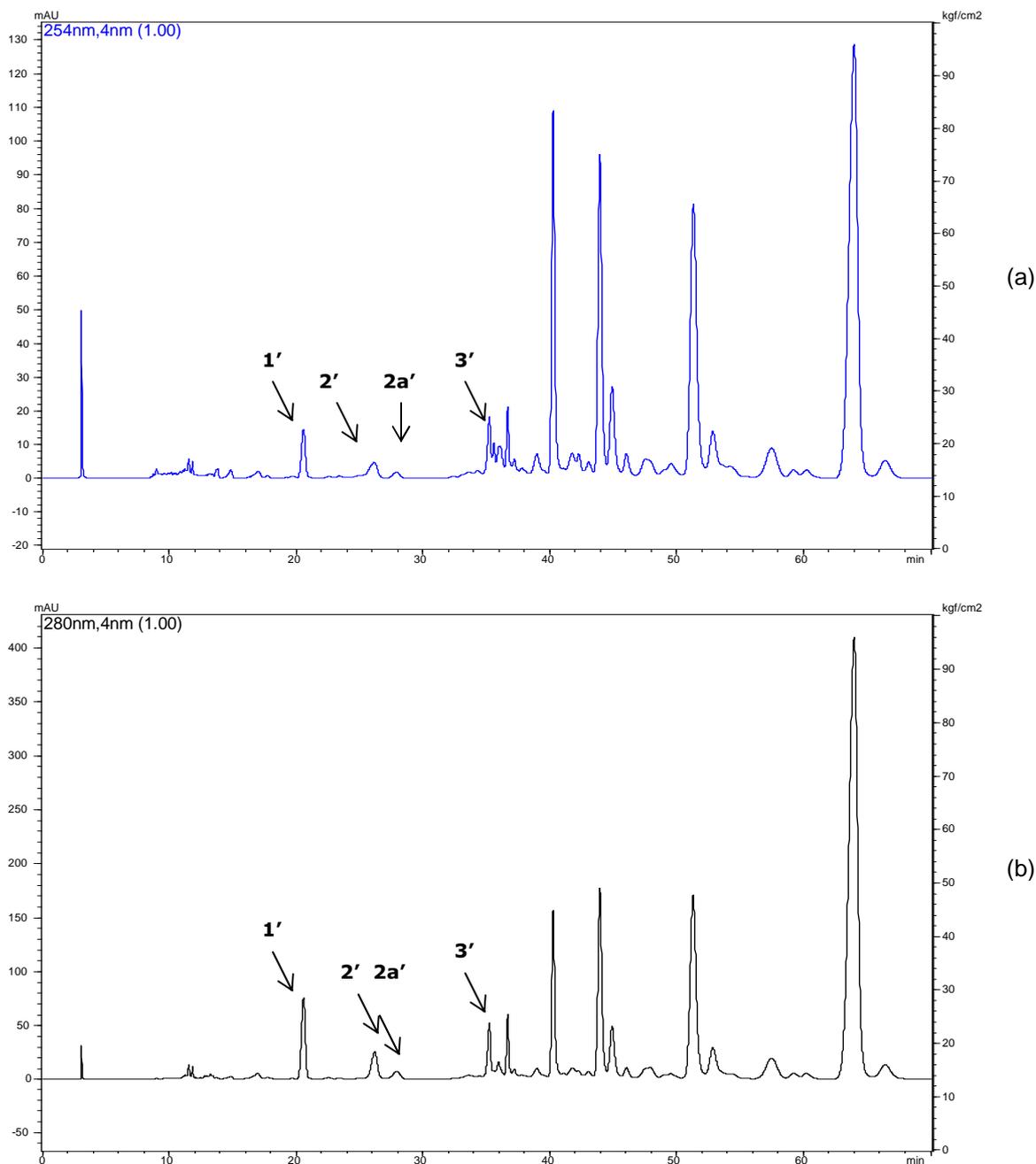


Figura 14. Perfil da fração purificada (Msec-EE-F2) a partir do extrato etanólico do pólen de *Melipona seminigra* coletada no período de seca, (a) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 254 nm, (b) comprimento de onda ( $\lambda$ ) 280 nm. Na figura 14, os picos 1', 2', 2a' e 3' são utilizados como parâmetros de comparação entre os períodos de coleta de chuva e de seca nos dois comprimentos de onda (ver Figura 13).

#### 4.6.3. Comparação qualitativa dos perfis CLAE de fenólicos/flavonóides

Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do pólen de *Melipona seminigra* coletados nos períodos de chuva e de seca (Figuras 13 e 14) podem ser

analisados tendo em conta três zonas de eluição: (i) entre 0 e 30 minutos, (ii) entre 30 e 50 minutos e (iii) entre 50 e 70 minutos.

Na primeira zona as duas amostras apresentaram alguns picos não resolvidos e de baixa intensidade entre os 8 e 19 minutos. Em 20 minutos as duas amostras apresentam um pico bem resolvido (**1** e **1'**) seguido por um pico em 26 minutos para a amostra Mch-EE-F2 (**2**) e dois picos para a amostra Msec-EE-F2 em 26 (**2'**) e 28 minutos (**2a'**).

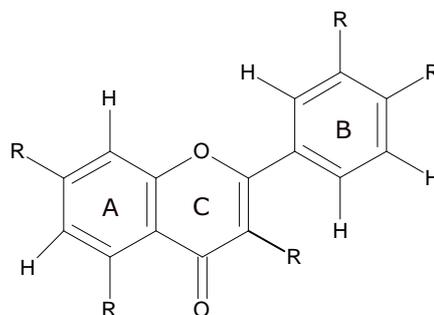
Na zona compreendida entre 30 e 50 minutos pode-se dizer que os perfis das duas amostras são similares, sendo a principal diferença o pico em 34,4 min (**3**) que apresenta uma maior intensidade relativa na amostra Mch-EE-F2 que na amostra Msec-EE-F2 (**3'**).

Na zona entre 50 e 70 minutos os picos apresentam melhor resolução cromatográfica e como no caso anterior observa-se que os perfis são similares, sendo a principal diferença a maior intensidade relativa das bandas na amostra Msec-EE-F2.

Os perfis cromatográficos (Figuras 13 e 14) refletiram a variação na composição das substâncias fenólicas/flavonóides do pólen coletado pela abelha *M. seminigra* durante a estação de chuva e durante a estação de seca. Segundo os resultados as duas amostras exibem perfis químicos similares sendo a intensidade do pico **3** e **3'** a principal diferença. As variações observadas podem ser relacionadas com as mudanças na origem botânica das duas amostras. Em geral observa-se que os picos têm uma maior intensidade de absorção na amostra do

período de seca que na amostra do período de chuva. A diminuição da intensidade da absorção do pico 3' na amostra de seca pode estar relacionada com a diminuição da participação dos tipos polínicos da família Myrtaceae e da espécie *Mimosa pudica* nessa amostra para dar lugar a um perfil mais representativo da espécie *Miconia dispar* (95,60 %).

O método de análise do perfil das substâncias fenólicas/flavonóides por CLAE está baseado principalmente no uso do detector ultravioleta. Neste trabalho o emprego do detector UV com arranjo de diodos (DAD) permitiu a obtenção dos espectros de absorção no UV na faixa entre 200 e 400 nm dos picos que eluem da coluna de tal forma que pudessem ser comparados com os espectros dos padrões analisados com fins de identificação. Pôde ser constatado que vários dos picos nos perfis cromatográficos (Figuras 13 e 14) apresentaram máximos de absorção entre 254-280 nm e entre 350-370 nm, os quais são próprios dos flavonóides. Essas substâncias exibem tipicamente dois máximos de absorção entre 240-285 nm (Banda II) e entre 300-550 nm (Banda I). A variação nessas faixas depende do modelo de hidroxilação e do grau de substituição das hidroxilas. As variações na substituição do anel A tendem a ser refletidos na banda II de absorção, enquanto que as alterações nas substituições dos anéis B e C tendem a ser mais aparentes na banda I (De Ugaz, 1994), (Esquema 12).



**Esquema 12. Esqueleto básico dos flavonóides (R= OH).**

#### 4.6.4. Injeção de padrões de substâncias fenólicas

Para identificar os componentes presentes nas frações purificadas Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2 injetaram-se padrões autênticos de substâncias fenólicas descritas no item 3.8.4. Os tempos de retenção das substâncias testadas são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16. Tempos de retenção dos padrões das substâncias fenólicas injetadas. Volume de injeção 20 µL. Concentração: 0,1 µg/ µL**

Padrão	Classe da substância	Tempo de retenção (minutos)
Ácido gálico	Ácido benzóico	9,769
Ácido 3,4-diidrobenzóico	Ácido benzóico	11,481
Ácido clorogênico	Éster de ácido cinâmico	12,826
Catequina	Flavan-3-ol	12,856
(-)-epicatequina	Flavan-3-ol	14,634
Ácido Caféico	Ácido cinâmico	14,825
Ácido siríngico	Ácido benzóico	14,873
(-)-epigallocatequina	Flavan-3-ol	15,165
Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido cinâmico	20,154
Rutina	Flavonol glicosidado	22,234
Ácido sinápico	Ácido cinâmico	22,822
Miricetina	Flavonol	36,860
Quercetina	Flavonol	46,614
(+/-)-naringenina	Flavanona	58,460
Apigenina	Flavona	62,678
Kaempferol	Flavonol	66,693

Conforme esses resultados, a eluição por classes de substâncias seguiu em geral a ordem: ácidos benzóicos, flavanóis, ácidos cinâmicos, na faixa compreendida entre 8 e 23 minutos, seguida pelos flavonóis, flavanonas e flavonas na faixa compreendida entre 30 e 70 minutos. Por comparação dos tempos de retenção dos picos nos perfis cromatográficos (Figuras 13 e 14) com os tempos de retenção dos padrões, constatou-se que oito das substâncias testadas poderiam estar presentes nas amostras Mch-EE-F2 (chuva) e Msec-EE-F2 (seca), entre eles, ácido *p*-cumárico, rutina, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina e kaempferol.

Os espectros UV das substâncias padrão que se considerou estarem presentes nas amostras Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2 são apresentados na Figura 15.

#### **4.6.5. Estudo do efeito da matriz de dissolução nos tempos de retenção de substâncias fenólicas: injeção de mistura de padrões**

Para estudar o efeito da matriz de dissolução sobre os tempos de retenção dos padrões ácido *p*-cumárico, rutina, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina e kaempferol foi preparada uma mistura contendo 50,0 µL de cada padrão na concentração 0,10 mg/mL. A mistura foi resolvida com o mesmo sistema cromatográfico (Secção 3.8.3) utilizado para as amostras Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2. Volume de injeção 20,0 µL. O cromatograma obtido apresenta-se na Figura 16 e os tempos de retenção encontram-se na Tabela 17.

