

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

PAULO GABRIEL DOS SANTOS FURTADO

**PÓLEN ACUMULADO POR *Melipona fasciculata* Smith: ESTUDO QUÍMICO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA *IN VITRO***

SÃO LUÍS

2018

PAULO GABRIEL DOS SANTOS FURTADO

MONOGRAFIA

**PÓLEN ACUMULADO POR *Melipona fasciculata* Smith: ESTUDO QUÍMICO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA *IN VITRO***

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão como requisito para elaboração de trabalho de conclusão de curso.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa Cristina Aranha Batista

SÃO LUÍS

2018

Furtado, Paulo Gabriel dos Santos.

Pólen acumulado por *Melipona fasciculata* Smith: estudo químico e avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro / Paulo Gabriel dos Santos Furtado. - 2018.

32 f.

Coorientador(a): Marisa Cristina Aranha Batista.

Orientador(a): Maria Nilce de Sousa Ribeiro.

Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Atividade anti-inflamatória. 2. Abelha sem ferrão. 3. Pólen. 4. Polifenóis totais. I. Batista, Marisa Cristina Aranha. II. Ribeiro, Maria Nilce de Sousa. III. Título.

PAULO GABRIEL DOS SANTOS FURTADO

**PÓLEN ACUMULADO POR *Melipona fasciculata* Smith: ESTUDO QUÍMICO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA *IN VITRO***

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa Cristina Aranha
Batista

Aprovado em: ____/11/2018

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Co-orientadora: Marisa Cristina Aranha Batista

Instituição: DEFAR - UFMA

Assinatura: _____

2º Avaliador:

Instituição: UFMA

Assinatura: _____

3º Avaliador:

Instituição: Pitágoras

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu forças ao longo dessa caminhada na construção da minha carreira profissional como farmacêutico, me dando forças para não desistir nos momentos difíceis e de dúvida, além de me guiar corretamente para chegar até o presente momento.

À minha mãe Rosa Furtado, que sozinha sempre me deu amor, apoio e instrução na concretização dos meus sonhos, sempre acreditando em mim.

Aos amigos conquistados durante os cinco anos de graduação, André Felipe, Denise Frazão, Juliana Mendonça e Tasso Ramom, que me acompanharam ao longo dessa jornada acadêmica e me ajudaram, como uma equipe, a enfrentar os problemas decorrentes da Universidade.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Nilce de Sousa Ribeiro, pela oportunidade concebida desde o início, confiança, companheirismo e paciência demonstrada durante toda a pesquisa, mostrando a luta diária de um professor pesquisador na Universidade para o exercício e progresso da ciência no Brasil.

Ao Laboratório de Farmacognosia I, principalmente a Ludmilla Mesquita e Will Mesquita, que me acompanharam durante minha trajetória na iniciação científica, mostrando as conquistas, desafios e persistência de um pesquisador. Aos integrantes dos Laboratórios de Farmacognosia II e Fitoterapia, em especial Antônio Leite, Tássio Rômulo, Talison Diniz, Orlene Nascimento e Jéssyca Godinho, que foram coajudantes nesse processo de inserção na pesquisa.

Aos amigos feitos no Programa Cidadão do Mundo, em especial Ellien Barbosa, Ernandes Pereira, Mariana Carreiro, Mayra Cabral, Vitória Lima e a equipe da Tandem Escuela Internacional Madrid, que me apoiaram como irmãos no processo de intercambialidade, dividindo momentos nessa ampliação de horizontes e novas descobertas. Minha gratidão ao atual governador do Maranhão e à equipe da SECTI, por terem investido e acreditado em jovens como eu nesses tempos difíceis, para o futuro da Educação, Ciência e Tecnologia.

À Turma 86, em especial, Andreza Sales, Carol Marreiros, Rafael Carvalhal, Gabriela Alves, Laís Couto, Alzirene Sales e Ivana Souza, que me acolheram, foram

pacientes comigo no fim da graduação e por se mostrarem unidos diante de todas as situações.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me apoiaram neste percurso e que não se encontram aqui mencionados, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

RESUMO

A Meliponicultura (cultivo de abelhas sem ferrão) está em desenvolvimento há bastante tempo em regiões do Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. No estado do Maranhão, destaca-se o cultivo de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba ou tiúba do Maranhão), ocupando lugar de destaque pela sua dispersão no estado. A atividade faz parte dos arranjos produtivos do estado, como forma de contribuir para o desenvolvimento sustentável do Maranhão. No entanto, há a necessidade de estudos sobre a composição química e atividade biológica dos produtos meliponícolas, o que não agrega valor aos produtos, dificultando a comercialização dos mesmos. Considerando a escassez de pesquisas realizadas sobre as atividades biológicas e identificação química do pólen de *M. fasciculata*, este trabalho objetivou obter um perfil químico e investigar a atividade antiinflamatória *in vitro* do extrato hidroetanólico de pólen de *M. fasciculata* Smith. O pólen foi coletado no município de Viana-MA e submetido à maceração com etanol a 70% (v/v), com hidromódulo 1:5 (m/v) por 72 horas, filtrado e concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato hidroetanólico de pólen (EHP). Do EHP, realizou-se o doseamento de polifenóis totais, utilizando o Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20%, e o doseamento de flavonoides com cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5%, ambos medidos por espectrofotômetro UV-Vis. A atividade antiinflamatória *in vitro* foi avaliada utilizando o Ensaio colorimétrico *in vitro* de inibição da enzima cicloxigenase (COX), com o percentual de inibição da enzima ($\text{CI}_{50\%}$) calculado através dos valores de absorvância em relação ao grupo controle. O perfil químico do EHP foi realizado através de análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrometria na região do ultravioleta e visível (UV-VIS). O EHP apresentou rendimento extrativo de 60,65%, teor de 9,17% de polifenóis totais, 0,14% de flavonoides totais e presença de rutina na sua composição por cromatografia em camada delgada em comparação do R_f com padrões, além de inibir *in vitro* ambas as isoformas da cicloxigenase (COX), a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos contribuem para a obtenção de parâmetros químicos e biológicos, no estabelecimento do perfil de qualidade, bem como para validação deste produto bioativo para uso nutracêutico e/ou farmacêutico, além de agregar valor para a Meliponicultura, um dos arranjos produtivos do estado do Maranhão.

