UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus*
sp. in vitro e sua influência sobre parâmetros de estresse oxidativo
e de inflamação *in vivo*

JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO SATTLER

Tese para obtenção do título de
Doutor

Orientadora: Profa. Assoc. Ligia Bicudo de Almeida Muradian
Coorientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus*
sp. in vitro e sua influência sobre parâmetros de estresse oxidativo
e de inflamação *in vivo*

JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO SATTLER

Versão Corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do título de DOUTOR
Orientadora: Profa. Assoc. Ligia Bicudo de Almeida Muradian
Coorientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S 253c Sattler, José Augusto Gasparotto
Caracterização do potencial bioativo do pólen apícola de Eucalyptus sp. in vitro e sua influência sobre parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação in vivo / José Augusto Gasparotto Sattler. - São Paulo, 2018.
143 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Almeida Muradian, Lígia Bicudo de
Coorientador: Mancini Filho, Jorge

1. Pólen apícola de Eucalyptus sp. 2. Compostos fenólicos. 3. Componentes bioativos. 4. Estresse oxidativo. 5. Inflamação. I. T. II. Almeida Muradian, Lígia Bicudo de, orientador. III. Mancini Filho, Jorge, coorientador.

JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO SATTLER

Caracterização do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus sp. in vitro*
e sua influência sobre parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação *in vivo*

Comissão Julgadora
da
Tese para a obtenção do título de DOUTOR

Profa. Assoc. Ligia Bicudo de Almeida Muradian
Presidente/Orientadora

1 °. examinador

2 °. examinador

3 °. examinador

4 °. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2018.

Dedico este trabalho à minha família:

Aroni Sattler

Ivete Maria Sattler

Júlio César Gasparotto Sattler

Pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Assoc. Ligia Bicudo de Almeida Muradian pela confiança a mim depositada, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas durante estes anos de orientação.

Ao Prof. Tit. Jorge Mancini Filho pela coorientação, e por todo apoio e ensinamentos vitais para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo por possibilitar um espaço de muito aprendizado e vivências compartilhadas.

Ao Prof. Aroni Sattler e ao Técnico José Adair de Souza da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por todo o planejamento, suporte e produção das amostras no apiário experimental da UFRGS.

À Profa. Dra. Ortrud Monika Barth Schatzmayr e Alex da Silva de Freitas pela constante parceria na realização das análises polínicas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de doutorado disponibilizada.

Aos professores membros da comissão julgadora pela disponibilidade e considerações a respeito deste estudo.

Aos professores que contribuíram como membros da banca de qualificação: Prof. Severino Matias de Alencar, Profa. Helena Teixeira Godoy e Prof. Alexandre Bera.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Análise de Alimentos, Adriane, Bianca, Simone, Amanda, Márcio, Carlos, Renata, Tatiane.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Lípidos, Ana Mara, Fernanda, Lucília, Eliane e Marina, por todos os bons momentos compartilhados.

A aluna de iniciação científica Giovanna Corsi, pela sua significativa contribuição no desenvolvimento do trabalho, muito obrigado!

Aos técnicos Elias Silva Araújo, Luciene Fagundes Lauer Macedo e Rosângela Pavan que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Ernesto, Amanda, Grazi, Bruna, Mayara, Roberto, Eduardo, Thiago, pelos momentos de alegria compartilhados.

Às duas colegas e amigas do coração, Luciana Tedesco Yoshime e Illana Louise Pereira de Melo, por toda a ajuda, suporte e momentos inesquecíveis que passamos juntos durante estes anos de mestrado e doutorado. Muito obrigado!

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Aos meus amigos de Porto Alegre, por sempre me apoiarem mesmo a distância.

À minha namorada Marina, pela compreensão e apoio no período de finalização deste trabalho.

“Se não escalar a montanha,
você nunca poderá apreciar a vista”

Pablo Neruda

RESUMO

SATTLER, J. A. G. **Caracterização do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* *in vitro* e sua influência sobre parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação *in vivo*.** Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brazil, 143p., 2018.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar os compostos bioativos e o impacto de fatores climáticos no pólen apícola (PA) de *Eucalyptus sp.*, o seu potencial antioxidante *in vitro* e a sua influência em parâmetros do estresse oxidativo e da inflamação *in vivo*. A caracterização química das amostras foi realizada pela quantificação de fenólicos e flavonoides totais e a avaliação da atividade antioxidante dos extratos por três métodos (DPPH, ORAC e FRAP). Foram realizadas análises de perfil de ácidos graxos e fitoesteróis (CG). Os resultados de fenólicos e flavonoides totais mostraram uma variação entre 17 e 44 mg de equivalentes em ácido gálico e entre 1,3 e 4,4 mg de equivalentes em catequina/g. A atividade antioxidante mostrou uma variação de 267 a 961 μmol de equivalentes de Trolox/g pelo método ORAC, de 38 a 147 μmol de equivalentes de Trolox/g para o FRAP e um EC_{50} entre 0,41 e 1,61 mg/mL de extrato por DPPH. Apesar das amostras de PA apresentarem baixa quantidade de lipídeos (3,3 %), 50 % do total destes são constituídos de ácidos graxos insaturados. Foram encontrados teores de fitoesteróis entre 1,2 a 1,8 mg/g (sitoesterol, estigmasterol e campesterol). Estes resultados confirmaram a presença de bioativos com potencial antioxidante nas amostras. A fim de confirmar seu efeito biológico, foi selecionada uma amostra para a realização do ensaio *in vivo*, na qual foram identificados por CLAE três compostos fenólicos majoritários (rutina, 3n-tris-*p*-feruloil-espermidina e miricetina). O ensaio foi realizado por 10 semanas com 70 camundongos machos (C57BL/6), distribuídos em sete grupos de 10 animais cada: controle normolipídico (NL); controle hiperlipídico (HL); dieta NL com 5 % de PA; dieta HL com 2,5 % de PA; dieta HL com 5 % de PA; dieta HL com extrato de PA (EPA) a 2,5 %; e dieta HL com EPA a 5 %. Foi possível identificar que os grupos HL tiveram maior ganho de peso quando comparados aos grupos NL ($p < 0,05$), porém os grupos com incorporação de PA não apresentaram diferenças em relação ao controle HL. Foram avaliados ainda parâmetros bioquímicos séricos, de estresse oxidativo (ORAC, TBARS, GSH e enzimas antioxidantes) e parâmetros inflamatórios (IL1- β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α) no tecido hepático. Os resultados de parâmetros de estresse oxidativo não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Quanto aos parâmetros inflamatórios os grupos HL+PA2,5 e HL+PA5 reduziram os níveis das citocinas IL1- β , IL-6 e MCP-1 ($p < 0,05$) e TNF- α apenas o grupo HL+PA5 % apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$). Os resultados de citocinas inflamatórias mostraram um efeito positivo na administração de PA, visto que ocorreu uma diminuição nos níveis do tecido hepático dos animais. Estes resultados mostraram que o PA promoveu uma melhora do quadro inflamatório ocasionado com uma dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: Pólen apícola de *Eucalyptus sp.* Componentes bioativos. Compostos fenólicos. Estresse oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