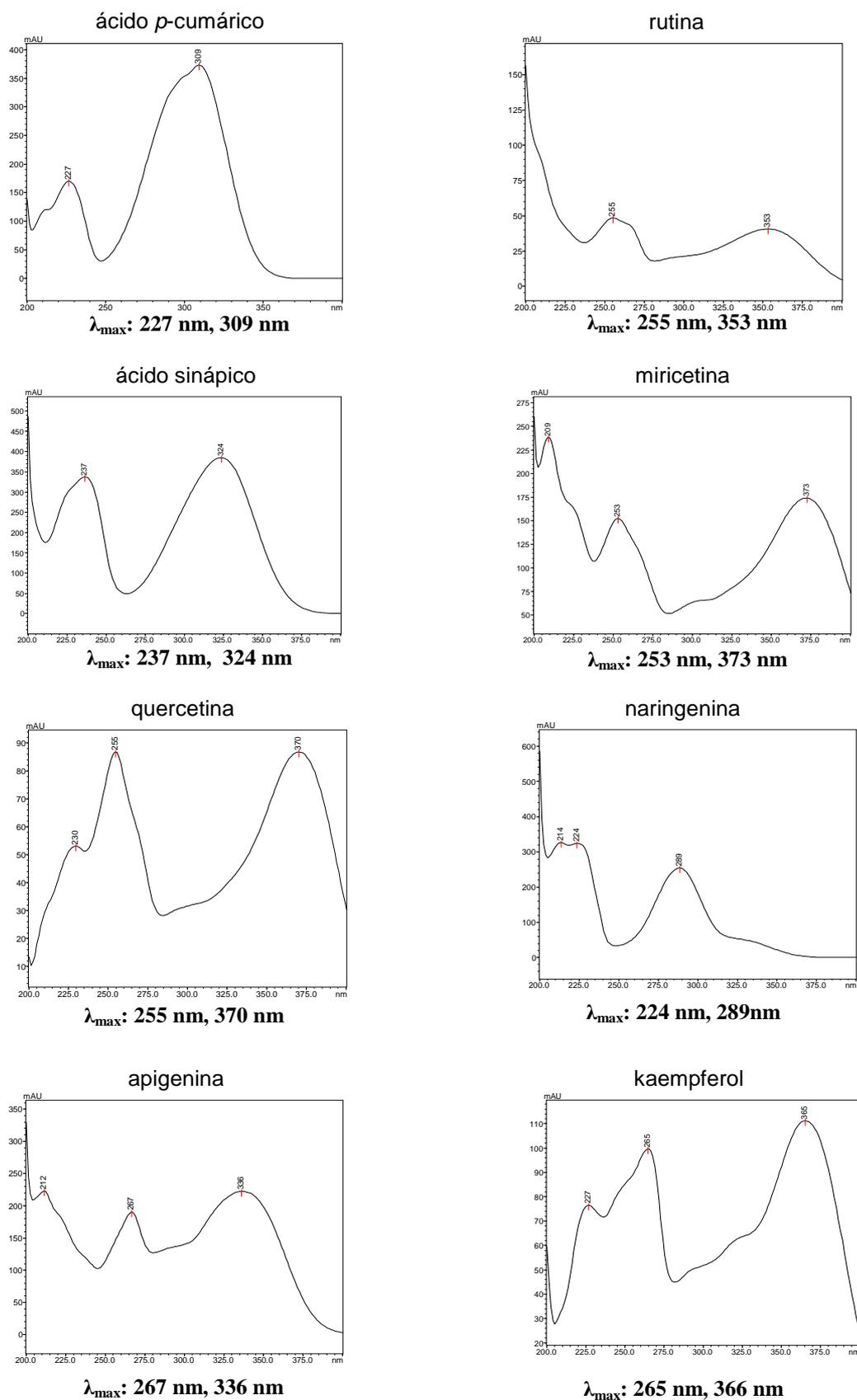
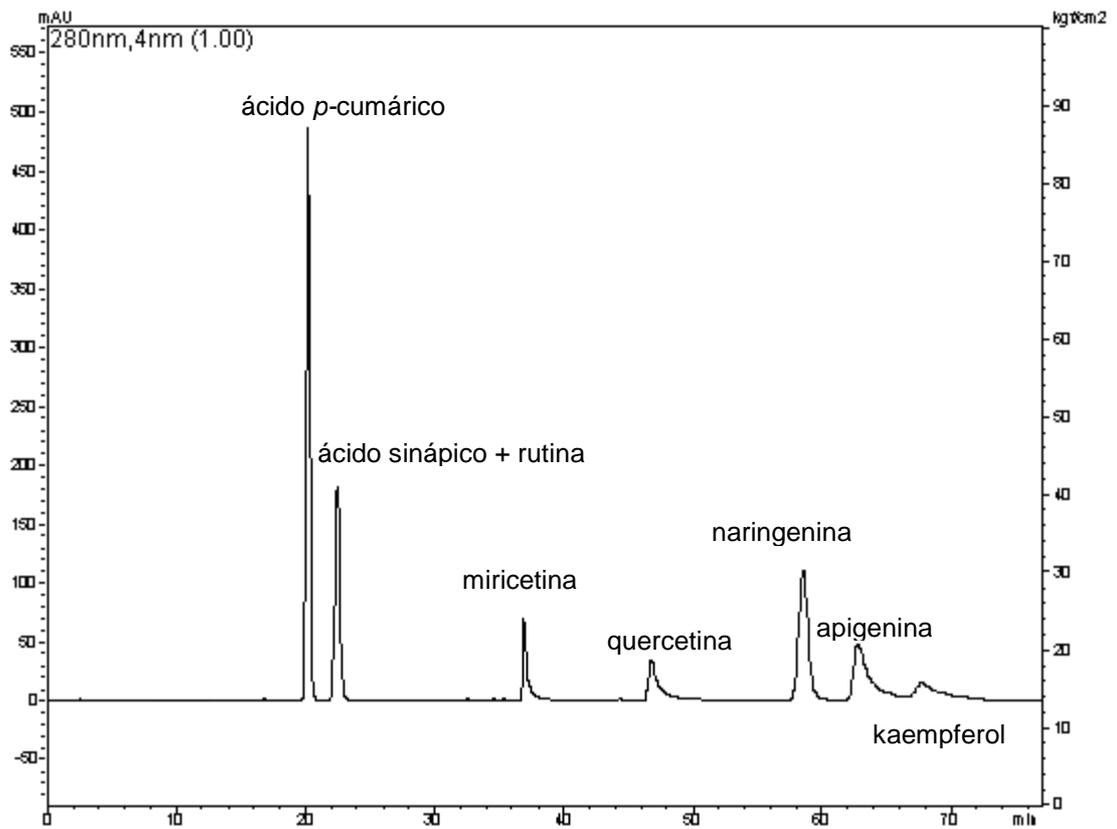


Figura 15. Espectros de absorção na região do ultravioleta das substâncias padrão em metanol: ácido *p*-cumárico, rutina, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina e kaempferol.



**Figura 16. Cromatograma da mistura de padrões selecionados.**

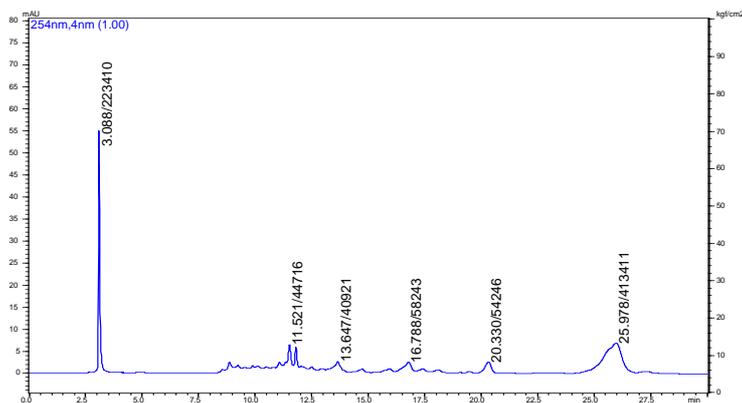
Observa-se que na figura 16 aparece um pico a menos que o número total esperado (oito), isso ocorre porque o ácido sinápico e a rutina coeluem nessa condição, conseqüentemente somente um pico com tempo de retenção 22,4 minutos é observado. Em geral, para todos os padrões testados o tempo de retenção variou ligeiramente quando injetados em uma mistura devido ao efeito da matriz de dissolução. O flavonóide kaempferol foi aquele que apresentou a maior variação.

**Tabela 17. Tempos de retenção dos padrões ácido *p*-cumárico, rutina, ácido sinápico, miricetina, quercetina, naringenina, apigenina e kaempferol injetados em forma isolada e em uma mistura.**

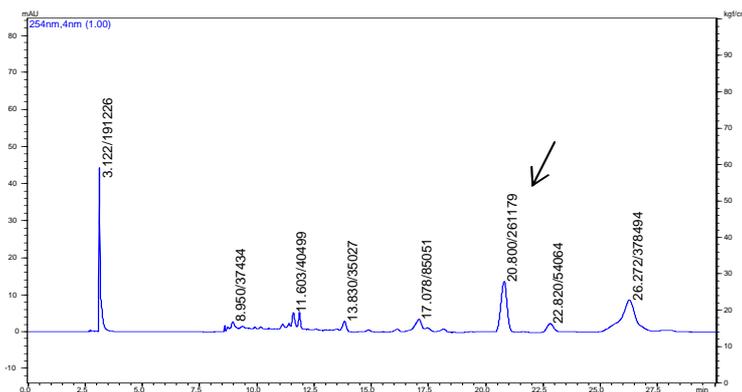
Padrão	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção (minutos)
	Injeção: separada	Injeção: mistura
Acido <i>p</i> -cumárico	20,154	20,213
Rutina	22,234	22,449
Acido sinápico	22,822	22,449
Miricetina	36,860	36,908
Quercetina	46,614	46,769
Naringenina	58,460	58,563
Apigenina	62,678	62,832
Kaempferol	66,693	67,739

#### **4.6.6. Identificação das substâncias fenólicas: co-injeção de padrões**

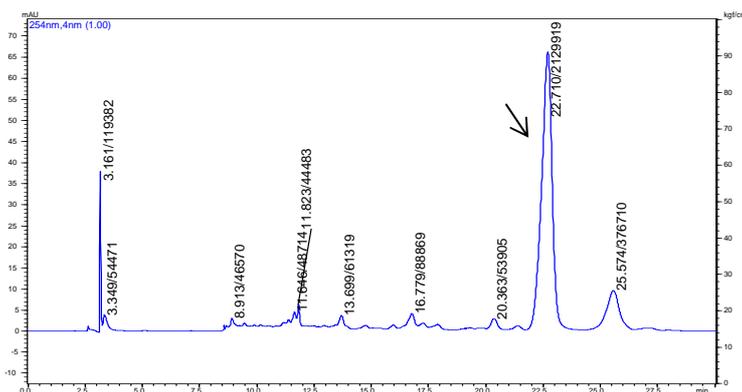
Para determinar a presença dos padrões testados na seção anterior foram feitas co-injeções das amostras Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2 com cada substância. Para isso uma alíquota da amostra foi misturada com uma quantidade conhecida de padrão. Calculou-se uma adição de massa do padrão para se obter um aumento da intensidade do pico de interesse em aproximadamente quatro vezes. Cada alíquota foi resolvida com o sistema cromatográfico do item 3.8.3. O aumento da intensidade dos picos no cromatograma original (Mch-EE-F2, Figura 13 e Msec-2EE-F2, Figura 14) em um tempo de retenção já identificado para um padrão autêntico permitiu confirmar a presença ou ausência da substância na amostra. Os cromatogramas obtidos para a amostra Mch-EE-F2 são apresentados nas Figuras 17 a 19 e nas Figuras 20 a 22 para a amostra Msec-EE-F2. Os tempos de retenção e as áreas dos picos obtidas nas co-injeções apresentam-se na Tabela 18.



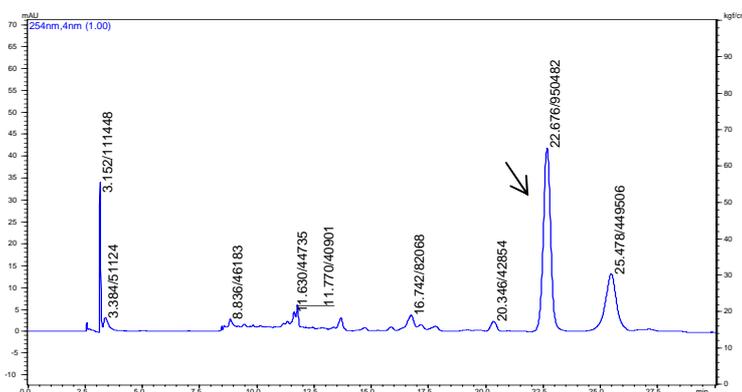
Perfil da fração Mch-EE-F2: zona de eluição entre 0 e 30 minutos.



(a) Co-injeção com ácido *p*-cumárico.

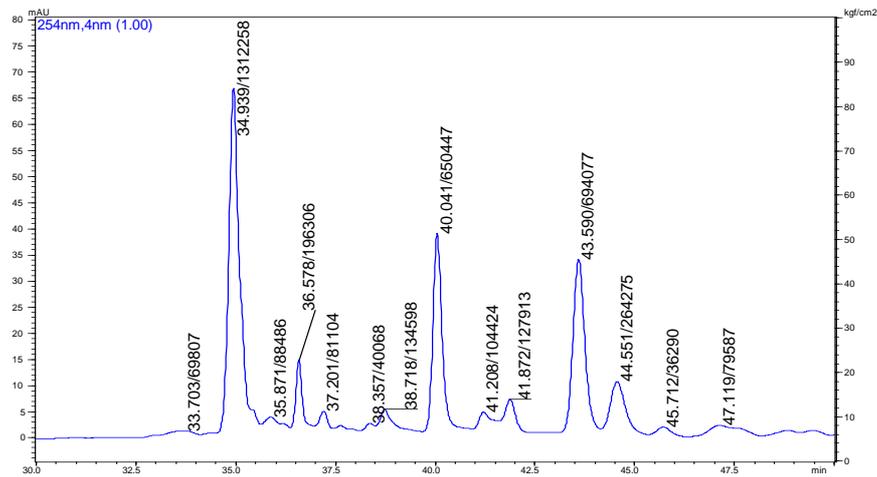


(b) Co-injeção com rutina.