Palavras-chave: Pólen; abelha sem ferrão; polifenóis totais; atividade antiinflamatória.

ABSTRACT

Meliponicultura (stingless bees cultivation) has been in development for a long time in regions of Brazil, mainly in the North and Northeast. In the state of Maranhão, we highlight the cultivation of *Melipona fasciculata* Smith (tiúba or tiúba do Maranhão), occupying a prominent place by its dispersion in the state. The activity is part of the productive arrangements of the state, as a way to contribute to the sustainable development of Maranhão. However, there are few studies on the chemical composition and biological activity of meliponic products, among them pollen. Considering the scarcity of researches on biological activities and chemical identification of *M. fasciculata* pollen, this study aimed to obtain a chemical profile and to investigate the in vitro anti-inflammatory activity of the hydroethanolic extract of *M. fasciculata* Smith pollen. The pollen was collected in the city of Viana-MA and submitted to maceration with 70% (v/v) ethanol, with a 1:5 (m/v) hydromodule for 72 hours, filtered and concentrated in a rotary evaporator, obtaining hydroethanolic extract of pollen (HEP). From the HEP, total polyphenols were assayed using Folin-Ciocalteu and sodium carbonate (Na_2CO_3) at 20%, and the dosage of flavonoids with aluminum chloride (AlCl_3) at 5%, both measured by UV-Vis. *In vitro* anti-inflammatory activity was evaluated using the in vitro colorimetric inhibition of cyclooxygenase (COX) enzyme assay, with the percentage of inhibition of the enzyme calculated by absorbance values in relation to the control group. The chemical profile of the HEP was performed through thin layer chromatography (TLC) and ultraviolet and visible (UV-VIS) spectrometry. The HEP presented extractive yield of 60.65%, 9.17% of total polyphenols, 0.14% of total flavonoids and presence of rutin in its composition, besides inhibiting in vitro both cyclooxygenase (COX) isoforms, from the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The data obtained contribute to the achievement of chemical and biological parameters, in the establishment of the quality profile, as well as to validate this bioactive product for nutraceutical and / or pharmaceutical use, in addition to adding value to Meliponicultura, one of the productive arrangements of the state of Maranhão.

Key words: Pollen; stingless bee; total polyphenols; anti-inflammatory activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral.....	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1. Coleta e secagem da amostra.....	17
4.2. Obtenção do extrato hidroetanólico de pólen	17
4.3. Determinação do teor de polifenóis totais.....	18
4.4. Determinação do teor de flavonoides totais.....	18
4.5. Perfil químico do extrato hidroetanólico de pólen bioativo de <i>M. fasciculata</i>	18
4.5.1. Análise em cromatografia em camada delgada (CCD).....	18
4.5.2. Análise por espectrofotometria na região ultravioleta e visível (UV-Vis)...	19
4.6. Atividade <i>in vitro</i> sobre a enzima ciclo-oxigenase (COX)	19
4.7. Análise estatística	20
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse da sociedade a respeito de produtos naturais se intensificou, em consequência da divulgação dos seus efeitos e sua influência na qualidade de vida. Pesquisas com ingredientes bioativos para consumo humano aumentaram recentemente devido à conscientização do consumidor e dos benefícios associados à manutenção da saúde e bem estar (PAZ et al, 2015).

Evidências científicas sugerem que os benefícios para a saúde de produtos naturais de origem vegetal, como frutas e legumes, são atribuídos às interações aditivas e sinérgicas de compostos fitoquímicos presentes em alimentos integrais, obtendo-os a partir de uma ampla variedade de consumo desses alimentos (LIU, 2013).

Na busca por uma alimentação saudável, verifica-se a tendência na pesquisa de alimentos funcionais, definidos como “o alimento ou ingrediente que possui propriedades funcionais ou de saúde, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999).

Através dessa procura por alimentos funcionais, os produtos naturais de origem animal se mostram requisitados pelos seus efeitos fisiologicamente ativos. Os produtos derivados de abelhas, tais como mel, própolis, geoprópolis, cera, geleia real e pólen são usados desde a antiguidade por suas ações terapêuticas como antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral e imunomodulatória (LIBERIO et al, 2011; DUTRA et al., 2014; ARAÚJO et al, 2015; BANKOVA et al, 2016; BARTOLOMEU et al, 2016; BATISTA et al., 2016; OLIVEIRA et al, 2016; RAO et al., 2016) e além de seu potencial nutracêutico (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015; BANKOVA et al, 2016; DENISOW & DENISOW-PIETRZYK, 2016; RAO et al., 2016).

O pólen acumulado pelas abelhas vem se destacando em suplementação alimentar nos últimos anos, devido ao seu alto teor glicídico, lipídico, proteico e de compostos fenólicos em sua constituição (YANG et al., 2013; SILVA et al, 2014; VIT et al, 2016; ARAÚJO et al, 2017).