SATTLER, J.A.G. **Characterization of bioactive potential of bee pollen from *Eucalyptus* sp. *in vitro* and its influence on parameters of oxidative stress and inflammation *in vivo***. Thesis (Doctoral degree in Science) – Scholl of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil, 143p., 2018.

The present work aimed to characterize bioactive compounds and the impact of climatic factors on the bee pollen (BP) from *Eucalyptus* sp., its antioxidant potential *in vitro* and its influence on parameters of oxidative stress and inflammation *in vivo*. The chemical characterization of the samples was performed by the quantification of phenolics and flavonoids, and evaluation of the antioxidant activity of the extracts by three methodologies (DPPH, ORAC and FRAP). Profile of fatty acids and phytosterols were performed by gas chromatography (GC). The results of phenolics and flavonoids varied between 17 and 44 mg of gallic acid equivalents and between 1.3 and 4.4 mg of catechin equivalents/g. The antioxidant activity varied from 267 to 961 μ mol of Trolox equivalents/g by the ORAC method, from 38 to 147 μ mol of Trolox equivalents/g for FRAP and an EC₅₀ between 0.41 and 1.61 mL of extract/mg by DPPH. Despite the low lipid content of PA samples (3.3%), around 50% of the total is composed of unsaturated fatty acids. Phytosterols levels were found between 1.2 and 1.8 mg/g (sitosterol, stigmasterol and campesterol). This result confirms the presence of bioactive compounds with antioxidant potential in the samples. In order to evaluate its biological effect, a sample was included in the *in vivo* assays, in which three phenolic compounds (rutin, 3n-tri-p-feruloyl-spermidine and myricetin) were identified. The assay was performed for 10 weeks with 70 male mice (C57BL/6), distributed in seven groups of 10 animals each: normolipid control (NL); hyperlipidemic control (HL); diet NL with 5% of BP; HL diet with 2.5% BP; HL diet with 5% BP; HL diet with 2.5% BP extract (BPE); and HL diet with 5% BPE. The HL groups gained more weight compared with the NL groups ($p < 0.05$), but the groups supplemented with BP did not show lower weight compared to the HL groups. Serum biochemical parameters of oxidative stress in hepatic tissue (ORAC, TBARS, GSH and antioxidant enzymes) and inflammation (IL- β , IL-6, IL-6, IL-10, MCP-1 and TNF- α) were evaluated. The levels of oxidative stress did not show differences between the groups. HL + PA2.5 and HL + PA5 reduced the cytokines IL1- β , IL-6 and MCP-1 ($p < 0.05$) and TNF- α only the HL + PA5 group showed a significant reduction ($p < 0.05$). The cytokine results showed a positive reduction with BP administration, with a decreasing rate in the hepatic animal tissues. This results showed that BP promotes an improvement in the inflammatory status, occurred by a hyperlipidic diet.

Keywords: Bee Pollen of *Eucalyptus* sp. Bioactive components. Phenolic compounds. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

Figura 1	(A) Abelha com carga de pólen na corbícula (B) Colmeia com coletor de pólen.....	17
Figura 2	Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.....	26
Figura 3	Estrutura básica e os principais tipos de flavonoides.....	27
Figura 4	Resumo das transduções de sinalização molecular reguladas pela ROS.....	29
Figura 5	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólicos secundários em plantas.....	34

CAPÍTULO II

Figura 1	Estação Experimental Agronômica (EEA-UFRGS) com as marcações da localização geográfica (<i>Global Position Satelity</i> - GPS) dos apiários participantes da pesquisa.....	52
Figura 2	Fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de PA de <i>Eucalyptus sp.</i> agrupadas por dia de coleta.....	64

CAPÍTULO III

Figura 1	Perfil de ácidos graxos presentes nas amostras de pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> agrupadas por dia de coleta. (A) C16:0 (palmitico); (B) C18:0 (esteárico); (C) C18:1c n9 (oleico); (D) C18:2t n6 (<i>trans</i> -linoleico); (E) C18:2c n6 (<i>cis</i> -linoleico); (F) C18:3c n3 (α -linolênico); (G) C20:0 (eicosanoico); (H) C22:0 (docosanoico); (I) C20:4 n6 (araquidônico); (J) C24:0 (tetracosanoico); (L) Lipídios totais; (M) Saturados; (N) Insaturados; (O) Poli-insaturados; (P) Monoinsaturados.....	79
Figura 2	Cromatogramas correspondentes à análise de fitoesteróis de três amostras de pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> em cinco diferentes condições de extração (Cs), e das soluções padrões (Mix de padrões – (A) ; β -sitosterol – (B) ; 5 α -colestano – (C)).....	80
Figura 3	Percentual (%) de campesterol nas amostras por semana de coleta (a) e percentual de estigmasterol (b) ; percentual de sitoesterol (c) ; miligramas de outros fitoesteróis por grama de amostra (d) ; miligramas de fitoesteróis totais por	84

	grama de amostra de pólen apícola agrupadas por data de coleta.....	
Figura 4	Scatter plot, baseado na análise de componentes principais, das amostras de pólen apícola coletadas em diferentes apiários (A) e os factor loadings (B).....	89