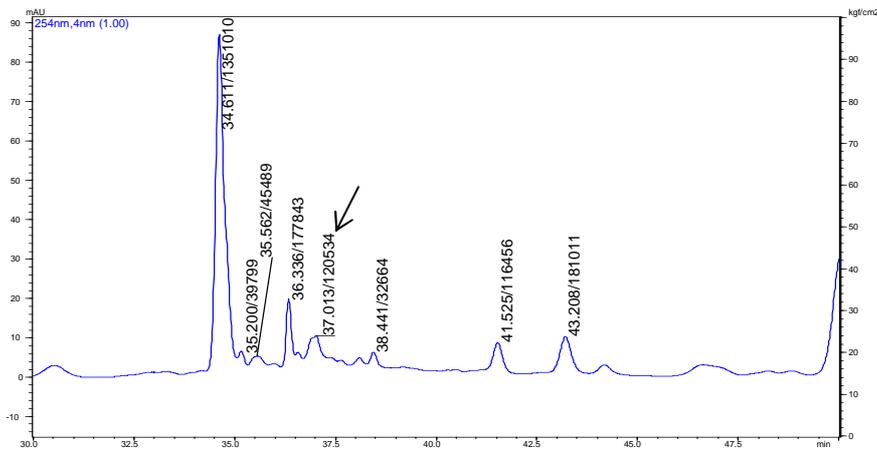


(c) Co-injeção com ácido sinápico.

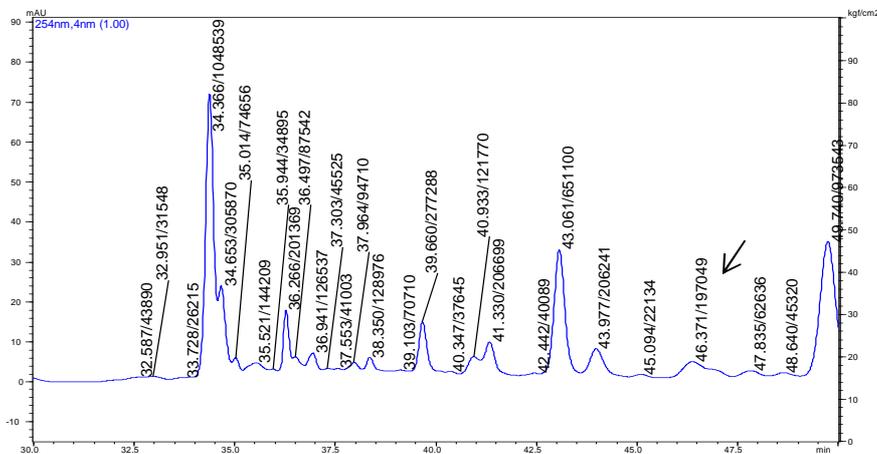
Figura 17. Cromatogramas das co-injeções da fração Mc-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de chuva com os padrões (a) ácido *p*-cumárico, (b) rutina, (c) ácido sinápico. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50  $\mu$ L. As setas indicam os tempos de retenção nos quais observou-se um aumento da área de pico devida à coeluição de um padrão.



Perfil da fração Mch-EE-F2: zona de eluição entre 30 e 50 minutos.

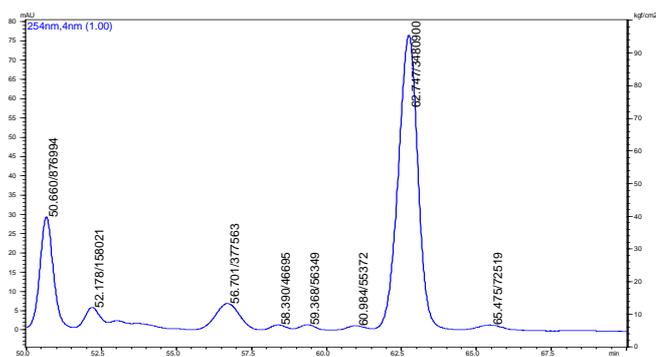


(d) Co-injeção com miricetina

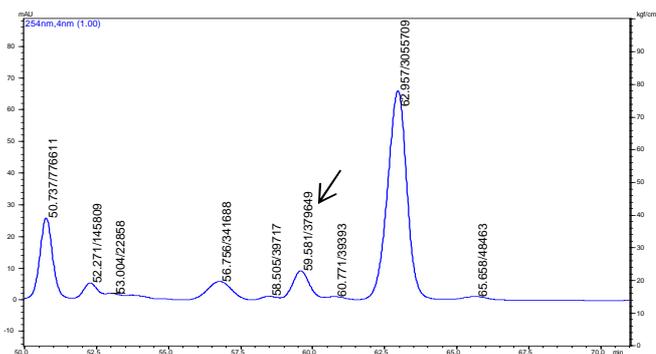


(e) Co-injeção com quercetina.

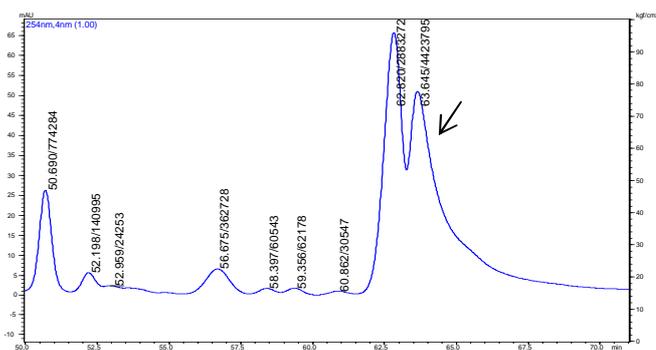
Figura 18. Cromatogramas das co-injeções da fração Mc-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de chuva com os padrões (d) miricetina, (e) quercetina. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50  $\mu$ L. As setas indicam os tempos de retenção nos quais observou-se um aumento da área de pico devida à coeluição de um padrão.



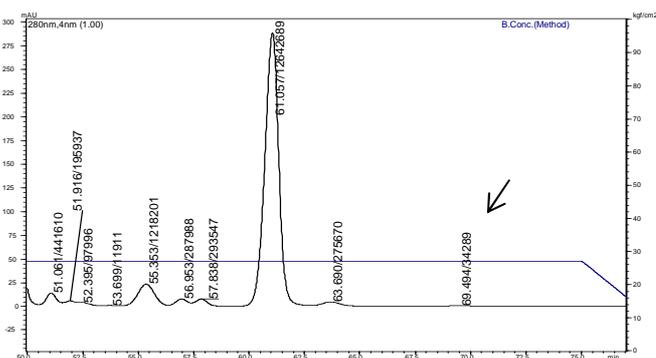
Perfil da fração Mch-EE-F2: zona de eluição entre 50 e 70 minutos.



(f) Co-injeção com naringenina.

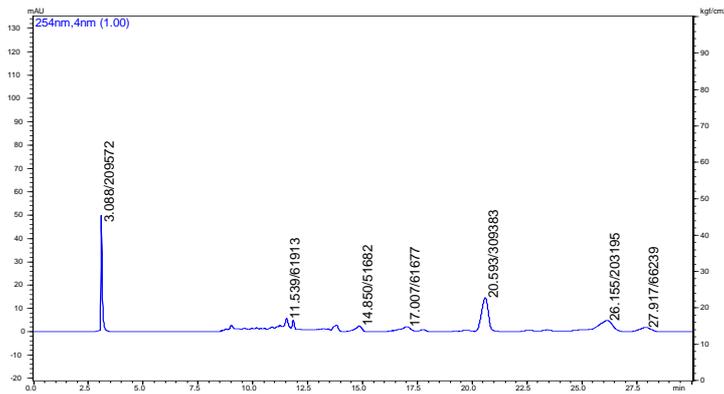


(g) Co-injeção com apigenina.

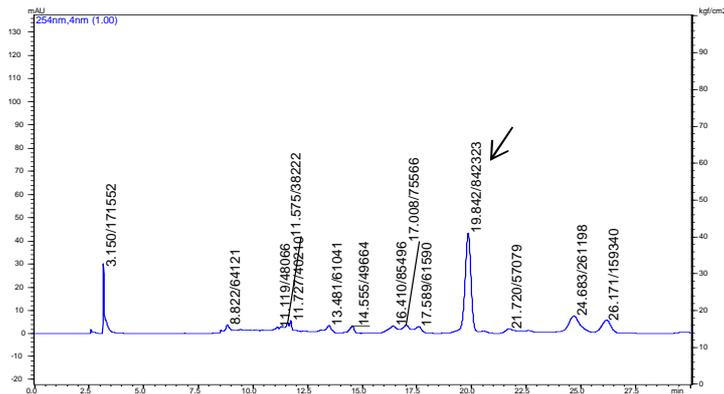


(h) Co-injeção com kaempferol.

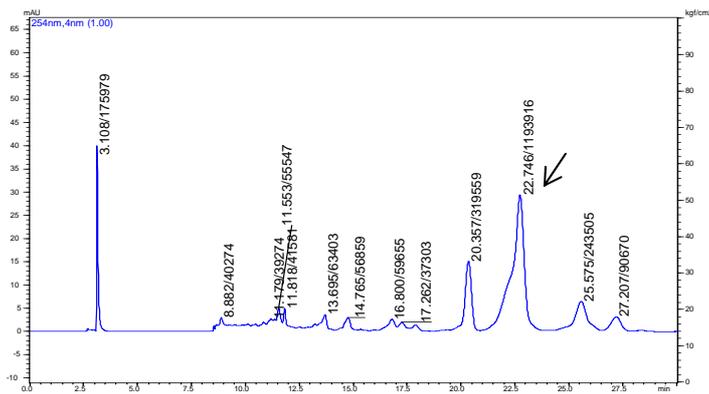
Figura 19. Cromatogramas das co-injeções da fração Mc-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de chuva com os padrões (f) naringenina, (g) apigenina, (h) kaempferol. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50  $\mu$ L. As setas indicam os tempos de retenção nos quais observou-se um aumento da área de pico devida à coeluição de um padrão.



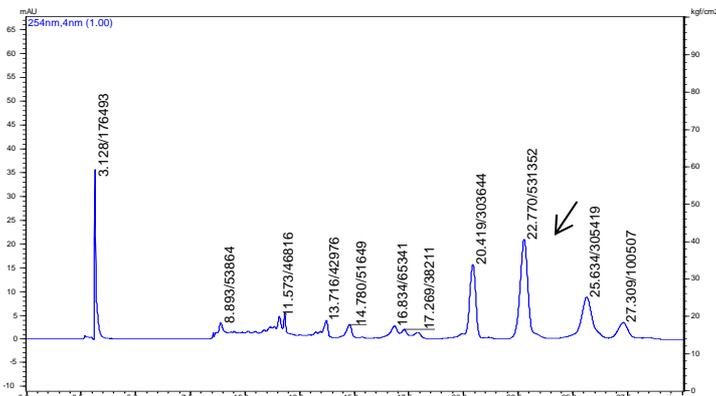
Cromatograma base Msec-EE-F2: zona de eluição entre 0 e 30 minutos



(a) Co-injeção com ácido *p*-cumárico.