As abelhas são espécies animais classificadas sistematicamente na ordem dos Himenópteros e pertencentes à família *Apidae* Latreille, 1802, sendo subdivididas nas subfamílias *Andreninae* Latreille, 1802, *Apinae* Latreille, 1802, *Colletinae* Lepeletier, 1841, *Halictinae* Thomson, 1869 e *Megachilinae* Latreille, 1802 (MELO et al, 2013). A subfamília *Apinae* apresenta 20 tribos, dentre as quais a tribo *Apini* é representada pelo gênero *Apis*, onde a espécie mais comum é *Apis mellifera* (MOURE, 2012), e a tribo *Meliponini*, constituída por abelhas que possuem ferrão atrofiado ou abelhas sem ferrão (CAMARGO; PEDRO, 2013).

As abelhas sem ferrão (meliponíneos) são insetos altamente eusociais, sendo encontradas na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, como Austrália, África, Sudeste Asiático, Mesoamérica e América do Sul (CHUTTONG et al, 2016), sendo identificadas no Brasil cerca de 244 espécies, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, correspondendo a cerca de 20% de todas as espécies neotropicais de abelhas sem ferrão (PEDRO, 2014).

Dentre as espécies de meliponíneos com ocorrência no estado do Maranhão, encontram-se *Melipona fasciculata* Smith, *Melipona flavolineata*, *Melipona rufiventris*, *Melipona seminigra pernigra* e *Melipona subnitida* Ducke, com ampla criação na região da Baixada Maranhense, apresentando sistema produtivo consagrado e grande potencial na produção de mel e uso na polinização (VENTURIERI et al, 2012).

A Meliponicultura (cultivo de abelhas sem ferrão) está em desenvolvimento há bastante tempo em regiões do Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. No estado do Maranhão, destaca-se o cultivo de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba ou “tiúba do Maranhão”), ocupando lugar de destaque pela sua dispersão no estado.

No Maranhão, a Meliponicultura reúne algumas características favoráveis que, por ser uma região de transição, possui um grande número de ecossistemas, desde ambientes salinos com presença de manguezais, passando por campos inundáveis, cerrados e babaçuais, até vegetação florestal de grande porte de natureza amazônica, que fornece a matéria prima de suporte para o trabalho das abelhas, e origina-se na abundante biodiversidade regional (ALBUQUERQUE et al., 2013).

A atividade faz parte dos arranjos produtivos do estado, como forma de contribuir para o desenvolvimento sustentável do Maranhão. No entanto, escassos são os estudos sobre a composição química e atividade biológica do pólen de *M. fasciculata*, sendo necessárias mais descobertas sobre tal produto animal.

Considerando a escassez de pesquisas realizadas sobre as atividades biológicas e estudos químicos do pólen de *M. fasciculata*, torna-se de fundamental importância a investigação dessas características, na busca de demonstrar o potencial como medicamento e/ou alimento funcional e agregar valor a esse produto.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O pólen é o conjunto de grãos de estruturas microscópicas encontradas nos estames das anteras das flores nas angiospermas e constituem as células reprodutoras masculinas das plantas com finalidade de transmitir seus gametas para o órgão sexual feminino da flor para fecundar os óvulos, para transformar em frutos (ARRUDA et al., 2013). As abelhas coletam o pólen de uma planta (monofloral) ou diversas plantas (heterofloral) e o misturam com secreção de glândulas salivares ou néctar, onde são transportadas para as colmeias, umedecidas com saliva e armazenadas em células de favo de mel e utilizados pelas abelhas como fonte nutricional (CARPES et al, 2013; KOMOSINSKA-VASSEV et al, 2015).

As abelhas são espécies animais classificadas sistematicamente na ordem dos Himenópteros e pertencentes à família *Apidae* Latreille, 1802, sendo subdivididas em diversas subfamílias (MELO et al, 2013). A subfamília *Apinae* apresenta 20 tribos, dentre as quais a tribo *Apini* é representada pelo gênero *Apis*, onde a espécie mais comum é *Apis mellifera* (MOURE, 2012), e a tribo *Meliponini*, constituída por abelhas que possuem ferrão atrofiado ou abelhas sem ferrão (CAMARGO; PEDRO, 2013).

O pólen de *Apis mellifera* (Apini, Apidae, Hymenoptera) ou pólen apícola se destaca como suplemento nutricional, sendo uma fonte rica conhecida de carboidratos, além de aminoácidos, proteínas, lipídeos, vitaminas, minerais, oligoelementos, substâncias polifenólicas, carotenoides, esteroides e terpenos (CARPES et al, 2013; FUENMAYOR et al, 2014; NEGRÃO et al, 2014; DENISOW & DENISOW-PIETRZYK, 2016).

Dentre as ações biológicas do pólen apícola, foram demonstradas: antioxidante (REBIAI; LANEZ, 2012; CARPES et al, 2013; PASCOAL et al, 2014), anti-inflamatória (PASCOAL et al, 2014; KOMOSINSKA-VASSEV et al, 2015), antimicrobiana (KHIDER et al, 2013; PASCOAL et al, 2014), antimutagênica (TOHAMY et al, 2013; PASCOAL et al, 2014) e anti-hemolítica (ARAÚJO et al, 2017).