CAPÍTULO IV

Figura 1	Desenho experimental do ensaio biológico.....	101
Figura 2	Cromatogramas (CLAE-UV e CLAE-EM) e espectros de massas dos compostos fenólicos majoritários presentes na amostra de pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> (PA-EU).....	109
Figura 3	Imagens mostrando as diferenças clínicas e teciduais dos camundongos (C57BL/6) pertencentes aos grupos normo- e hiperlipídico, e de seus tecidos.....	112
Figura 4	Teste oral de tolerância a glicose (TOTG), realizado uma semana antes da eutanásia, e glicemia de jejum após a eutanásia, dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.....	114
Figura 5	Lipidograma sérico dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.....	115
Figura 6	Enzimas indicadoras da função hepática (ALT, AST e FAL) e proteínas totais séricas dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.....	116
Figura 7	Capacidade de absorção dos radicais de oxigênio (ORAC), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona (GSH) no tecido hepático dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.....	117
Figura 8	Atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR); no tecido hepático dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.....	118
Figura 9	Perfil das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, MCP-1, IL-10 e TNF- α) do homogenato do fígado dos camundongos.....	119

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1	Composição química apresentada por pesquisadores em diferentes amostras de pólen apícola desidratado brasileiro..... 21
CAPÍTULO II	
Tabela 1	Informações dos apiários, data de coleta e localização geográfica (GPS) dos apiários onde foram coletadas as amostras de PA de <i>Eucalyptus sp.</i> 53
Tabela 2	Dados climáticos (temperatura compensada média, insolação e umidade relativa) das amostras de PA de <i>Eucalyptus sp.</i> coletadas em cinco datas..... 61
Tabela 3	Dados das amostras, gênero, percentual de pólen predominante (% PP), pólen acessório (% PA) e pólen isolado (% PI)..... 61
Tabela 4	Caracterização dos fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidante (ORAC, FRAP e DPPH) das amostras de PA de <i>Eucalyptus sp.</i> , agrupados por apiários..... 62
Tabela 5	Gráficos de correlação entre os parâmetros avaliados em amostras de PA de <i>Eucalyptus sp.</i> 65
CAPÍTULO III	
Tabela 1	Perfil de ácidos graxos (%) do pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> 75
Tabela 2	Conteúdo de lipídios (%) do pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> 76
Tabela 3	Quantificação dos fitoesteróis de três amostras de pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> em cinco diferentes condições de extração (Cs)..... 81
Tabela 4	Composição de fitoesteróis (mg/g) do pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> 82
Tabela 5	Valores de correlação entre os parâmetros químicos e fatores climáticos..... 86

CAPÍTULO IV

Tabela 1	Laudo das rações produzidas pela empresa Prag Soluções.....	100
Tabela 2	Capacidade antioxidante e compostos fenólicos da amostra de pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> (PA-EU) e das rações as quais ela foi incorporada.....	107
Tabela 3	Perfil de ácidos graxos da amostra de pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i> (PA-EU) e das rações as quais ela foi incorporada.....	110
Tabela 4	Peso corpóreo e consumo alimentar dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.....	111
Tabela 5	Peso dos tecidos dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU...	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAH – Amina de ácido-hidroxicinâmico
AAPH – Radical 2,2' – azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto
AGI – Ácido graxo insaturado
AGMI – Ácidos graxo monoinsaturado
AGPI – Ácidos graxo poli-insaturado
AG – Ácido graxo
AGS – Ácido graxo saturado
AlCl₃ – Cloreto de alumínio
ALT – Alanina amino transferase
ANOVA – Análise unidirecional de variâncias
ARE – Elemento responsivo a antioxidante
AST – Aspartato amino transferase
AUC – Área sob a curva
BF₃ – Trifluoreto de boro
BHT – Butilhidroxitolueno
CAT – Catalase
CCl₄ – Tetracloreto de carbono
CG – Cromatógrafo gasoso
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa
COX-1 – Ciclooxigenase 1
COX-2 – Ciclooxigenase 2
CT – Colesterol total
DCNTs – Doenças crônicas não transmissíveis
DTNB – 5,5'ditiobis-2,2 ácido nitrobenzóico
EAG – Equivalentes de ácido gálico
EC – Equivalentes de catequina
EC₅₀ – Dose correspondente a 50 % do efeito esperado
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Imunoensaio enzimático
EPO – Peroxidase eosinofílica

ER – Equivalentes de rutina
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ET – Equivalentes de Trolox
FAL – Fosfatase alcalina
FDA – Food and Drug Administration
FRAP – Ensaio de poder redutor do íon férrico
g – Força g
GPS – *Global Position Satelity*
GPx – Glutathiona peroxidase
GR – Glutathiona redutase
GSH – Glutathiona reduzida
GSH-Px – Glutathiona-peroxidase
GSSG – Redução da glutathiona oxidada
Ha – Hectare
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HDLc – *High Density Lipoprotein*
LDLc – *Low Density Lipoprotein*
HO-1 – Heme oxigenasse 1
ICAM-1 – Molécula 1 de adesão intercelular
IgE – Imunoglobulina E
IgG1 – Imunoglobulina humana tipo 1
IHC – *International Honey Commission*
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL1- β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
iNOS – Óxido nítrico sintetase
KCl – Cloreto de potássio
KOH – Hidróxido de potássio
LDL – Lipoproteína de baixa intensidade
LOX-5 – Lipo-oxigenase 5
LTB4 – Leucotrieno B4

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAPK – Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócito 1

MDA – Malondialdeído

mL – Mililitro

N₂ – Nitrogênio

n-3 – Ácido graxo linolênico

n-6 – Ácido graxo linoleico

Na₂SO₄ – Sulfato de sódio anidro

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaNO₂ – Nitrito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NFκB – fator de transcrição nuclear kappa B

Nm – Nanômetro

NO – Óxido nítrico

Nrf2 – Fator nuclear (eritróide-2)

O³ – Ozônio ambiental

ORAC – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

PA – Pólen acessório

PA – Pólen apícola

PCA – Análise de componentes principais

PGE2 – Prostaglandina E2

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Pólen isolado importante

PP – Pólen predominante

PT – Proteínas totais

RIPA – *Radio-immunoprecipitation assay* (Tampão RIPA)

SOD – Superóxido-desmutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEP – 1,1',3,3'-Tetraetoxipropano