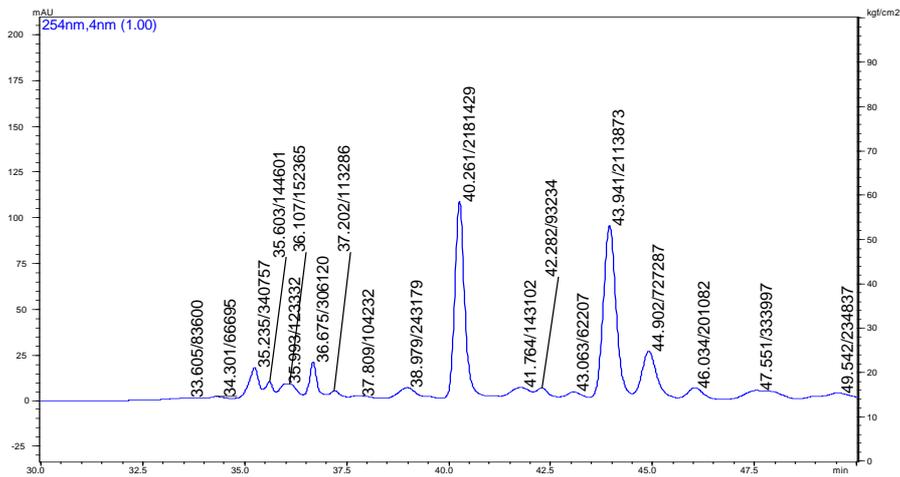


(b) Co-injeção com rutina

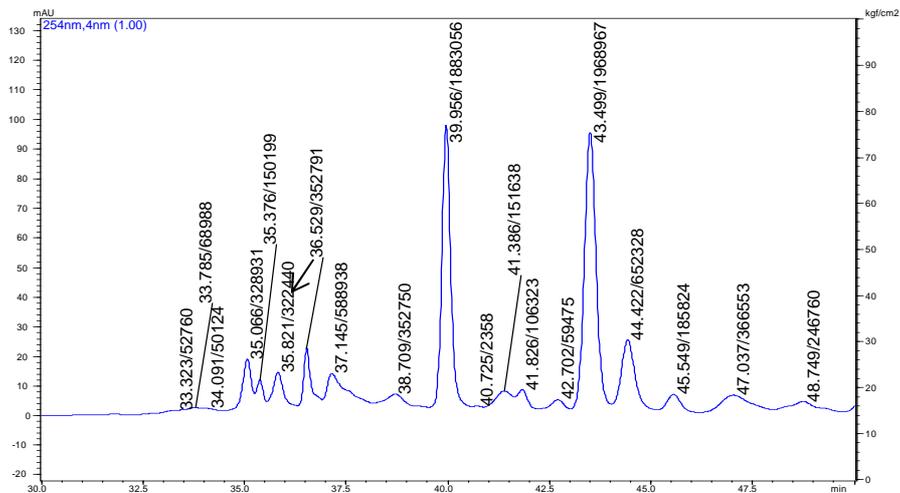


(c) Co-injeção com ácido sinápico

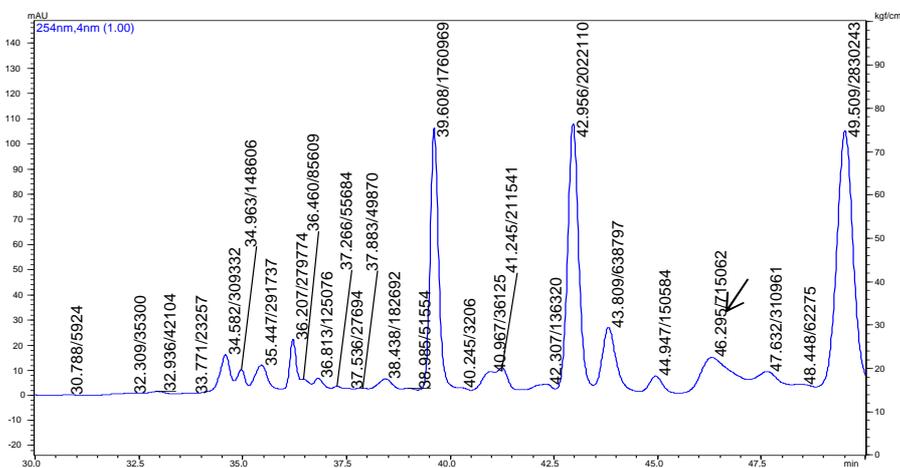
Figura 20. Cromatogramas das co-injeções da fração Ms-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de seca com os padrões (a) ácido *p*-cumárico, (b) rutina, (c) ácido sinápico. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50  $\mu$ L. As setas indicam os tempos de retenção nos quais observou-se um aumento da área de pico devida à coeluição de um padrão.



Perfil da fração Msec-EE-F2: zona de eluição entre 30 e 50 minutos.

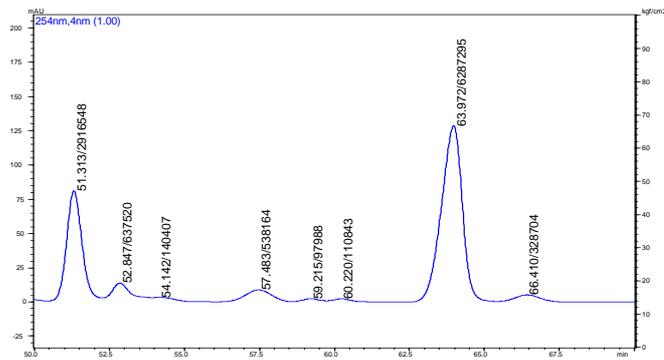


(d) Co-injeção com miricetina

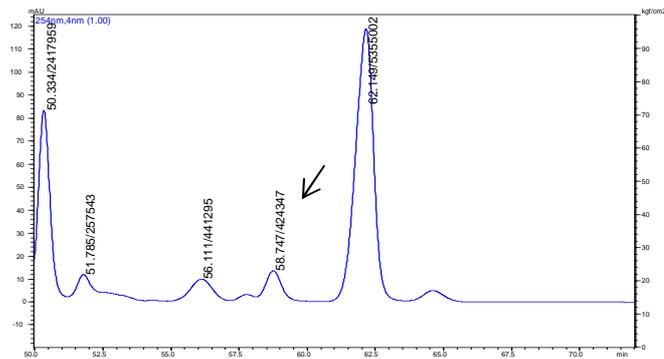


(e) Co-injeção com quercetina

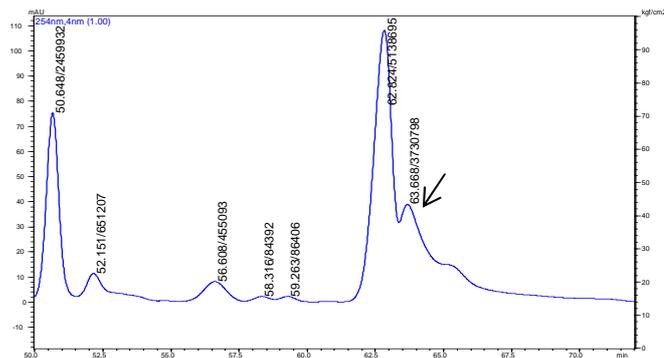
Figura 21. Cromatogramas das coinjeções da fração Ms-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de seca com os padrões (d) miricetina, (e) quercetina. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50  $\mu$ L. As setas indicam os tempos de retenção nos quais observou-se um aumento da área de pico devida à coeluição de um padrão.



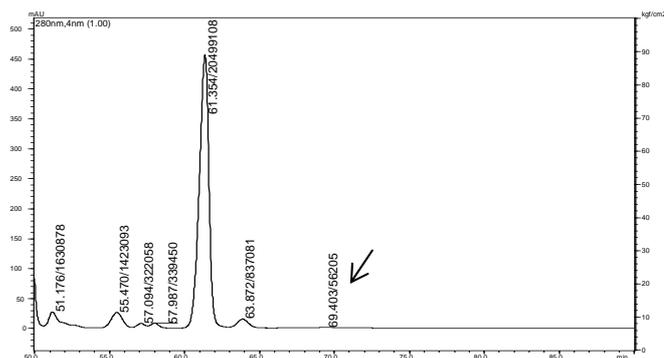
Perfil da fração Msec-EE-F2: zona de eluição entre 50 e 70 minutos.



(f) Co-injeção com naringenina.



(g) Co-injeção com apigenina



(h) Co-injeção com kaempferol

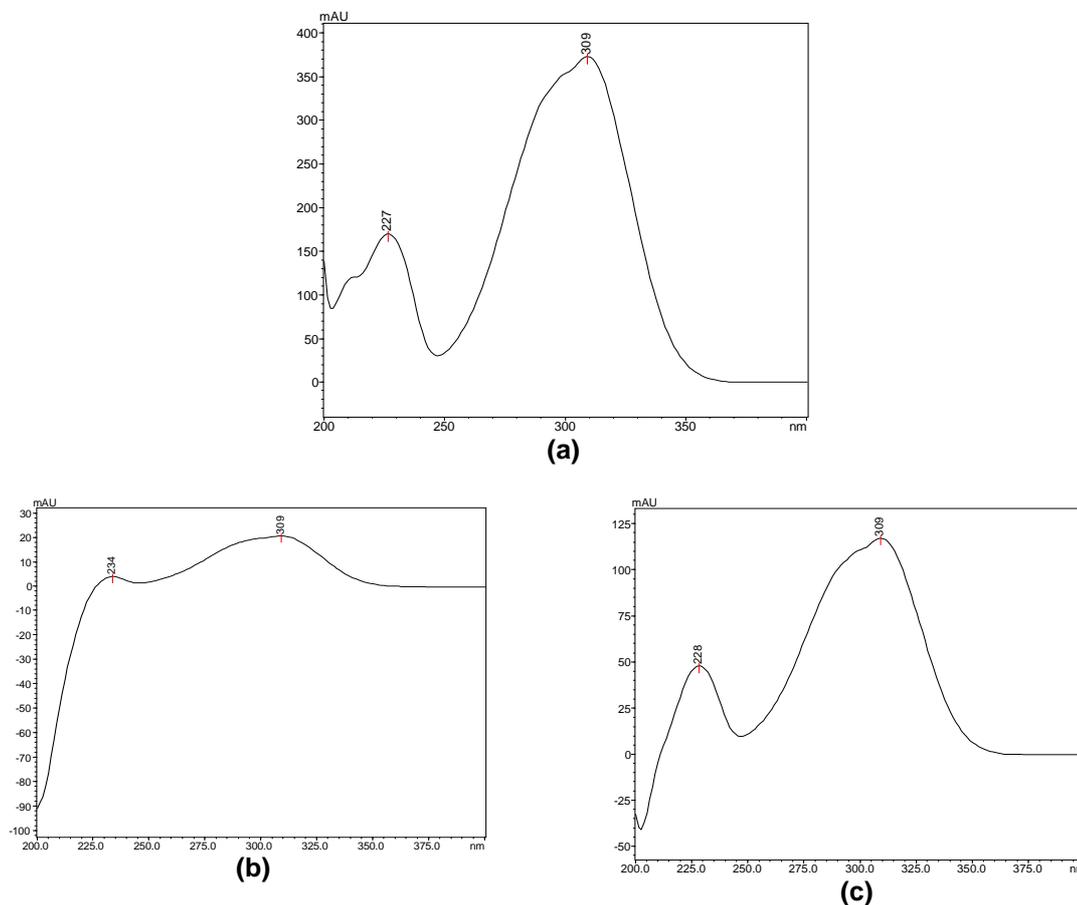
**Figura 22. Cromatogramas das co-injeções da fração Ms-EE-F2, obtida por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de seca com os padrões (f) naringenina, (g) apigenina, (h) kaempferol. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: ACN. Gradiente: 0-5 min (0-18 % B), 5-25 min (18 % B), 25-30 min (18-28 % B), 30-65 min (28 % B), 65-70 min (28-0 % B). Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção: 50  $\mu$ L. As setas indicam os tempos de retenção nos quais observou-se um aumento da área de pico devida à coeluição de um padrão.**

Tabela 18. Comparação entre os tempos de retenção no perfil cromatográfico (sem co-injeção) e os tempos de retenção nas co-injeções para as frações Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2 obtidas por pré-tratamento do pólen de *Melipona seminigra* coletado na época de chuva e de seca.

Padrão	Tempo de retenção (min) sem co-injeção	Área do pico sem co-injeção	Tempo de retenção (min) co-injeção	Área do pico na co-injeção	Resultado	$\Delta$
<b>Amostra Mch-EE-F2 (chuva)</b>						
Acido p-cumárico	20,330	54246	20,800	261179	++	0,470
Rutina	--	--	22,710	2129989	-	--
Ácido sinápico	--	--	22,676	950482	-	--
Miricetina	37,201	81104	37,013	120534	+	0,188
Quercetina	47,119	79587	46,371	197049	+	0,748
Naringenina	59,368	56349	59,581	379649	+	0,213
Apigenina	62,747	3480900	63,645	4423795	-	0,898
Kaempferol	65,475	72519	69,494	34289	-	4,019
<b>Amostra Msec-EE-F2 (seca)</b>						
Acido p-cumárico	20,593	309383	19,842	842323	++	0,751
Rutina /MeOH	--	--	22,746	1193916	-	--
Ácido sinápico	--	--	22,770	531352	-	--
Miricetina	35,993	123332	35,821	322440	+	0,172
Quercetina	47,551	333997	46,295	715062	+	1,256
Naringenina	60,220	110843	58,747	424347	+	1,473
Apigenina	63,972	6287295	63,668	3730798	-	0,304
<i>Kaempferol</i>	66,410	328704	69,403	56205	-	2,993

- (++) O resultado da co-injeção sugere a presença da substância na amostra.  
 (+) O resultado da co-injeção não é conclusivo sobre a presença de substância na amostra.  
 (-) O resultado da co-injeção confirma a ausência da substância na amostra.