Assim como as abelhas com ferrão, as abelhas sem ferrão (meliponíneos) também acumulam pólen, porém apresentam poucos estudos sobre as composições químicas e atividades biológicas desses produtos, predominando estudos

provenientes de abelhas com ferrão, além de possuir dispositivos legais que definam os parâmetros de qualidade e identidade do pólen apícola, viabilizando sua comercialização do Brasil (BRASIL, 2001).

No Brasil, foram identificadas 244 espécies de abelhas sem ferrão, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, correspondendo a cerca de 20% de todas as espécies neotropicais de abelhas sem ferrão (PEDRO, 2014). Dentre as principais espécies de abelhas sem ferrão encontradas no Brasil, destacam-se as espécies do gênero *Melipona*, sendo que as espécies encontradas no estado do Maranhão são *M. puncticollis* Friese, *M. fasciculata* Smith, *M. subnitida* Ducke, *M. flavolineata* Friese, *M. melanoventer* Schwarz e *M. seminigra* Friese (PEDRO, 2014).

O pólen de *M. subnitida* (jandaíra) é constituído por D-manitol (208-310 mg/g de pólen), aminoácidos, como prolina (9,54-11,79 mg/g de pólen) e serina (3,72-4,27 mg/g de pólen), e minerais (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} como majoritários) (SILVA et al, 2014), além de flavonoides (narigenina, tricetina, isohraminetina e 8-metoxiherbacetina) e do esteroide β -sitosterol (FERREIRA-CALIMAN et al., 2012). A análise das características físico-químicas do pólen coletado por *M. seminigra* e *M. interrupta* revelam, respectivamente, umidade: 53,39 e 37,12%; proteínas: 37,63 e 24,00%; lipídeos: 10,81 e 6,47%; cinzas: 4,03 e 2,74%; fibra bruta: 9,30 e 13,65%; carboidratos: 25,66 e 44,27% (REBELO et al, 2016).

A caracterização química e bioativa do pólen produzido por abelhas sem ferrão dos gêneros *Melipona* e *Scaptotrigona* mostrou carboidratos, lipídeos e proteínas, além de flavonoides (1100,7-1644,9 mg de quercetina/100 g de pólen), polifenóis (1576,9-3905,6 mg de ácido gálico/100 g de pólen) e apresentou atividade antioxidante (VIT et al, 2016).

Pólens de *M. fasciculata* vem sendo estudados quanto sua composição química e atividade biológica, revelando ácidos graxos, ácidos fenólicos, aminoácidos, açúcares, compostos polifenólicos (4,98 – 14,66%), flavonoides totais (0,59 – 1,10%), atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica (ABREU, 2016). Entretanto, são poucas as pesquisas com o pólen dessa espécie de abelhas de ferrão, visto que o trabalho realizado por Abreu (2016) é o primeiro sobre pólen de *M. fasciculata* no Maranhão.

A ação antiinflamatória, atividade biológica objeto de estudo deste trabalho, ocorre através da inibição das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase,

impedindo a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (GOODMAN & GILMAN, 2010; KATZUNG, 2014).

O processo inflamatório é uma resposta a estímulo lesivo, sendo evocado por ampla variedade de agentes nocivos, como infecções, anticorpos ou lesões físicas (GOODMAN & GILMAN, 2010). A lesão celular associada à inflamação atua sobre as membranas celulares, provocando a liberação de enzimas lisossômicas dos leucócitos, seguida da liberação de ácido araquidônico e é sintetizado em vários eicosanoides, como prostaglandinas, através das enzimas cicloxigenase COX-1 e COX-2 (KATZUNG, 2014).

Considerando a escassez de pesquisas realizadas sobre as atividades biológicas e perfil químico do pólen de *M. fasciculata*, objetiva-se avaliar a ação antiinflamatória do pólen acumulado por *Melipona fasciculata* Smith, contribuindo para o conhecimento da bioatividade deste produto natural e colaborar no desenvolvimento da Meliponicultura, base para o desenvolvimento sustentável do Maranhão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Obter o perfil químico e avaliar a atividade antiinflamatória *in vitro* do pólen de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) no município de Viana - MA.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar os teores de polifenóis e flavonoides totais no extrativo de pólen de *M. fasciculata*;
- Identificar a composição química do extrato de pólen de *M. fasciculata*;
- Obter um perfil químico do extrato hidroetanólico de pólen;
- Investigar a atividade antiinflamatória *in vitro* do extrato do pólen de *M. fasciculata*.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e secagem da amostra

A amostra de pólen de *Melipona fasciculata* foi coletada em meliponário no município de Viana (Figura 1), localizada na microrregião da Baixada Maranhense e mesorregião Norte do estado do Maranhão, em julho de 2018.

A coleta da amostra foi realizada com o auxílio de uma espátula esterilizada diretamente dos potes de armazenagem de pólen. O material coletado foi acondicionado em sacos coletores estéreis e mantido em recipiente com isolamento térmico a frio durante o transporte até o Laboratório de Farmacognosia I da Universidade Federal do Maranhão, em São Luís-MA, onde foi conservada sob refrigeração e, posteriormente, submetida a secagem em estufa com circulação de ar à temperatura de 37 °C.



Figura 1. Mapa do estado do Maranhão, destacando o município de Viana, onde foi coletada a amostra de pólen. **Fonte:** Google imagens, 2018.

4.2. Obtenção do extrato hidroetanólico de pólen

A amostra de pólen seca e triturada foi submetida ao método extrativo de maceração, utilizando como solvente etanol a 70% (v/v), com hidromódulo 1:5 (p/v) por 72 horas, sendo trocado o solvente a cada 24 horas. Em seguida, foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, obtendo o extrato hidroetanólico de pólen, codificado como EHP (ABREU, 2016).