TG – Triglicerídeos

TNF-α – Fator α de necrose tumoral

TOTG – Teste oral de tolerância à glicose

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazine

TPTZ – Tripiridiltriazina

Trolox – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico

VCAM-1 – Molécula de adesão vascular 1

μM – Micromolar

SUMÁRIO

	Página
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	13
<hr/>	
CAPÍTULO I	
Pólen apícola: considerações gerais.....	14
Resumo.....	14
1 Introdução.....	15
1.1 Pólen apícola.....	16
1.2 Tipos polínicos específicos.....	18
1.3 Composição química.....	20
1.3.1 Composição centesimal.....	20
1.3.2 Vitaminas.....	21
1.3.3 Fitoesteróis.....	23
1.3.4 Ácidos graxos.....	24
1.3.5 Compostos fenólicos.....	25
1.4 Influência de fatores climáticos na composição de compostos bioativos.....	33
1.5 Ensaios <i>in vivo</i> e pólen apícola.....	35
2 Considerações finais.....	37
3 Referências.....	38
<hr/>	
CAPÍTULO II	
Avaliação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de pólen apícola de <i>Eucalyptus sp.</i>.....	48
Resumo.....	48
1 Introdução.....	49
2 Objetivos.....	51
3 Material e métodos.....	51
3.1 Amostragem.....	51
3.2 Dados climáticos.....	53
3.2 Processamento.....	54
2.3 Análise polínica.....	54
3.5 Preparação dos extratos.....	55
3.6 Quantificação de compostos fenólicos totais.....	55
3.7 Quantificação dos flavonoides totais.....	56
3.8 Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	58

3.9 Atividade antioxidante pelo método ORAC.....	59
3.10 Atividade antioxidante pelo método FRAP.....	59
3.11 Análise estatística.....	60
4 Resultados e discussão.....	60
5 Conclusões.....	66
6 Referências.....	66

CAPÍTULO III

Caracterização do perfil de ácidos graxos e fitoesteróis em pólen apícola de *Eucalyptus*

<i>sp.</i>	69
Resumo.....	69
1 Introdução.....	70
2 Objetivos.....	71
3 Material e métodos.....	71
3.1 Extração da gordura total e perfil de ácidos graxos.....	71
3.2 Análise dos fitoesteróis.....	73
3.3 Análise estatística.....	73
4 Resultados e discussão.....	74
4.1 Caracterização de ácidos graxos.....	74
4.2 Avaliação de métodos de extração para identificação de fitoesteróis.....	80
4.3 Caracterização de fitoesteróis.....	82
4.4 Estudo de correlação entre os parâmetros avaliados.....	85
4.5 Análise de componentes principais (PCA).....	88
5 Conclusões.....	90
6 Referências.....	91

CAPÍTULO IV

Avaliação do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* sobre parâmetros bioquímicos e inflamatórios em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.....

Resumo.....	94
1 Introdução.....	96
2 Objetivos.....	98
3 Material e métodos.....	98

3.1 Obtenção e caracterização química da amostra de PA e das dietas.....	98
3.2 Ensaio biológico.....	100
3.2.1 Parâmetros bioquímicos no soro.....	102
3.2.2 Marcadores de função hepática.....	102
3.2.3 Quantificação de citocinas inflamatórias no tecido hepático.....	104
3.3 Análise estatística.....	105
4 Resultados.....	105
4.1 Caracterização química da amostra de PA-EU e das rações.....	105
4.2 Ensaio biológico.....	111
4.2.1 Parâmetros bioquímicos do soro.....	113
4.2.2 Marcadores de estresse oxidativo no tecido hepático.....	116
4.2.3 Marcadores de inflamação no fígado.....	119
5 Conclusões.....	121
6 Referências.....	122
 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	 128
ANEXO 1 – Certificado CEUA/FCF.....	130
ANEXO 2 – Ficha do aluno.....	131
ANEXO 3 – Informações para os membros de bancas.....	133
ANEXO 4 – Currículo Lattes.....	134

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este trabalho foi organizado em capítulos para melhor compreensão e avaliação dos resultados obtidos, bem como, facilitar a futura publicação de artigos científicos, que serão enviados para revistas indexadas da área. Os capítulos foram organizados da seguinte maneira:

Capítulo 1: Pólen apícola: considerações gerais (revisão bibliográfica).

Capítulo 2: Avaliação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de pólen apícola de *Eucalyptus sp.*

Capítulo 3: Caracterização de ácidos graxos e fitoesteróis em pólen apícola de *Eucalyptus sp.*

Capítulo 4: Avaliação do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* sobre parâmetros bioquímicos e inflamatórios em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.

Os resultados do presente trabalho foram divididos em três etapas. Inicialmente o objetivo foi avaliar o potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* produzido em uma microrregião do estado do Rio Grande do Sul. Foram avaliados os teores de fenólicos e flavonoides totais e a atividade antioxidante por três métodos. Além disso, foram coletadas informações climáticas em cinco datas de coletas das amostras. Os resultados foram agrupados por localização geográfica, data de coleta e influência de fatores climáticos.

A segunda etapa envolveu a identificação e quantificação de ácidos graxos e fitoesteróis nas mesmas amostras da etapa anterior. Os resultados foram avaliados por meio de análise exploratória multivariada com objetivo de identificar associações entre a composição química e localização geográfica, data de coleta e fatores climáticos. Por fim, na terceira etapa, realizou-se um ensaio *in vivo* com camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, utilizando uma amostra de pólen apícola de *Eucalyptus sp.*, com o intuito de verificar o potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório.

CAPÍTULO I

Pólen apícola: considerações gerais

Resumo

Estudos demonstram que o pólen apícola (PA) possui em sua composição química diferentes compostos bioativos. Dentre os bioativos presentes no pólen apícola estão os fenólicos e flavonoides, vitaminas, fitoesteróis, ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides. Estes compostos bioativos são formados pelo metabolismo secundário das plantas e podem sofrer influência de diversos fatores (interferentes edafoclimáticos), porém, não há estudos avaliando a relação entre composição química e fatores edafoclimáticos. A identificação de bioativos de pólen apícola se torna relevante na medida em que, estes podem trazer benefícios à saúde devido as propriedades associadas ao seu consumo. Dentre as propriedades benéficas dos bioativos presentes no PA estão, a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antineoplásica, antimutagênica e imunomodulatória, evidenciado especialmente por estudos *in vitro* (células). Apesar do elevado número de estudos que avaliaram o PA *in vitro*, pouco se sabe sobre as propriedades deste em ensaios *in vivo*. Portanto, o objetivo deste capítulo foi identificar estudos na literatura que avaliaram a composição química, e a investigação *in vitro* e *in vivo* de pólen apícola.