O espectro de absorção no ultravioleta do padrão do ácido *p*-cumárico e os espectros dos picos que eluem em 20,330 minutos (Mch-EE-F2) e 20,593 minutos (Msec-EE-F2) se apresentam na Figura 23.



**Figura 23. Espectros de absorção no ultravioleta de: (a) padrão de ácido *p*-cumárico (tempo de retenção: 20,154 minutos); (b) pico em 20,330 minutos no perfil cromatográfico da amostra Mch-EE-F2 e (c) pico em 20,593 minutos no perfil cromatográfico da amostra Msec-EE-F2.**

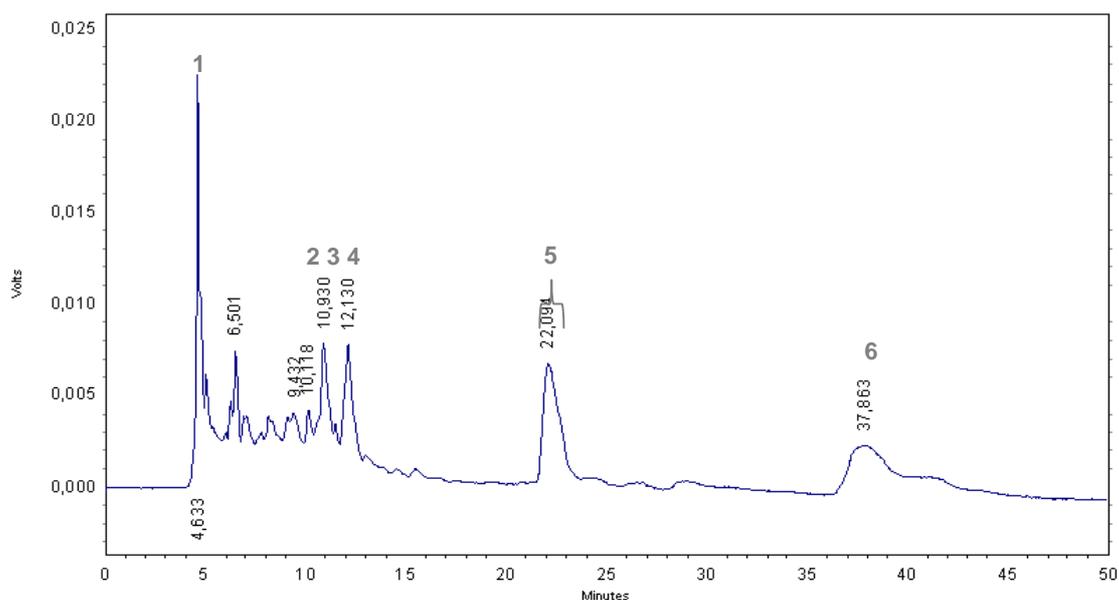
Baseado nos tempos de retenção da amostra e dos padrões e na análise comparativa dos espectros dos espectros de absorção na região ultravioleta, os picos que eluem em 20,330 min e 20,593 min para Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2 respectivamente foram identificados como ácido *p*-cumárico.

Os picos que eluem em 37,013 e 35,821 minutos; em 46,371 e 46,295 minutos e em 59,581 e 58,747 minutos para Mch-EE-F2 e Msec-EE-F2,

respectivamente, foram identificados como miricetina, quercetina e naringenina com base na coincidência dos tempos de retenção com as substâncias-padrão e no aumento da área dos picos com adição de padrão. Nesses últimos casos a evidência não é conclusiva devido à dificuldade para obter os espectros UV a partir dos perfis cromatográficos das amostras.

#### 4.7. Identificação da substância fenólica isolada: análise do espectro de RMN $^1\text{H}$

Pelo procedimento de isolamento por CLAE semi-preparativa obtiveram-se seis frações como apresentado no cromatograma da Figura 24.



**Figura 24.** Cromatograma da fração Mch-EE-F2, obtida por pré-tratamento do extrato etanólico do pólen coletado por *Melipona seminigra* durante o período de chuva, resolvida por CLAE semi-preparativa em fase reversa. Fase móvel A: TFA pH 2,0. Fase móvel B: MeOH. Método isocrático: 45 % B. Tempo: 40 minutos. Fluxo: 12 mL/min.

A partir da fração No. 5 foi obtido 0,9 mg de um sólido amarelo amorfo, solúvel em metanol. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amostra (Anexo A) indicou tratar-se

de um flavonóide glicosilado. Observou-se a presença de dois anéis aromáticos. O anel A com a presença de dois hidrogênios aromáticos em posição *meta* característicos de anéis aromáticos dissubstituídos provenientes da via do acetato, H-6 em  $\delta$  6,22 como um dubleto com constante de acoplamento de 2,0 Hz e H-8 em  $\delta$  6,39 como um dubleto com constante de acoplamento de 2,0 Hz. No anel B, observou-se a presença de três hidrogênios aromáticos em posição orto e meta, característicos de anéis aromáticos trissubstituídos provenientes da via chiquimato, H-2' a  $\delta$  7,34 com um dubleto com acoplamento de 2,0 Hz, H-5' a  $\delta$  6,92 como um dubleto com acoplamento de 8,3 Hz e H-6' a 7,31 ppm como um duplo dubleto com acoplamentos de 8,3 e 2,4 Hz.

A unidade de ramnosil é indicada pela presença do hidrogênio anomérico H-1" a 5,36 ppm como um dubleto com acoplamento de 1,5 Hz e de hidrogênios de uma metila em dubleto ( $J=6,3$  Hz) a  $\delta$  0,95.

Todos os sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dessa substância são apresentados na Tabela 19. Os sinais foram comparados com os dados da literatura (Muzitano et al., 2006) indicando tratar-se da substância 3-O-ramnosil-quercetrina.

Tabela 19. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H observados para 3-O-ramnosil-quercetrina em metanol deuterado (MeOD-d4)

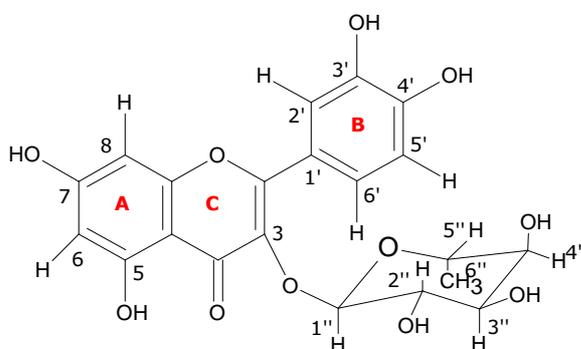
Posição	$\delta_H$ [mult., <i>J</i> (Hz)]	$\delta_H$ [mult., <i>J</i> (Hz)], Literatura <sup>1</sup>
<i>Aglicona</i>		
6	6,22 <i>d</i> (2,0)	6,19 <i>d</i> (2)
8	6,39 <i>d</i> (2,0)	6,37 <i>d</i> (2)
2'	7,34 <i>d</i> (2,0)	7,36 <i>d</i> (2,07)
5'	6,92 <i>d</i> (8,3)	6,93 <i>d</i> (8,3)
6'	7,31 <i>dd</i> (8,3; 2,4)	7,29 <i>dd</i> (8,32; 2,07)
<i>Ramnosídeo</i>		
1''	5,36 <i>d</i> (1,5)	5,37 <i>d</i> (0,93)
2''	4,22 <i>m</i>	4,19 <i>m</i> <sup>(b)</sup>
3''	3,75 <i>dd</i> (9,0; 3,5)	3,89 <i>dd</i> (9,70; 3,70)
4''	(a)	3,35 <i>dd</i> (9,70; 9,70)
5''	(a)	3,87 <i>dd</i> (9,70; 6,20)
Me	0,95 <i>d</i> (6,3)	1,10 <i>d</i> (6,20; 8)

<sup>1</sup> Muzitano et al. (2006). Campo magnético 300 MHz.

Mult: multiplicidade. *J*: constante de acoplamento em Hz.

(a), (b) Sinal sobreposta com CD<sub>3</sub>OD.

A estrutura da substância isolada apresenta-se no Esquema 13.



Esquema 13. Estrutura do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).

## CONCLUSÕES

O pólen coletado por *Melipona seminigra* tanto da estação de chuva como da estação de seca na cidade de Manaus demonstrou ser uma fonte importante de nutrientes e energia.

A análise da origem botânica indicou que a espécie *Miconia dispar* (Melastomateaceae) foi a principal fonte de pólen para a abelha *Melipona seminigra* durante os períodos de coleta, abril (chuva) e agosto (seca) de 2008, no meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas do INPA na cidade de Manaus.

A amostra de pólen coletado por *Melipona seminigra* correspondente à estação de seca apresentou teores de extrativos em água e em etanol maiores que a amostra de chuva.

As amostras tanto da estação de seca como da estação de chuva apresentaram perfis de componentes apolares similares quando analisados através de cromatografia em camada delgada comparativa em fase normal (CCDC-FN). As duas amostras revelaram a presença de substâncias fenólicas, especialmente flavonóides como observado através de cromatografia em camada delgada comparativa em fase reversa (CCDC-FR). Os métodos desenvolvidos para a análise por CCDC-FN e FR demonstraram ser eficazes para o monitoramento rápido da composição de componentes apolares e fenólicos nas amostras de pólen.

O teor de fenólicos totais expresso em g de ácido gálico/ 100 g de pólen seco foi maior para a amostra da época de seca (2,19 g A.G/100 g) que para a amostra da

época de chuva (1,34 g A.G./100 g). Os valores determinados são inferiores ao valor médio publicado por Carpes e colaboradores (2008) para amostras de pólen da abelha *Apis mellifera* coletadas no Sul do Brasil.

Os extratos/frações do pólen coletado por *Melipona seminigra* correspondentes à estação de chuva e à estação de seca apresentaram atividade antioxidante frente a radicais livres e capacidade de redução de Fe (III). Nos dois casos a atividade foi maior nas frações em acetato de etila. Os resultados sugerem que a maior atividade dessas frações é resultado da maior concentração das substâncias fenólicas/flavonóides nesse extrato.

Foi desenvolvida uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência que permite obter os perfis químicos dos componentes fenólicos do pólen da *Melipona seminigra*. Isso incluiu o desenvolvimento de um procedimento para o pré-tratamento das amostras através de extração em fase sólida (com SEPPAK-C18) visando (i) a diminuição de substâncias apolares de caráter não fenólico que podem danificar a coluna e portanto diminuir seu tempo de vida (ii) concentrar os compostos fenólicos de média polaridade que se considera sejam os responsáveis pela atividade antioxidante. O método de análise consiste em um gradiente não linear utilizando como fase móvel (A) H<sub>2</sub>O acidificada com TFA, pH 2,0 e fase móvel (B) ACN. Esse método configura-se como uma ferramenta importante para a realização de futuras análises de caracterização do pólen coletado por abelhas sem ferrão na cidade de Manaus.

Qualitativamente, os perfis cromatográficos de fenólicos/flavonóides das amostras do pólen coletado por *Melipona seminigra* durante a estação de chuva e de seca são

similares sendo a principal diferença o pico que elue em 34,4 minutos. As mudanças nos perfis podem ser associadas à variação na origem botânica das amostras, sendo o perfil da amostra de seca mais representativo de uma composição monofloral com base na espécie *Miconia díspar* (95,60 % como pólen dominante).

Com base nos resultados dos tempos de retenção, a co-cromatografia e a comparação dos espectros UV, os picos que eluem em 20,330 minutos e 20,593 minutos nos perfis cromatográficos dos extratos etanólicos purificados (extração em fase sólida) da época de chuva e de seca foram identificados como ácido *p*-cumárico.

Os picos em 37,013 e 35,821 minutos; em 46,371 e 46,295 minutos e em 59,581 e 58,747 minutos para a amostra de chuva e de seca respectivamente, foram identificados como miricetina, quercetina e naringenina com base na coincidência dos tempos de retenção e no aumento da área dos picos.

O componente principal da fração resultante do pré-tratamento por extração em fase sólida do extrato etanólico da amostra da época de chuva foi purificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala semi-preparativa em fase reversa. A análise dos dados espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$ ) indicaram tratar-se da quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).