4.3. Determinação do teor de polifenóis totais

O doseamento dos polifenólicos totais do extrato EHP foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20%. A mistura foi mantida no escuro durante 2 horas à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, PerkinElmer). O teor foi calculado a partir da curva de calibração construída com solução padrão de ácido gálico (Merck) (1-30,0 $\mu\text{g/mL}$) e expressa como equivalentes de ácido gálico (%). As análises foram realizadas em triplicata (DUTRA et al, 2014).

4.4. Determinação do teor de flavonoides totais

O doseamento dos flavonoides totais do EHP foi determinado utilizando método fotocolorimétrico com solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5%. A mistura foi mantida no escuro durante 30 min à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 425 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, PerkinElmer). O teor foi calculado a partir da curva de calibração construída com solução padrão de quercetina (Merck) (1-30,0 $\mu\text{g/mL}$). As análises foram realizadas em triplicata (DUTRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

4.5. Perfil químico do extrato hidroetanólico de pólen bioativo de *M. fasciculata*

4.5.1. Análise em cromatografia em camada delgada (CCD)

O EHP e padrões foram submetidos à cromatografia em camada delgada (sílica gel 60 F254, Merck) utilizando como fase móvel butanol:solução aquosa de ácido fórmico a 1% (5:2,5), com revelação da cromatoplaça em luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm). Foram analisados os valores dos R_f (fator de retenção), comparando com os padrões (rutina, epicatequina, ácido gálico e quercetina).

4.5.2. Análise por espectrofotometria na região ultravioleta e visível (UV-Vis)

O EHP foi dissolvido em metanol P.A. (concentração 10 µg/mL), com varredura de 200 a 400 nm em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer, Corporation, Massachusetts, USA).

4.6. Atividade *in vitro* sobre a enzima ciclo-oxigenase (COX)

O ensaio de inibição da COX para avaliação da atividade antiinflamatória *in vitro* do EHP foi realizado de acordo com protocolo do kit, ensaio de rastreamento colorimétrico para inibição da enzima ciclooxigenase COX (Colorimetric COX Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical®, número do catálogo 7010500).

A reação *in vitro* foi realizada em placa com 96 poços, em triplicata onde nos três primeiros poços foi realizado o controle negativo com 160 µL de solução tampão e 10 µL de solução Heme e 10 µL de metanol. Como controle positivo (enzima-substrato) com inibição máxima da enzima com 100% da atividade foram colocados nos poços seguintes, sempre em triplicata 150 µL de solução tampão, 10 µL da solução heme, 10 µL de metanol, 10 µL de solução enzimática com as isoformas COX-1 ou COX-2. Enquanto isso, nos poços para avaliação da inibição do extrato, foram colocados 150 µL de solução tampão, 10 µL da solução heme, 10 µL de solução enzimática com as isoformas COX-1 ou COX-2, 10 µL da solução do extrato EHP nas concentrações de 2 µg/mL, 10 µg/mL e 50 µg/mL. A placa foi cuidadosamente agitada durante 5 minutos e foram incubadas durante mais 5 minutos a 25°C. Após os 5 minutos de incubação, foram adicionados em todos os poços 20 µL da solução de substrato colorimétrico N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilenediamina (TMPD), seguidos da adição de 20 µL de ácido araquidônico em todos os poços. A placa foi agitada suavemente durante alguns segundos e novamente incubadas durante 5 minutos a 25 °C. Após esse período a absorbância de todos os poços foi lida a 590 nm no leitor de ELISA com monocromador Epoch.

A porcentagem da atividade antiinflamatória foi relacionada com a concentração da amostra para a obtenção da concentração inibitória (CI₅₀), definida como a concentração da amostra necessária para causar uma inibição de 50% da enzima ciclooxigenase (COX-1 ou COX-2). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A porcentagem da atividade antiinflamatória *in vitro* (% AI) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AI} = \{[(A_{cp} - A_{cn}) - A_a] \div A_{cp}\} \times 100,$$

Onde A_{cn} é a absorbância do controle negativo, A_{cp} é a absorbância do controle positivo e A_a é a absorbância obtida após aplicação da amostra e leitura no espectrofotômetro.

4.7. Análise estatística

Os dados obtidos do teor de polifenólicos totais e flavonoides foram expressos como média e desvio padrão. Os resultados da atividade antiinflamatória foram expressos em gráfico, considerando as concentrações, a CI_{50} e a porcentagem de inibição das COX.

5. RESULTADOS

O rendimento extrativo do pólen coletado no município de Viana-MA e obtido pelo método extrativo de maceração com etanol a 70% está apresentado na Tabela 1, revelando o resultado de 60,65%. O teor de polifenóis totais apresentou média de 9,17% e o teor médio de flavonoides totais foi de 0,14% (Tabela 2).

Tabela 1: Rendimento (%) e teor de polifenóis e flavonoides totais do extrato hidroetanólico do pólen de *Melipona fasciculata* Smith

Extrato	Rendimento	Polifenóis Totais (%)	Flavonoides Totais (%)
EHP	60,65%	9,17 ± 0,73	0,14 ± 0,03

EHP – Extrato hidroetanólico de pólen de *Melipona fasciculata* coletado no município de Viana-MA

O espectro de UV-Vis do EHP exibiu absorções máximas de comprimento de onda (λ_{\max}) nos intervalos de 200 a 225nm e de >250 a 300nm, conforme visualizado na Figura 2.