1 Introdução

O pólen apícola (PA) é um dos produtos da colmeia (assim como o mel, geleia real e própolis) e que pelas suas características físico-químicas, vêm ganhando importância devido a propriedades benéficas à saúde associadas ao seu consumo (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; PASCOAL; RODRIGUES; TEIXEIRA; FEÁS; ESTEVINHO, 2014). Este produto tem origem nas anteras das flores masculinas (gameta masculino) onde as abelhas o recolhem e aglutinam com néctar e substâncias salivares para então levarem até a colmeia. As abelhas coletam o pólen, a fim de utilizá-lo como alimento para todos os estágios de desenvolvimento da colmeia (BASIM; BASIM; ÖZCAN, 2006).

O apicultor, com a ajuda de um coletor de pólen instalado na entrada da colmeia, recolhe o pólen diariamente e em seguida processa-o para fins comerciais (ARRUDA et al., 2013a).

A composição química do PA é diretamente influenciada pela sua origem botânica, clima e solo, além da genética da planta de origem, que configura boa parte das suas características nutricionais. No entanto, a qualidade do produto está relacionada ao processo de coleta, limpeza, desidratação e envase (ARRUDA et al., 2013b; CARPES et al., 2009; SZCZÊSNA, 2007).

O PA é considerado monofloral quando há uma única origem botânica mantendo as propriedades organolépticas e bioquímicas da planta original. Quando a oferta de plantas poliníferas na área em volta do apiário não é suficiente, as abelhas visitam outras flores ou misturam *pellets* de pólen de várias flores. Esse pólen passa a ser chamado de heterofloral ou poli floral e possui propriedades bioquímicas variadas (BARRETO et al., 2006).

Quanto a sua composição, o PA contém proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais. Além disso, diversos trabalhos mostram a presença de quantidades consideráveis de vitaminas antioxidantes (A (carotenoides pró-vitamínicos), C, E) e do complexo B (B₁, B₂, B₃, B₆), ácidos graxos poli-insaturados, fitoesteróis e compostos fenólicos, relacionados a origem botânica do PA (BASTOS et al., 2004; MELO et al., 2009; PERCIE DU SERT, 2009; ARRUDA et al., 2013a; DE-MELO, 2015; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015; SATTLER et al., 2015).

Conforme Trautwein e Demonty (2007), Campos et al. (2010), Graikou et al. (2011) e Pascoal et al. (2014), o PA, além de possuir elevado valor nutricional devido a sua composição de macronutrientes, pode trazer benefícios para a saúde humana pela sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antineoplásica, antimutagênica e imunomodulatória, evidenciado por estudos com células, animais e seres humanos. De acordo com estes autores, os principais compostos biologicamente ativos do PA são os fenólicos, flavonoides e os fitoesteróis. A presença de fenólicos e flavonoides no PA foi confirmada pelos estudos de Carpes et al. (2009), Leblanc et al. (2009), Morais et al. (2011), Negri et al. (2011), Freire et al. (2012) e Cheng et al. (2013).

Grupos de pesquisa internacionais buscam a padronização de métodos analíticos e de parâmetros de qualidade para os produtos da colmeia, dentre eles, a “International Honey Commission” (IHC) que possui um grupo específico de trabalho voltado para o estudo do pólen apícola, cuja orientadora deste trabalho é membro desde 2005. A partir deste grupo, diversos trabalhos foram, e estão em desenvolvimento, a fim de buscar a caracterização e identificação de novas espécies botânicas fontes de substâncias nutricionais e funcionais. Neste sentido, estudos que avaliem a utilização de pólen apícola em experimentos com humanos, assim como, em modelos com animais, são relevantes para confirmar seus potenciais efeitos benéficos à saúde.

Este trabalho visou à obtenção de informações sobre o pólen apícola, e sua composição química relacionada ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

1.1 Pólen apícola

O pólen é a célula reprodutiva masculina das flores. As abelhas, outros insetos, o vento e a água polinizam as plantas através da transferência do pólen das anteras das flores masculinas para o estigma das flores femininas da mesma planta ou de outras plantas da mesma espécie. As abelhas acumulam os grãos de pólen nas corbículas mantendo-os agregados pela adição de néctar e, em seguida, são transferidos para a colmeia (SNODGRASS, 1975). Durante a função de polinização, as abelhas coletam o pólen, a fim de usá-lo como alimento para todos os estágios de desenvolvimento da colmeia (BASIM et al., 2006).

Segundo a legislação vigente, Instrução Normativa n.º 03 de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2001), a definição do pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia.

O pólen apícola é coletado por uma grade de retenção, caindo em um recipiente coletor, conjunto este denominado de coletor de pólen. No final da coleta encontram-se reunidas as bolotas de grãos de coloração variável, indicando as diversas comunidades botânicas visitadas pelas abelhas, formando uma mistura conhecida por “mix” polínico, sendo esse material removido pelo apicultor para o beneficiamento, comercialização e consumo animal e humano (BARRETO, 2004).

Na Figura 1 é demonstrada uma abelha com carga de pólen fixada na corbícula (A) e uma colmeia com coletor de pólen apícola instalado (B).

Figura 1. Abelha com carga de pólen na corbícula (A) e colmeia com coletor de pólen (B). Fonte: Muhammad Mahdi Karim.