## REFERÊNCIAS

- Absy, M.L.; Kerr, W.E. Algumas plantas visitadas para obtenção de pólen por operarias de *Melipona seminigra merrillae* em Manaus. **Acta Amazônica**, v. 7(3), 309-315, 1977.
- Absy, M.L.; Bezerra, E.B.; Kerr, W.E. Plantas nectaríferas utilizadas por duas espécies de *Melipona* da Amazonia. **Acta Amazônica**, v. 10 (2), 271-281, 1980.
- Absy, M.L.; Camargo, J.M.F.; Kerr, W.E.; Miranda, I.P.A. Especies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera: Apidea) para coleta de pólen na região do medio Amazonas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44 (2), 227-237, 1984.
- Adlercreutz, H.; Mazur, W. Phyto-oestrogens and western diseases. **Annals of Medicine**, v. 29 (2), 95-120, 1997.
- Aguiar, J.P.L. Tabela de composição alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 26 (1/2), 121-126, 1996.
- Aguiar, A.; Ferras, A.; Contreras, D.; Rodríguez, J. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30 (3), 623-628, 2007.
- Almaraz-Abarca, N.; Delgado-Alvarado. A.; Ávila-Reyez, J.A.; Naranjo-Jimenez. N.; Corral-Herrera, J. Actividad antioxidante de extractos de pólen de abeja monoespecífico de Mezquite (*Prosopis* sp). In: Congreso Internacional de Actualización Apícola, 10, 2003, Tlaxcala, México. **Memorias**. Tlaxcala: A.C-SAGARPA, 2003. p 46-52.
- Almaraz-Abarca, N.; Campos, M.G.; Avila-Reyes, J.A.; Naranjo-Jimenez, N.; Herrera-Corral, J.; González-Valdez, L.S. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. **Interciencia**, v. 29 (10), 574-578. 2004.
- Almaraz-Abarca, N.; Campos, M.G.; Avila-Reyes, J.A.; Naranjo-Jimenez, N.; Herrera-Corral, J.; González-Valdez, L.S. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, 119-124. 2007a.
- Almaraz-Abarca, N.; Campos, M.G.; Delgado-Alvarado, A.; Avila-Reyes, A.; Jimenez-Naranjo, N.; Corral-Herrera, J.; Tomatas, A.F.; Almeida, A.J.; Vieira, A. Fenoles del pólen de *Stenocactus*, *Echinocereus* e *Mammillaria* (Cactaceae). **Polibotanica**, v. 23, 37-55. ISSN 1405-2768. 2007b.
- Andersen, O.M.; Markham, K.R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton, FL: CRC Press. 2006. 1213 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 13th ed., Washintong: AOAC International, 1980, 858 p.

Augusto, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.

Bacelar-Lima, C.G.; Freire, D.C.B.; Colleto-Silva, A.; Costa, K.B.; Laray, J.P.B.; Vilas-Boas, H.C.; Carvalho-Zilse, G.A. Melicotoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 y *Melipona compressipes manaosensis* Scwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonía Central, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 36(3): 343-348, 2006.

Bankova, V.; Popova, M.; Própolis of Stingless Bees: a Promising Source of Biologically Active Compounds: Review Article. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1(1), 88-92, 2007.

Benzi, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239(1), 70-76, 1996.

Biesmeijer, J.C.; Slaa, E.J.; De Castro, M.S.; Viana, B.; Kleinert, A.M.P.; Imperatriz-Fonseca, V.L. Connectance of Brazilian social bee-food plant networks is influenced by habitat, but not by latitude, altitude or network size. **Biota Neotropica**, v. 5(1), 1-9, 2005.

Bligh, E.G.; Dyer, J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 3(7), 911-917, 1959.

Braça, A.; Morelli, I.; Mendez, J.; Pereira, G.; Arvelo, F. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, 379-381, 2002.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa N. 3 de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade, de Apitoxina, de Cera de Abelha, de Geléia Real, de Geléia Real Liofilizada, de Pólen Apícola, de Própolis, de Extrato de Própolis. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa>. Acesso em 10 dez. 2007.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, 25-30, 1995.

Bravo, L.; Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutritional Reviews**, v. 56, 317-333, 1998.

Calgarotto, A.K.; Miotto, S.; Honório, K.M.; da Silva, A.B.F.; Marangoni, S.; Silva, J.L.; Comar Jr. J.; Oliveira, K.M.Y.; da Silva, S.L. A multivariate study on flavonoid compounds scavenging the peroxy nitrite free radical. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, v. 808, 25-33, 2007.

Campos, M.G.; Webby, R.F.; Markham, K.R.; Mitchell, K.A.; Da Cunha, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, 742-745, 2003.

Campos, M.G.R.; Bogdanov, S.; Almeida-Muradian, L.B.; Szczesna, T; Mancebo, Y.; Frigerio, C.; Ferreira, F. Pollen composition and standardization of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47 (2), 156-163, 2008.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22(5), 749-760, 1997.

Carpes, S.L.; Begnini, R.; Alencar, S.M.; Masson, M.L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31(6), p. 1818-1825, nov./dez. 2007.

Carpes, S.L.; Prado, A.; Moreno, I.A.M.; Mourão, G.B.; Alencar S.M.; Masson, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31(7), 1660-1664, 2008.

Carvalho-Zilse, G.A. Meliponicultura na Amazonia. **Anais do VII encontro sobre abelhas**. Ribeirão Preto, SP, 2006. Em CD-Room.

Cerqueira, F.M.; Gennari, M.H.; Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30(2), 441-449, 2007.

Cieslik, E.; Greda, A.; Adamus, W. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v. 94, 135-142, 2006.

Cortopassi-Laurino, M.; Seasonal Strategies of Harvesting by *Melipona* sp in the Amazon region. In International conference on tropical bees, 8., and Encontro sobre abelhas, 4., 2004. **Proceedings**. Ribeirão Preto, IBRA, 2004. p. 258-263.

Cortopassi-Laurino, M. et al. Global meliponiculture: challenges and oportunities. **Apidologie**, v. 37, 275-292. 2006.

Criqui, M.H & Ringel, B.L.; Does diet or alcohol explain the French paradox?. **Lancet**, v. 344, 1719-1723, 1994.

Da Silva, S.L.; Da Silva, A.; Honório, K.M.; Marangoni, S.; Toyama, M.H.; Da Silva, A.B.F. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. **Journal of Molecular Structure**. (Theochem.), v. 684, 1-7, 2004.

Dauguet, J.C.; Bert, M.; Dolley, J.; Bekaert, A.; Lewin, G. 8-methoxykaempferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. **Phytochemistry**, v. 33(6), 1503-1505, 1993.

De Ugaz, O.L. **Investigación Fitoquímica**. Métodos de estudio de productos naturales. 2ª ed. San Miguel: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 1994. 299 p.

Del Risco, C.A.R. Pólen-pan de abejas: composición, nutrición, acción en la salud humana y microbiología. Disponível em:

[http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/alimentacion/35\\_polen\\_pan\\_de\\_abejas.pdf](http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/alimentacion/35_polen_pan_de_abejas.pdf).

Acesso em 20 mar. 2008.

Dewick, P.M. **Medicinal Natural Products**. A Biosynthetic Approach. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2002. 515 p.

Dugas Jr, A.J.; Castañeda-Acosta, J.; Bonin, G.C.; Price, K.L.; Fischer, N.H.; Winston, G.W. Evaluation of the total peroxy-radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, v. 63, 327-331, 2000.

Endress, P.K.. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. New York, Cambridge University Press, 1996.

Fukumoto, L.R. & Mazza, G. Assesgin antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, 3597-3604, 2000.

Hamamoto, R.; Ishiyama, K.; Hashimoto, K.; Yamaguchi, M. Characterization of the active component in bee pollen *Cistus ladaniferus* extract in stimulating bone calcification and in inhibiting bone resorption in vitro. **Journal of Health Science**, v. 52 (5), 607-612, 2006.

Harborne, J.B. Twenty-five years of chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 18, 361-379, 2001.

Harnafi, H.; Amrani, S. Flavonoid as potent phytochemicals in cardiovascular diseases prevention. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1(2), 193-202, 2007.

Hollman, P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? **Journal of Food Science and Agricultural**, v. 81, 842-852, 2001.

Imperatriz-Fonseca, V.L.; Gonçalves L.S; De Jong, D.; Freitas B.M.; Castro M.S.; Dos Santos IA; Venturieri G.C. Abelhas e desenvolvimento rural no Brasil. **Mensagem Doce**, v. 80: 3-18. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Gráficos de chuva acumulada. Disponível em:

<http://www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?Ink=Gráficos>. Acesso em: 6 Fev. 2010.

Kerr, W.E.; Absy, M.L.; Marques-Souza, A.C. Espécies nectaríferas e poliníferas utilizadas pela abelha *Melipona compressipes fasciculata* (Meliponinae, Apidae), no Maranhão. **Acta Amazônica**, v. 16/17 (No. Único), 145-156. 1986.

Kerr, W.E.; Carvalho, G.A.; Nascimento, V.A. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação* – Belo Horizonte-MG: Acangaú, Coleção Manejo da vida Silvestre, 2, 1996. 143 p.

Kerr, W.W. Extinção de Espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponíneos. Encontro sobre Abelhas, 5., 2002, Ribeirão Preto, SP. **Anais**. São Paulo: USP, 2002. p. 4-9.

King, A.; Young, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, 213-218, 1999.

Krell, R. **Value added products from beekeeping**. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, 1996.

Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T.; Anti-oxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, 329, 2004.

Leja, M.; Mareczek, A.; Wyzgolik, G.; Klepacz-Baniak, J.; Czekon´ska, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v.100, 237–240, 2007.

Lien, E.J.; Ren, S.; Bui, H.H.; Wang, R. Quantitative structure-activity relationships analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, 285-294, 1999.

Lins, A.C.S.; Silva, T.M.S.; Câmara, C.A; Silva, E.M.S.; Freitas, B.M. Flavonóides isolados do pólen coletado pela abelha *Scaptotrigona bipunctata* (canudo). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, 40-41, 2003.

Linskens, H.F.; Jorde, W. Pollen as food and medicine: A review. **Economic Botany**, v. 51(1), 78-87, 1995.

Loureiro, A.P.M.; Di Mascio, P.; Medeiros, M.H.G. Formação de Adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagenese e carcinogenese. **Química Nova**, v. 25, No. 5, 777-793, 2002.

Luximon-Ramman, B. T.; Soobratee, M.A.; Aruoma, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 5042-5047, 2002.

Manach, C.; Scalbert, A., Morand, X.; Rémésy, C; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, 727-747, 2004.

Markham, K.R.; Campos, M. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. **Phytochemistry**, v. 43(4), 763-767, 1996.

Markham, K.R.; Mitchell, K.A.; Campos, M. An unusually lipophilic flavonol glycoside from *Ranunculus sardous* pollen. **Phytochemistry**, v. 45(1), 203-204, 1997.

Marques-Souza, A.C. **Espécies de plantas visitadas para a coleta de pólen por cinco tipos de meliponíneos da Amazônia**. 1993. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, 1993.

Marques-Souza, A.C.; Miranda, I.P.A.; Moura, C.O; Rabelo, A.; Barbosa, E.M. Características morfológicas e bioquímicas do pólen coletado por cinco espécies de meliponíneos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 32(2), 217.229. 2002.

Marques-Souza, A.C.; Absy, M.L.; Kerr, W.E.; Pollen harvest features of the Central Amazonian bee *Scaptotrigona fulvicutis* Moure 1964 (Apidae: Meliponinae), in Brazil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 21(1), 11-20, 2007.

Mauricio, A.Q. **Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético**. 2006. Dissertação. Universidade de Brasília. Brasília D.F, 2006.

Meda, A.; Lamien, C.E.; Romito, M.; Milllogo, J.; Nacoulma, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, 571, 2005.

Miller N.J.; Miller, J.C. **Estadística y quimiometría para química analítica**. Madrid. Pearson Educacion, S.A, 2002.

Molyneux. P. The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazul (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science Technology**, v. 26(2), 211-219, 2004.

Muzitano, M.F.; Tinoco, L.W.; Guette, C.; Kaiser, C.R.; Rossi-Bergmann, B.; Costa, S.S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 67, 2071-2077, 2006.

Nagai, T.; Inoue, R.; Suzuki, N.; Takao, M.; Nagashima, T. Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen *Cistus ladaniferus*. **Journal of Molecular Medicine**, v. 15, 86-89, 2005.

Nagai, T.; Inoue, R.; Suzuki, N.; Tanoue, Y.; Kai, N.; Nagashima, T. Antihypertensive activities of enzymatic hydrolysates from honeybee-collected pollen of *Cistus ladaniferus*. **Journal of Food, Agricultural and Environment**, v. 5(3&4), 86-89, 2007.

Narayana, M.; Reddy, S.; Chaluvadi, M.R.; Krishna, D.R.; Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, 2-16, 2001.