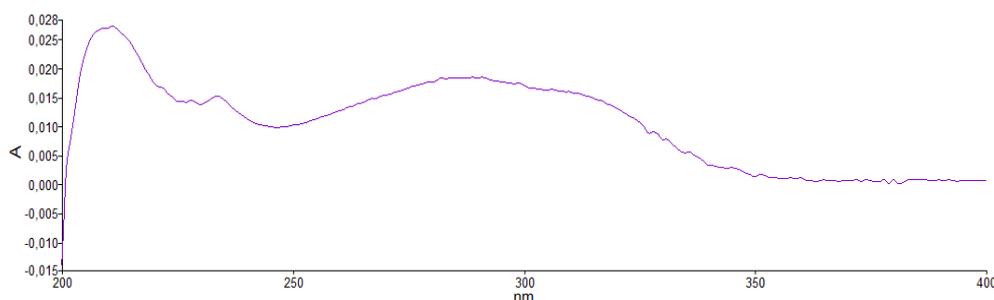


Figura 2: Espectro na região do ultra violeta (UV) de EHP

Quanto às análises por cromatografia em camada delgada (CCD), primeiramente foram utilizadas para a análise do extrato em diversos eluentes, verificando-se que o eluente que apresentou melhor separação do extrato foi butanol:solução aquosa de ácido fórmico a 1% (5:2,5).

A análise da cromatoplaça do EHP mostrou a presença de duas bandas de $R_f = 0,62$ e $R_f = 0,96$, respectivamente, após revelação em câmara de luz UV em 254

nm. Os dados obtidos com análise por CCD são compatíveis com os dados do espectro de UV. A análise do extrato EHP com os padrões sugere a presença de rutina no referido extrato. As bandas de Rf = 0,96 não foram discutidas, visto que estão próximas ao fim da corrida, indicando que deve ser adotada outra fase móvel.

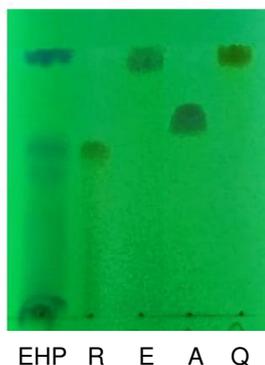


Figura 3: Cromatoplate do EHP e padrões (R – rutina; E – epicatequina; A – ácido gálico; Q – quercetina)

A avaliação antiinflamatória *in vitro* do EHP está descrita na Figura 4. Análises dos dados demonstraram CI_{50} em todas as concentrações testadas para a COX-2, enquanto que na COX-1, além de demonstrar inibição (CI_{50}) *in vitro* de ambas as isoformas da cicloxigenase (COX-1 e COX-2), a partir da concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

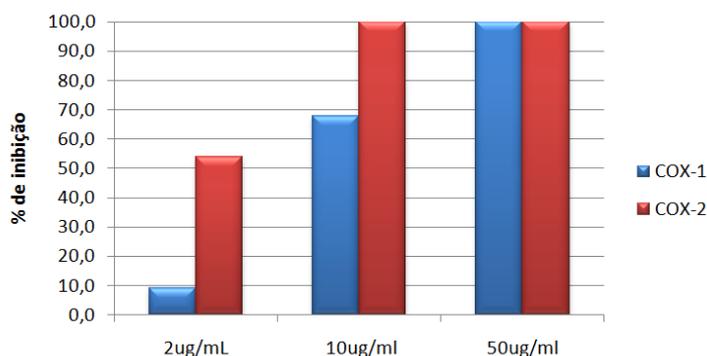


Figura 4: Avaliação antiinflamatória *in vitro* do extrato EHP.

6. DISCUSSÃO

A Meliponicultura é uma atividade de ampla expansão na região da Baixada Maranhense, dentre eles o município de Viana, local onde a amostra de pólen foi coletada, apresentando grande potencial na produção de produtos derivados de abelhas (VENTURIERI et al, 2012).

Abreu (2016) estudou pólen de *M. fasciculata* coletados nos estados do Maranhão e Pará, obtendo extratos hidroetanólicos, com rendimentos extrativos variando de 20,78% a 60,70%. O resultado obtido nesta pesquisa mostrou rendimento extrativo de 60,65%, sendo considerado um produto rentável, visto que extraiu mais de 50% dos constituintes do pólen.

Os teores médios de polifenóis e flavonoides totais foram de 9,17 e 0,14%, respectivamente. O regulamento técnico vigente sobre identidade e qualidade para o pólen apícola não descreve como requisitos físico-químicos o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, apenas de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, açúcares totais, fibra bruta e acidez livre como padrões de identidade e qualidade do pólen apícola. (BRASIL, 2001).

Abreu (2016) investigou teor de polifenóis e flavonoides totais em extratos de pólen acumulados por *M. fasciculata*, obtendo concentrações entre 4,98 e 14,66% e de 0,59 e 1,10%, respectivamente. Outro estudo com pólen de abelhas do gênero *Melipona* aponta teor de polifenóis de 3,9% (3905,6 mg/100 g) e flavonoides de 1,57% (1576,9 mg/100 g) (VIT et al, 2016). Os dados obtidos em tal pesquisa corroboram os obtidos por Abreu (2016), mas estão acima dos encontrados por Komosinska-Vassev e colaboradores (2015), os quais indicam que extratos etanólicos de pólen apícola, em média, contêm 1,6% de compostos polifenólicos totais e 1,4% de flavonoides totais.