Devido à alta umidade encontrada na composição do pólen apícola *in natura*, o processo de desidratação é essencial, uma vez que, a umidade presente causa uma rápida fermentação e deterioração. O processo de secagem do pólen *in natura* é realizado nos apiários e/ou entrepostos para posterior embalagem e venda, o processo de desidratação é comumente realizado em estufa de circulação de ar em sistema aberto, cuja temperatura deve variar entre 40° e 42° C (BARRETO, 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com a Instrução Normativa N° 3 (BRASIL, 2001), o pólen apícola para ser comercializado, deve ser classificado de duas formas, a partir do seu teor de umidade. A primeira classificação é o pólen apícola, cujo produto

é coletado na sua forma original. A segunda é o pólen apícola desidratado o qual passa pelo processo de desidratação, seguindo os procedimentos adequados de tratamento, com temperatura inferior a 42°C, e com teor de umidade inferior a 4% (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

Embora comercializado em muitas lojas de alimentos naturais nos Estados Unidos, o pólen não é considerado um complemento alimentar pela “Food and Drug Administration” (FDA), portanto, não há uma legislação específica (KRELL, 1996; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005). Entretanto, Campos et al. (2010) define o PA como um alimento, mas como geralmente é consumido em baixas quantidades, a sua classificação mais adequada seria como suplemento alimentar ou alimento funcional. De acordo com Campos et al. (1997), assim como Bastos et al. (2004), a recomendação diária para consumo de pólen é de cinco a 25 gramas.

Além do Brasil (BRASIL, 2001), apenas alguns países como Argentina (KRELL, 1996; CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, 1990) e Suíça (BOGDANOV et al., 2004) reconhecem legalmente o PA como um complemento alimentar e apresentam recomendação e/ou padrão de identidade e qualidade, assim como, os limites de cada parâmetro a ser analisado.

O pólen apícola para ser comercializado no Brasil deve ter os seguintes requisitos físico-químicos: umidade máxima *in natura* de 30% e desidratado de 4%; cinzas máximo de 4%; lipídeos, mínimo de 1,8%; proteínas, mínimo de 8%; açúcares totais de 14,5% a 55,0%; fibra bruta, mínimo de 2% e pH de 4 a 6 (BRASIL, 2001).

1.2 Tipos polínicos específicos

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas localizadas nas anteras dos estames das angiospermas, e que consistem nas células reprodutivas masculinas das plantas, com o propósito de transmitir seus gametas ao aparelho sexual feminino das flores (KRELL, 1996).

Cada grão de pólen compreende uma única célula, que se apresenta envolvida por duas camadas protetoras, a exina e a intina, uma mais externa e a outra mais interna, respectivamente. A intina é composta basicamente por

celulose e a exina de esporolenina, cuja origem acredita-se ser pela polimerização oxidativa de carotenoides (CORNEJO, 1994).

Os grãos de pólen possuem diâmetro entre seis e 200 µm, com formas e cores diversas; normalmente são esféricos e possuem poros na superfície, conforme as espécies de plantas da qual foram originados (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005). Eles podem ser de diversas cores, variando entre o branco, amarelo, laranja, vermelho e tons mais escuros, dependendo da sua origem botânica e da composição química dos pigmentos encontrados na exina. Alguns compostos são hidrossolúveis, representados pelos flavonóides e outros lipossolúveis como carotenoides e xantofilas (SCHMIDT; BUCHMANN, 1992; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

A maioria dos polens comercializados para consumo no Brasil refere-se à amostra heteroflorais, apresentado vários tipos polínicos em sua composição (MODRO et al., 2007; FREIRE et al., 2012; ARRUDA et al., 2013b; SATTTLER et al., 2015). A ampla variedade vegetal torna o Brasil capaz de produzir o pólen apícola ao longo do ano, podendo ser uma fonte de renda extra para a apicultura nacional, trazendo um produto de qualidade e segurança (BARRETO et al., 2006).

Analizando os tipos polínicos de 36 amostras de pólen apícola do Sul do Brasil, Carpes et al. (2009) encontraram uma única amostra monofloral contendo exclusivamente o pólen do tipo *Asteraceae baccharis* em sua composição. Ainda foram encontrados os tipos polínicos *Eupatorium*, *Asteraceae elephantopus*, *Anacardiaceae schinus*, *Anacardiaceae astronium*, *Myrtaceae eucalyptus*, *Mimosaceae mimosa* e *Brassicaceae* em amostras heteroflorais, ou seja, que não possuíam um pólen predominante (> 45 % do total de grãos).

Neste sentido, torna-se difícil caracterizar o potencial antioxidante e a composição do pólen apícola considerando sua composição botânica. Portanto, é de grande interesse a caracterização de amostras monoflorais, com potencial de produção, avaliando os seus benefícios específicos (CAMPOS et al., 2010; SATTTLER et al., 2015).

1.3 Composição química do pólen apícola

1.3.1 Composição centesimal

A composição do pólen apícola varia entre espécies de plantas; também sofre a influência da idade, da condição nutricional da planta e das condições ambientais durante o desenvolvimento do pólen (HERBERT JR; SHIMANUKI, 1978; OLIVEIRA et al., 2009; SATTLER et al., 2015). Além disso, a forma de processamento pode ser um determinante na composição de nutrientes, pois a exposição do pólen a altas temperaturas pode influenciar na composição final de vitaminas e outros nutrientes (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009).

O pólen apícola *in natura* coletado pelas abelhas contém cerca de 20-30 % de água, enquanto o pólen apícola desidratado deve apresentar umidade inferior a 4 %, segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2001).

Segundo Barreto et al. (2006), o valor calórico do pólen apícola varia de 235 a 274 kcal/100 g em amostras brasileiras. Análises químicas de amostras de pólen apícola mostraram que podem apresentar de 8 a 40 % de proteína bruta, de 1 a 15 % de lipídeos, de 1 a 18 % de carboidratos e de 0,7 a 7 % de minerais. Além de conter aminoácidos livres, vitaminas, enzimas, coenzimas e pigmentos (OLIVEIRA et al., 2009; MELO et al., 2009, ARRUDA et al., 2013a).

A Tabela 1 apresenta a comparação da composição química do pólen apícola desidratado brasileiro, obtida por diversos pesquisadores.

Tabela 1. Composição química apresentada por pesquisadores em diferentes amostras de pólen apícola desidratado brasileiro.