Nogueira-Neto, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.

Núñez-Sellés, A. Antioxidant Therapy: Myth or Reality?. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 16(4), 699-710, 2005.

Peralta, F.J.A.; Mesquita, H.G.; Assis, M.G.P. Iniciação à Meliponicultura: criação de abelhas melíferas sem ferrão. Manaus: INPA/IPAAM/SEBRAE, 1999. 95 p.

Pernal, S.F.; Currie, R.W. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 31, 387-409, 2000.

Portugal-Araújo, V. **Contribuição para o conhecimento da biologia, cultura e domesticação das abelhas Amazônicas**. 1978. 180 f. Tese de Doutorado, Instituto

Nacional de Pesquisas da Amazônia /Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 1978.

Queiroz, J.; Hipólito, A.; de Vasconcelos, W.E.; da Silva, R.; da Silveira, P.H.; de Almeida, J.C.; Borges, P. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D., no município de Jandaira, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Universidade Estadual de Paraíba, Campina Grande, Brasil, v. 4(1), 1-21, 2004.

Ramalho, M.; Kleinert-Giovanni, A.; & Imperatriz-Fonseca, V.L. Utilization of floral resources by species of *Melipona* (Apidae, Meliponinae): floral preferences. **Apidologie**, v. 20, 185-195, 1989.

Ramalho, M.; Kleinert-Giovannini, A; Imperatriz-Fonseca, V.L. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. **Apidologie**, v. 21:469-488, 1990.

Renaud, S.; De Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, 1523-1526, 1992.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, F. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, 933-956, 1996.

Roubik, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**, New York: Cambridge University Press, 1989.

Salgado, M.L.L. **Contribuição à palinologia dos cerrados**, Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, 1971.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, 2000. Supplement. 2073S-2085S.

Scalbert, A.; Johnson, I.; Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **American Journal of Clinical Nutrition**, v 81(1), 2005. Supplement: 215S-217S.

Serra Bonvehi, J.; Gomez, A., Gonell, F. Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, 725-732, 1997.

Serra-Bonvehi, J.; Soliva-Torrento, M.; Centelles-Lorente, E.; Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49(4), 1843-1853, 2001

Schulz, J.B.; Lindenau, J.; Seyfried, J.; Dichgans, J. Glutathion, oxidative stress and neurodegeneration. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, 4904, 2000.

Silva, T.M.S.; Câmara, C.A.; Da Silva, A.C.; Barbosa, J.M.; Sarmiento, E.M.; Magalhães, B.; Ribeiro, F. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, 507-511, 2006.

Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B. **Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte, Fundação Araucária, 2002, 253 p.

Somerville, D.C. **Nutritional value of bee collected pollens**. Goulburn: Rural Industries Research and Development Corporation. 2001. 176 p.

Souza., R.C.; 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 Amazônica**, v. 34(2), 333 – 336, 2004.

Stalikas, C.D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30(18), 3268-3295, 2007.

Steinmetz, K.A.; Potter, J.D. Vegetables, fruit, and câncer prevention: A review. **Journal of the American Diet Association**, v. 96, 1027-1039, 1996.

Sun, T.; Tanumihardjo, S.A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of Food Science**, v. 72:9, R159-R165, 2007.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO). Versão II, Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 105 p.

Tjiburg, L.B.M.; Mattern, T.; Folts, J.D.; Weisgerber, U.M.; Katan, M.B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37(8), 771-785, 1997.

Tomas-Lorente, F.; Garcia-Grau, M.M.; Nieto, J.L.; Tomas-Barberan, F.A. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. **Phytochemistry**, v. 31(6), 2027-2029, 1992.

Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30(5), 1323-1338, 2007.

Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, 4113-4117, 1998.

Vogt, T.; Taylor, L.P. Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. **Plant Physiology**, v. 108, 903-911, 1995.

Wagner. H.; Bladt, S. **Plant Drug Analysis**. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd Ed. Springer Verlag. 1996.

Wildman, R.E.C. **Nutraceuticals and Functional Foods**. Washington, D.C: CRC Press, 2001. 542 p

Yamaguchi, M.; Isoflavone and bone metabolism: Its cellular mechanism and preventive role in bone loss. **Journal of Health Science**, v.48 (3), 209-222, 2002.

Yamaguchi, M.; Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. **Yakugaku Zasshi**, v.126 (11), 1117-1137, 2006a.

Yamaguchi, M.; Hamamoto, R.; Uchiyama, S.; Ishiyama, K.; Hashimoto, K. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral-diaphyseal and -metaphyseal tissues of rats *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Health Science**, v. 52 (1), 43-49, 2006b.

Yamaguchi, M.; Uchiyama, S.; Nakagawa, T.; Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract in osteoblastic MC3T3-E1 cells *in vitro*. **Journal of Health Science**, v. 53 (5), 625-629, 2007a.

Yamaguchi, M.; Hamamoto, R.; Uchiyama, S.; Ishiyama, K.; Hashimoto, K.; Preventive effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone loss in streptozotocin-diabetic rats *in vivo*. **Journal of Health Science**, v.53, 190-195, 2007b.

Yamaguchi, Uchiyama, S.; Nakagawa, T.; Preventive effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone loss in ovariectomized rats *in vivo*. **Journal of Health Science**, v. 53, 571-575, 2007c.

**ANEXO A.** Contraste de significação  $t$  para a comparação das médias dos parâmetros físico-químicos e da atividade antioxidante de duas amostras de pólen de *Melípona seminigra* (Mchuva e Mseca) coletadas no meliponario do Laboratório de Pesquisa em abelhas do INPA na cidade de Manaus.

Para decidir se a diferença entre duas médias  $x_1$  e  $x_2$  é significativa, isto é, para contrastar a hipótese nula  $H_0: x_1 = x_2$ , pode ser aplicado o Contraste de significação  $t$  (Miller, J.N e Miller, J.C, 2002). No presente trabalho as médias  $x_1$  se correspondem com as médias obtidas para a amostra de pólen de *Melípona seminigra* coletada durante o período de chuva (Mchuva) e  $x_2$  com a amostra coletada durante o período de seca (Mseca).

O estatístico  $t$  calculou-se a partir da Equação 17:

$$t = (x_1 - x_2) / s * \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)} \quad (\text{Eq 17})$$

Onde (s) estimou-se a partir de:

$$s^2 = [(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2) \quad (\text{Eq 18})$$

Se o valor de  $t$  experimental (sem ter em conta o significado) é maior que certo valor crítico então a  $H_0$  é rejeitada. Os valores de  $t$  para um determinado nível de significação encontram-se em tabelas estatísticas. Quanto menor é o nível de significação menor é a probabilidade de rejeitar a hipótese nula ( $H_0$ ) quando esta é verdadeira. O método de Contraste de significação  $t$  (Miller, J.N e Miller, J.C, 2002) supõe que as amostras extraem-se de populações com desvios padrão iguais.

Para provar se a diferença entre as variâncias das duas amostras foi significativa, isto é, para provar  $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ , calculou-se o estatístico F:

$$F: s_1^2/s_2^2 \text{ (Eq 19)}$$

Onde 1 e 2 dispõem-se na equação de modo que F seja sempre  $\geq 1$ .

O contraste de significação F foi aplicado aos parâmetros físico-químicos (composição centesimal) para provar a existência de diferenças entre as variâncias de cada parâmetro para as amostras Mchuva e Mseca (Tabela 20).

**Tabela 20. Cálculo do estatístico F para as amostras Mchuva e Mseca.**

Parâmetro	MS1	MS2	F = $s_1^2/s_2^2$	F <sub>2,1 (0,05)</sub>
	(amostra chuva)	(amostra seca)		
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>		
Umidade	0,55	0,59	1,19	799,5
Proteína	0,28	0,01	767,0	799,5
Lipídios	0,12	0,14	1,25	799,5
Cinzas	0,01	0,02	4,10	799,5

s<sub>1</sub>: Desvio padrão do parâmetro físico-químico da amostra Mchuva

s<sub>2</sub>: Desvio padrão do parâmetro físico-químico da amostra Mseca

F: Estatístico F

F<sub>(0,05)</sub>: Estatístico F para um nível de significação do 0,05.

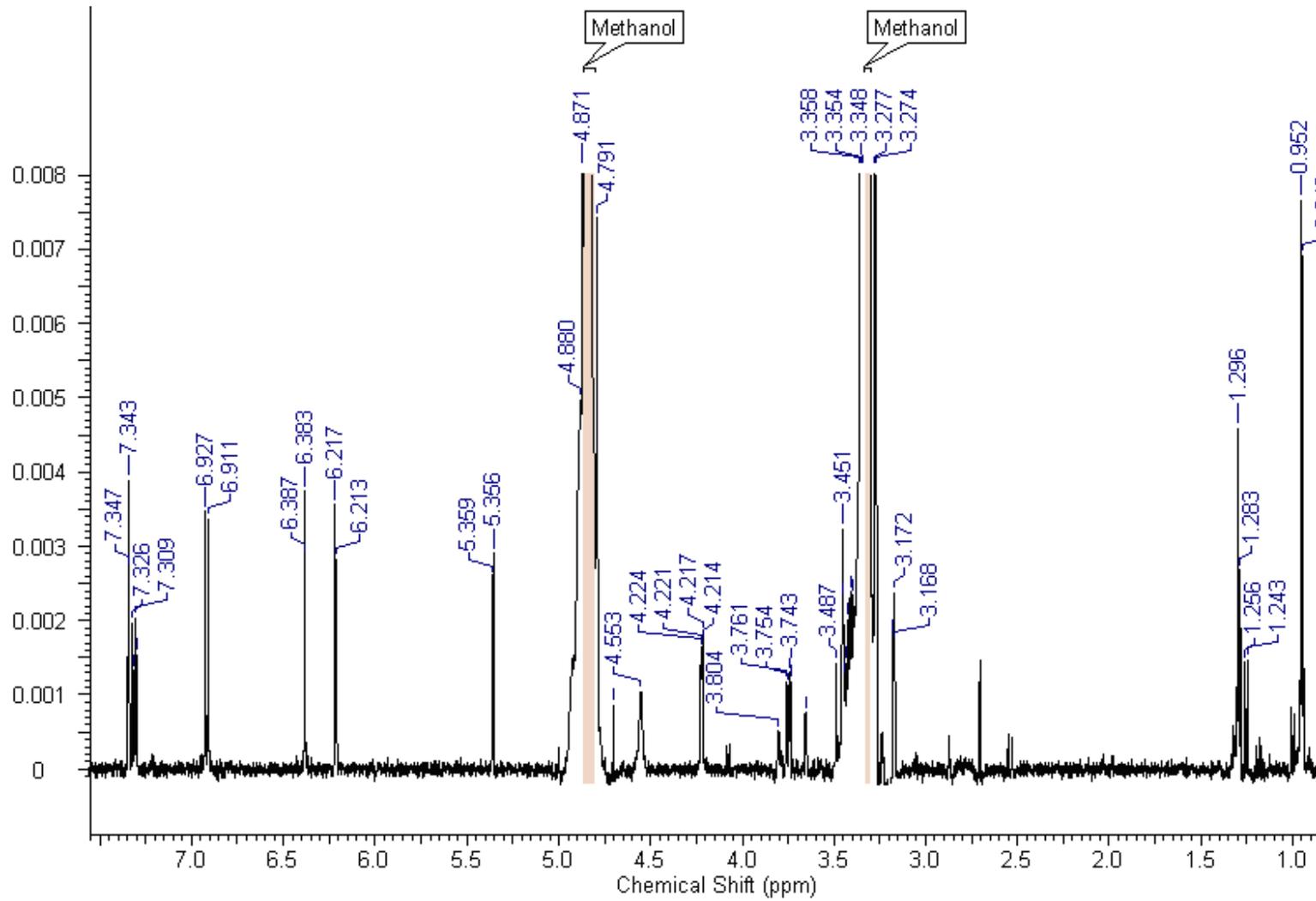
Como em cada caso o valor de F calculado foi menor que o valor de F<sub>2,1 (0,05)</sub> não existe uma diferença significativa entre os desvios padrão de cada parâmetro em um nível do 5 %.

A Tabela 21 apresenta os resultados do contraste de significação  $t$  para determinar se as médias de Mchuva e Mseca para cada parâmetro são significativamente diferentes.