Os compostos fenólicos são aqueles que possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais, como ésteres, éteres e glicosídeos (ZUANAZZI et al, 2017). Dentre as propriedades biológicas, estão a atividade antioxidante, antimicrobiana e antiinflamatória (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; ARAUJO et al, 2017)

O EHP apresentou espectro de absorção de UV-Vis picos máximos de absorção nos intervalos de 200 a 225nm e de >250 a 300nm, compatíveis com a

presença de compostos fenólicos simples e complexos, do tipo fenólicos e flavonoides. Dutra e colaboradores (2014) identificaram compostos fenólicos de amostra de produto natural proveniente de *M. fasciculata*, cuja absorção de comprimento de onda foi entre 254 a 277 nm. Tal dado corrobora com os resultados de 9,17 % de polifenólicos totais encontrados no referido extrato e a absorção máxima de comprimento de onda mostrado na Figura 2. O pólen coletado por abelhas é geralmente composto de pólen de flores de várias plantas e os teores de polifenólicos totais variam de cada espécie, dependendo da sua origem botânica (CARPES et al, 2013).

Maruyama e colaboradores (2010), em estudos sobre efeito anti-inflamatório *in vitro* do extrato etanólico de pólen de *Cistus* sp., revelaram CI_{50} para COX-1 >150 $\mu\text{g/mL}$ e COX-2 de 10,3 $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos de atividade anti-inflamatória *in vitro* com EHP apresentaram resultado superior ao que foi descrito por Maruyama e colaboradores (2010).

Pólen de origem vegetal e o acumulado por abelhas melíferas, especialmente *Apis mellifera*, apresentam atividade anti-inflamatória comparada com a magnitude das drogas anti-inflamatórias não esteroidais como naproxeno, analgina e fenilbutazona (PASCOAL et al, 2014). A avaliação da atividade anti-inflamatória de EHP demonstrou o potencial anti-inflamatório pólen acumulado por tal espécie de abelha, na qual a constituição química é constituída de polifenólicos, os quais podem estar relacionados com a atividade biológica.

O mecanismo do efeito anti-inflamatório consiste em inibir a atividade da ciclooxigenase e lipoxigenase, enzimas responsáveis por transformar o ácido araquidônico em compostos como prostaglandina e leucotrienos, que induzem condições inflamatórias agudas e crônicas em tecidos. Compostos naturais como flavonoides e ácidos fenólicos, bem como ácidos graxos e fitoesteróis podem ser elementos responsáveis por tal atividade (CHOI, 2007; MARUYAMA et al, 2010; PASCOAL et al, 2014).

O pólen acumulado de abelhas é recomendado em inflamações agudas e crônicas condições degenerativas iniciais e colestática, doenças do fígado, bem como em danos tóxicos e pós-traumáticos deste órgão (CHOI, 2007; PASCOAL et al, 2014).

Considera-se que EHP possui teores de polifenóis e flavonoides em sua constituição química, além do flavonoide rutina, como demonstrado no perfil cromatográfico, o qual é tido como substância antioxidante e antiinflamatória. Rutina ou 3',4',5,7-tetrahidroxi-flavonol-3-rutinosídeo é um flavonoide da classificação flavonol glicosilado (ZUANAZZI et al, 2017) que apresenta diversas propriedades farmacológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e antiinflamatória, sendo esta última relacionada com a inibição de algumas enzimas chave envolvidas no processo inflamatório, como a COX-2 (GULLÓN et al, 2017).

Estes efeitos terapêuticos e protetores têm sido relacionados ao conteúdo de polifenóis (PASCOAL et al, 2014; KOMOSINSKA-VASSEV et al, 2015; DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; ARAUJO et al, 2017), o que sugere também que o EHP como alimento funcional em função de sua composição química e ação antiinflamatória.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o extrato hidroetanólico de pólen de *Melipona fasciculata* Smith proveniente do município de Viana-MA apresentou bom rendimento, sendo considerado um produto rentável para futuros estudos com finalidade farmacêutica.

O extrato do pólen de *M. fasciculata* possui alto teor de polifenóis totais e sugere-se conter em sua constituição química o flavonoide rutina.

O ensaio da inibição das enzimas COX-1 e COX-2 mostrou atividade antiinflamatória *in vitro* do extrato hidroetanólico de pólen e o constituinte rutina pode estar relacionada à ação antiinflamatória.

Ressalta-se a falta de parâmetros de identidade e qualidade para produção e comercialização do pólen de *M. fasciculata*, dificultando a geração de renda pelos meliponicultores. Portanto, os dados obtidos contribuem para a obtenção de parâmetros químicos e biológicos, no estabelecimento do perfil de qualidade, bem como para validação deste produto bioativo para uso nutracêutico e/ou farmacêutico, além de agregar valor para a Meliponicultura, um dos arranjos produtivos do estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

ABREU, B. V. B. **Bioprospecção de pólen de *Melipona fasciculata* Smith**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Rede – Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

ALBUQUERQUE, P. M. C.; GOSTINKSI, L. F.; RÊGO, M. M. C.; CARREIRA, L. M. M. **Flores e abelhas: a interação da tíuba (*Melipona fasciculata*, *Meliponi*) com suas fontes florais na Baixada Maranhense**, 1. ed. São Luís: Edufma, v. 1, p. 164, 2013.

ARAÚJO, J. S.; CHAMBÓ, E. D.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. M. P. C.; CARVALHO, C. A. L.; ESTEVINHO, L. M. Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1-15, 2017.

ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; CONTI, B. J.; FERNANDES JUNIOR, A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, p. 12-20, 2015.

ARRUDA, V. A. S.; PEREIRA, A. A. S.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, 29, p. 100-105, 2013.