Componentes	Referências										(11)	(12)	(13)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)			
Umidade (%)	-	8,78	24,1	7,4	3,96	23,6	27,10	2,34	4,19	5,71	3,47	3,37	5,65
Proteínas (%)	21	21,20	26,2	21	15,78	21,4	28,27	23,59	20,47	15,0	23,38	19,80	16,64
Fibra Bruta (%)	NA	NA	1,1	NA	4,60	NA	NA	NA	3,45	NA	NA	NA	NA
Açúcares totais (%)	NA	NA	NA	NA	37,36	28,4	NA	NA	52,10	30,2	NA	NA	73,34
Lípidios (%)	3,0	8,80	5,1	7,0	3,82	3,6	2,6	4,97	4,86	3,7	5,39	3,44	6,92
Cinzas (%)	3,0	2,79	2,6	2,4	2,89	2,9	2,8	3,08	2,94	2,1	2,98	2,02	3,08

- (1) REIS; MARCHINI, 2000 (Piracicaba - SP);
- (2) BASTOS et al., 2004 (Estados de SP e MG);
- (3) FUNARI et al., 2003 (Botucatu - SP);
- (4) ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005 (região Sul do Brasil);
- (5) BARRETO et al., 2006 (várias regiões do Brasil);
- (6) MARCHINI, REIS e MORETI, 2006 (Piracicaba - SP);
- (7) MODRO, 2007 (Viçosa e Paula Cândido - MG);
- (8) MELO et al., 2009 (Parquera-Açu - SP);
- (9) CARPES et al., 2009 (região Sul do Brasil);
- (10) BARRETO et al. 2012 (Vale do Paraíba - SP);
- (11) ARRUDA et al. 2013a (Vale do Ribeira - SP);
- (12) SATTLER et al. 2015 (região Sul do Brasil);
- (13) DE-MELO et al. 2015 (9 estados do Brasil).

1.3.2 Vitaminas

As vitaminas são consideradas substâncias essenciais para o funcionamento normal de nosso organismo. Embora as vitaminas sejam necessárias em pequenas quantidades, elas apresentam estruturas e funções específicas. A categorização das vitaminas é realizada de forma empírica, onde podem ser classificadas nas seguintes funções: como cofator enzimático (vitaminas A, K, C, tiamina, niacina, riboflavina, vitamina B₆, biotina, ácido pantotênico, folato e vitamina B₁₂); como antioxidantes biológicos (vitaminas E e C), como cofator em reações metabólicas de oxido-redução (vitaminas E, K e C); como hormônios (vitaminas A e D) (COMBS, 2012).

De uma forma geral as vitaminas são classificadas quanto a sua polaridade, em lipossolúveis e hidrossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis são necessárias em pequenas quantidades para prevenir distúrbios do metabolismo, sendo que a deficiência dessas (B e C – ácido ascórbico) estão associadas à distúrbios do sistema nervoso. Dentre as vitaminas do complexo B estão a tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina ou niacinamida (vitamina B3), ácido pantotênico (vitamina B5), piridoxina ou piridoxal (vitamina B6) e cobalamina (vitamina B12). Os distúrbios metabólicos associados as essas vitaminas envolvem doenças hereditárias e deficiências grave, que estão limitados a determinadas regiões geográficas e a grupos de alto risco (CHAWLA; KVARNBERG, 2014).

As vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D e E), são essenciais para as funções fisiológicas. Nas últimas duas décadas, as deficiências dessas vitaminas estão associadas ao aumento do risco de câncer, diabetes mellitus tipo II e distúrbios do sistema imunológico. Além disso, há evidências da interações entre as vitaminas A e D na homeostase óssea, prevenindo o desenvolvimento de osteoporose (ALBAHRANI; GREAVES, 2016).

A presença de vitaminas antioxidantes em pólen apícola foi confirmada pelos estudos de Oliveira et al. (2009), Melo et al. (2009) e Sattler et al. (2015). Analisando dez amostras provenientes do estado de São Paulo, Oliveira et al. (2009) constataram a presença de teores de vitamina C que variaram de 273 a 560 µg/g, vitamina E variando de 13,5 a 42,5 µg/g e de β-caroteno variando de 56,3 a 198,9 µg/g de pólen apícola desidratado. Melo et al. (2009) analisaram amostras do estado de São Paulo onde encontraram teores de vitamina C variando entre 114 e 340 µg/g, vitamina E entre 16,27 e 38,64 µg/g e β-caroteno variando entre 3,14 e 77,88 µg/g. Em estudo realizado por Sattler et al. (2015), também verificando a presença de vitaminas antioxidantes em vinte amostras de pólen apícola da região Sul do Brasil, encontrou-se teores de vitamina C variando entre 60,33 a 796,96 µg/g, vitamina E entre 4,65 e 113,89 µg/g, e pela primeira vez foi verificada em estudos nacionais e internacionais a presença de α-caroteno em pólen apícola onde os teores variaram de 3,29 a 828,43 µg/g, e β-caroteno variando entre 0,47 e 179,21 µg/g.

Além das vitaminas antioxidantes o pólen apícola desidratado é considerado um alimento com altas quantidades de vitaminas do complexo B, evidenciado pelo estudo de Arruda et al. (2013ab). Neste trabalho foi verificada a presença de vitaminas do complexo B em sete amostras provenientes do estado de São Paulo.

Os teores de vitamina B₁ variaram entre 0,64 a 1,01 mg/100 g, B₂ entre 1,77 e 2,56 mg/100 g, vitâmeros da B₃, ácido nicotínico entre 2,03 e 3,72 mg/100 g, nicotinamida entre 5,24 e 10,74 mg/100 g, niacina entre 7,27 e 14,43 mg/100 g e por fim a vitamina B₆ representada pelos seus quatro vitâmeros, piridoxol variando entre 0,07 e 0,09 mg/100 g, piridoxal entre 0,08 e 0,31 mg/100 g, piridoxamina entre 0,25 e 0,49 mg/100 g e piridoxina entre 0,33 e 0,77 mg/100 g.

Além das vitaminas antioxidantes diversos trabalhos caracterizaram amostras de pólen apícola quanto a composição de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e anti-inflamatória, entre eles, Serra Bonvehí (2001), em amostras da Espanha, Almaraz-Abarca et al. (2007) em amostras do México e Guatemala, Carpes et al. (2009) e Arruda et al. (2013ab) em amostras do Brasil, LeBlanc et al. (2009) em amostras dos Estados Unidos, Graikou et al. (2011) em amostras da Grécia e Pascoal et al. (2014) em amostras da Espanha e Portugal.

1.3.3 Fitoesteróis

Atualmente o estilo de vida ocidental, juntamente com um alto teor de gorduras animais e particularmente o colesterol na dieta, são os principais contribuintes para doenças crônicas como a obesidade, aterosclerose, diabetes e doenças metabólicas. Este quadro é agravado por fatores de risco genéticos e pelo aumento dos níveis de colesterol no sistema circulatório, contribuindo para a disfunção endotelial (XU et al., 2013).