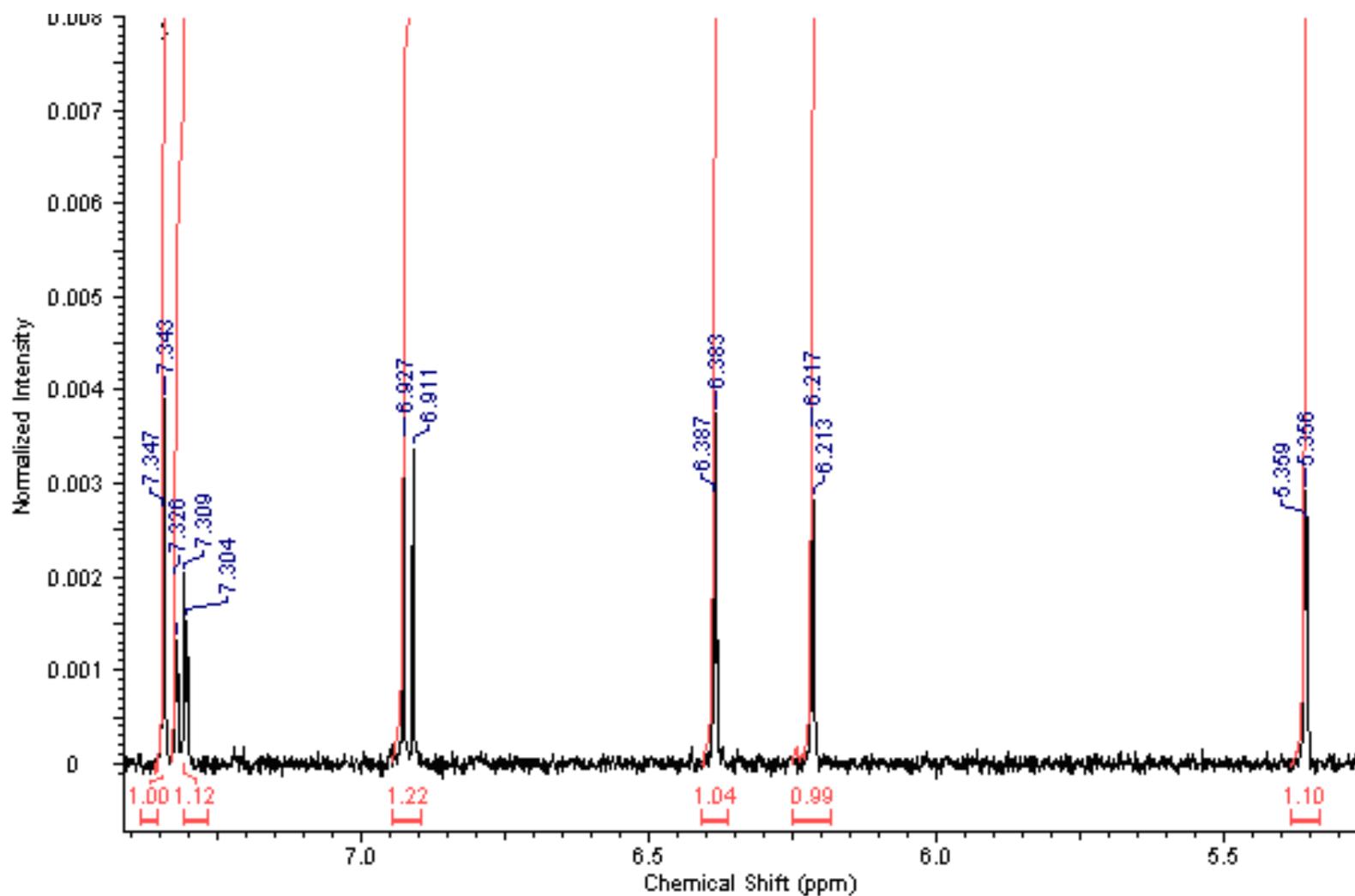
**Tabela 21. Contraste de significação  $t$  entre os parâmetros físico-químicos das amostras Mchuva e Mseca.**

Parâmetro	$S^2$	S	$t_{\text{calculado}}$	$ t $	$t_4 (P=0,05)$
Umidade	0,326	0,571	22,5	22,5	2,78
Proteína	0,032	0,179	-13,1	13,1	2,78
Lipídios	0,013	0,116	-6,81	6,81	2,78
Cinzas	2,7 E-04	0,016	-19,1	19,1	2,78

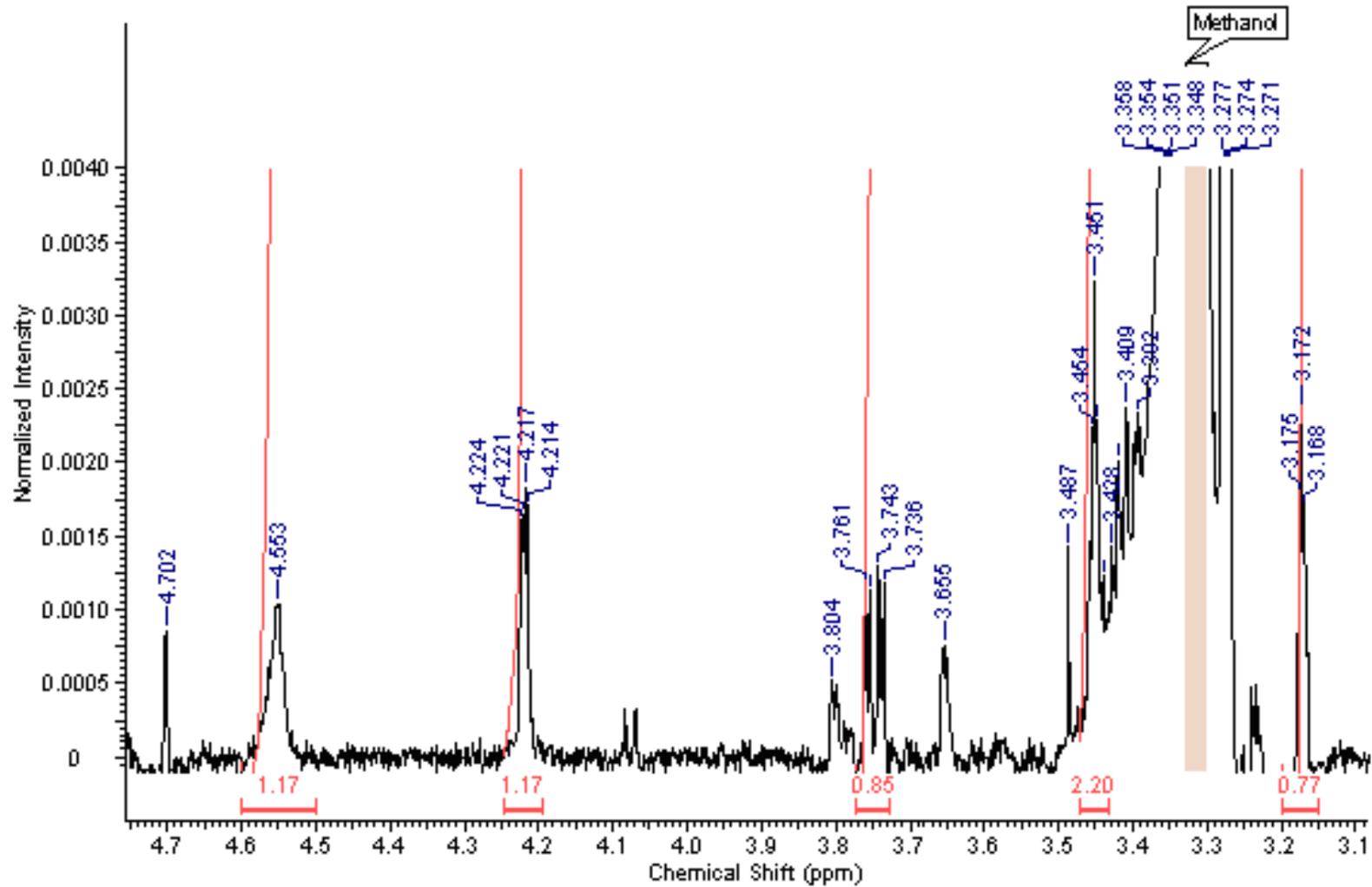
Para todos os parâmetros o valor de  $|t|$  foi maior que o valor de  $t_4 (P=0,05)$ . Nesse caso a diferença entre os dois resultados foi significativa ao nível do 5 % e a hipótese nula foi rejeitada.



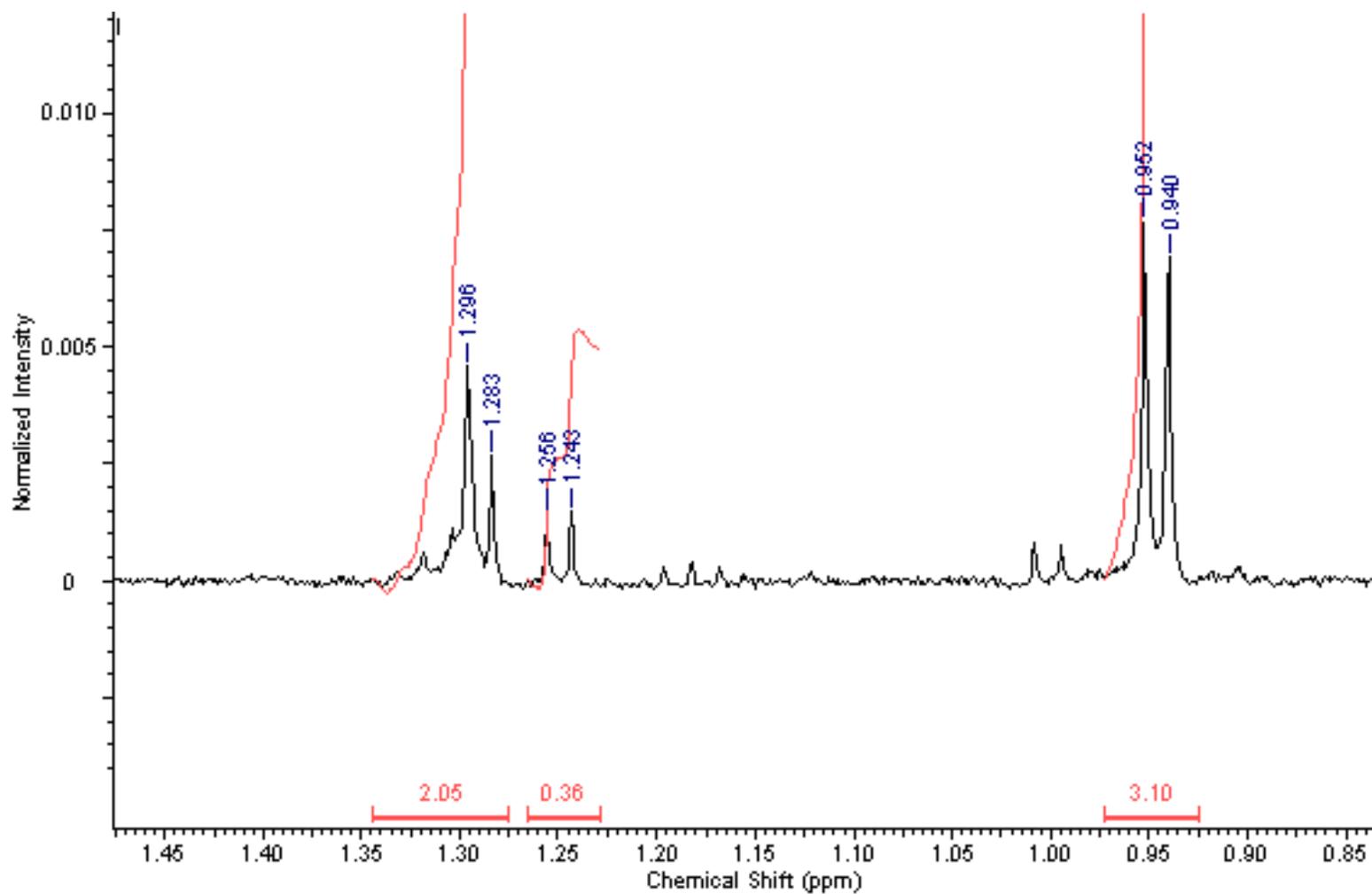
ANEXO B. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em MeOD (d-4) em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).



ANEXO C. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{MeOD} (d-4)$  em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).  $\delta$ : 5,0 a 7,0 ppm.



ANEXO D. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  em MeOD (d-4) em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).  $\delta$ : 3,0 a 5,0 ppm.



ANEXO E. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{MeOD}$  ( $d_4$ ) em 500 MHz do flavonóide quercetina-3-O-ramnosídeo (quercetrina).  
 $\delta$ : 0,0 a 1,5 ppm.