BANKOVA, V.; BERTELLI, D.; BORBA, R.; CONTI, B. J.; CUNHA, I. B. S.; DANERT, C.; EBERLIN, M. N.; FALCÃO, S. I.; ISLA, M. I.; MORENO, M. I. N.; PAPOTTI, G.; POPOVA, M.; SANTIAGO, K. B.; SALAS, A.; SAWAYA, A. C. H. F.; SCHWAB, N. V.; SFORCIN, J. M.; SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M.; TRUSHEVA, B.; VILASBOAS, M.; WILSON, M.; ZAMPINI, C. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. In: DIETEMANN, V.; ELLIS, J. D.; NEUMANN, P. (Eds). The COLOSS BEEBOOK, Volume III: standard methods for *Apis mellifera* hive products research. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, p. 1-44, 2016.

BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; SILVA, L. M.; ROMAGNOLI, G. G.; OLIVEIRA, D. E.; SFORCIN, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48-55, 2016.

BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; CUNHA, M. S.; AMARAL, F. M. M.; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in areas of flooded fields and cerrado in Maranhao State, northeast Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, p. 315-322, 2016.

BRASIL. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 jan. 2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=12479&word>>. Acesso em: 20 agosto 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999**. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 1999.

CAMARGO, J. M. F. (*in memoriam*) & PEDRO, S. R. M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S., URBAN, D. & MELO, G. A. R. (Orgs.), **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**, versão online. Disponível em: <<http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34135&printmode=1>>. Acesso em: 01 set 2018.

CARPES, S. T.; ALENCAR, S. M.; CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; MOURÃO, G. B.; HAMINIUK, C. W. I.; LUZ, C. F. P.; MASSON, M. L. Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. **CyTA – Journal of Food**, v. 11, n. 2, p. 150-161, 2013.

CAYMAN CHEMICAL COMPANION. **Cox Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit**. Estados Unidos: Item nº 701050, 2018. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/701050.pdf>>. Acesso em: 20 agosto 2018.

CHOI, E. M. Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 471–475, 2007.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016.

DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 4303–4309, 2016.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; CUNHA, M. S.; BATISTA, M. C. A.; TORRES, L. M. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2549-2557, 2014.

FERREIRA-CALIMAN, M. J.; SILVA, C. I.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; NASCIMENTO, F. S. Neutral sterols of cephalic glands of stingless bees and their correlation with sterols from pollen. **Psyche**, v. 7, 2012.

FUENMAYOR, C.; ZULUAGA, C.; DÍAZ, C.; QUICAZÁN, M.; COSIO, M.; MANNINO, S. Evaluation of physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. **Revista MVZ Córdoba**, v. 19, n.1, p. 4003-4014, 2014.

GOODMAN & GILMAN. **Manual de Farmacologia e Terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010.

GULLÓN, B.; LÚ-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M.; EIBES, G. Rutin: A review of extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 220-235, 2017.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. Porto Alegre: AMGH, 12^a ed., 2014.

KHIDER, M.; ELBANNA, K.; MAHMOUD, A.; OWAYSS, A. A. Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 1461-1469, 2013.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAZMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A., DUTRA, R. P.; REIS, A. S.; ARAÚJO, M. J. A. M.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-10, 2011.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**, v. 78, p. 18-25, 2013.

MARUYAMA, H.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; HARA, H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, 10, p. 1-10, 2010.

MELO, G. A. R.; MOURE, J. S.; URBAN, D. **Catálogo de abelhas Moure**. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2013. Disponível em: <<http://moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 01 set 2018.

MOURE, J. S., 2012. Apini Latreille, 1802. In: MOURE, J. S., URBAN, D. & MELO, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**, versão online. Disponível em: <<http://moure.cria.org.br/catalogue?id=28985>>. Acesso em: 01 set 2018.

OLIVEIRA, L. P. G.; CONTE, F. L.; CARDOSO, E. O.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; GOLIM, M. A.; CRUZ, M. T.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory/inflammatory

effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1551-1558, 2016.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. G.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, n. 172, p. 462-468, 2015.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FEAS, X.; ESTEVINHO, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 233-239, 2014.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, p. 348-354, 2014.

RAO, P. V.; KRISHNAN, K. T.; SALLEH, N.; GAN, S. H. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 657-664, 2016.

REBELO, K. S.; FERREIRA, A. G.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 927-932, 2016.

REBIAI, A.; LANEZ, T. Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from Norwest Algeria. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 155-163, 2012.

SILVA, G. R.; NATIVIDADE, T. B.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SANTOS, F.; A. R.; SILVA, T. M. S. Identification of sugar, amino acids and minerals from the Pollen of jandaíra stingless bees (*Melipona subnitida*). **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1015-1021, 2014.

TOHAMY, A. A.; ABDELLA, E. M.; AHMED, R. R.; AHMED, Y. K. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. **Cytotechnology**, v. 66, p. 283–297, 2013.

VENTURIERI, G. C.; ALVES, D. A.; VILLAS-BÔAS, J. K.; CARVALHO, C. A. L.; MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F. A. L.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Meliponicultura no Brasil: Situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Edusp, p. 213-236, 2012.

VIT, P.; SANTIAGO, B.; PEDRO, S. R. M.; JAVIER, R.; FAVIAN, M.; PEÑA-VERA, M.; PÉREZ-PÉREZ, E. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 78-84, 2016.

YANG, K.; WU, D.; YE, X.; LIU, D.; CHEN, J.; SUN, P. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 708-718, 2013.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, p. 209-233, 2017.