Neste sentido, nos últimos anos diversas pesquisas direcionam esforços nos efeitos de diminuição de colesterol com a utilização de esteróis de plantas. Dentre os efeitos estudados estão o potencial na diminuição do colesterol e consequentemente na redução do risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O mecanismo de atuação dos fitoesteróis baseia-se na

capacidade destes, em competir com o colesterol intestinal na incorporação em micelas, assim como, nos quilomícrons, fazendo com que o colesterol seja eliminado nas fezes (ALEMANY et al., 2014).

Os esteróis de plantas pertencem a família de compostos que ocorrem na natureza que incluem os fitoesteróis e fitoestanóis. Os fitoesteróis diferem estruturalmente do colesterol pela presença de um grupo metil ou etil no carbono 24 e/ou uma dupla ligação no carbono 22. Os fitoesteróis mais encontrados na alimentação são o campesterol, sitoesterol, brassicasterol e estigmasterol. No entanto estes fitoesteróis não são sintetizados endogenamente em mamíferos, assim eles devem ser obtidos exclusivamente na dieta (DE VRIES et al., 1997; JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2006).

O consumo médio de fitoesteróis foi estimado em 200 a 400 mg/dia, porém a ingestão indicada é de 2-3 g/dia, com o objetivo de obter uma redução significativa no colesterol e HDL-colesterol circulatórios (DE VRIES et al., 1997; JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2006).

Segundo Stanley e Linksens (1974) o pólen apícola também contém de 0,1 a 0,4 % de esteróis, sendo que alguns possuem diversas propriedades biológicas como o β -estradiol, β -sistosterol, stigmasterol e fucosterol, assim quantidades de monoterpenos (0,1 a 0,2 %).

Por meio do estudo realizado por Percie Du Sert (2009) foi possível identificar a presença de fitoesteróis em pólen apícola *in natura* proveniente da planta *Cistus*, contendo consideráveis teores de delta-5-avenasterol (108 mg/100 g) e 24-tilcolesterol (76 mg/100 g), assim como no pólen apícola de Castanheira sendo confirmada a presença de β -sitosterol (111 mg/100 g) e brassicasterol (46,5 mg/100 g), já no pólen apícola proveniente da planta Salgueiro foram encontrados β -sitosterol (74 mg/100g) e delta-5-avenasterol (39 mg/ 100 g).

1.3.4 Ácidos graxos

Os ácidos graxos provenientes da dieta estão associados com enfermidades cardíacas, obesidade, diabetes, câncer e outras; além disso, muitas funções das membranas celulares são dependentes da composição

lipídica e os lipídeos ingeridos através da dieta podem modificar esta composição e a atividade bioquímica das mesmas (MANCINI-FILHO, 2010). Os ácidos graxos poli-insaturados têm sido relatados por terem propriedades anti-obesidade e anti-inflamatória, uma vez que estão relacionadas por sua influência no metabolismo e funções secretórias do tecido adiposo (PROSTEK et al., 2014). Neste sentido, torna-se pertinente a realização de mais pesquisas nesta área para elucidar os mecanismos de ação dos diferentes tipos de ácidos graxos sobre as células e os tecidos.

Estudos realizados ao redor do mundo; descrevem que o perfil de ácidos graxos presentes no pólen, são em sua maioria: os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico e araquídico (MANNING, 2006; SZCZESNA, 2007). Na Austrália, o pólen apícola coletado apresentou como ácido graxo majoritário, o ácido linoleico e sua variação foi de 35,7 a 48 % (MANNING, 2006). Na Romênia, um estudo identificou no pólen apícola da região, altos níveis de ácidos α -linolênico (32,96 %), palmítico (25,80 %) e linoleico (22,17 %) (MĂRGĂOAN et al., 2014). No Brasil, amostras de pólen coletadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo continham ácido oléico, linoleico e araquídico. A variação de ácidos graxos insaturados foi de 18,6 % a 55,9 %. Os autores sugerem mais estudos a fim de discriminar os efeitos da origem botânica frente às condições de processamento e armazenamento nas proporções de ácidos graxos insaturados/saturados de pólen apícola (BASTOS et al, 2004).

Destaca-se, dentre os estudos supracitados, a presença do ácidos graxos poli-insaturados, cujas propriedades são amplamente descritas devido aos efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3 na prevenção de doenças cardiovasculares, hiperinsulinemia e, possivelmente, diabetes tipo 2 (MĂRGĂOAN et al., 2014).

1.3.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, são altamente pesquisados por suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, têm uma estrutura básica contendo, pelo menos, um anel aromático com vários grupos hidroxila. Na natureza, apresentam-se na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas; e são divididos

em dois grandes grupos: o primeiro que é constituído pelos ácidos fenólicos e flavonoides, e o segundo pelas cumarinas (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo. Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos ácidos hidroxibenzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza; suas fórmulas gerais e denominações estão representadas na Figura 2. O segundo é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Figura 2) (ZHANG; TSAO, 2016; SOARES, 2002).

Figura 2. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.

Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavanóis e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula. Os principais tipos de flavonoides estão apresentados na Figura 3 (SOARES, 2002).

Figura 3. Estrutura básica e os principais tipos de flavonoides.

Na literatura, vários estudos demonstram que vários polifenóis têm efeitos benéficos à saúde e, com base em modelos *in vitro* e *in vivo*, podem ser utilizados para tratar condições agudas e crônicas, tais como lesões por isquemia/reperfusão, neurodegeneração, diabetes e câncer. Parte desses efeitos observados pode ser atribuída pelos compostos fenólicos e às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiproliferativas (SHAY et al., 2015).

A ação antioxidante, comum nesses compostos, deve-se ao potencial de óxido-redução de determinadas moléculas, à capacidade dessas em competir por sítios ativos e receptores nas diversas estruturas celulares ou, ainda, à modulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares (SILVA et al., 2011; BASTOS; ROGERO; AREAS, 2009).

A propriedade anti-inflamatória dos compostos fenólicos está associada à capacidade de suprimirem a ativação de fatores de transcrição como o NF-κB, reduzindo a expressão dos genes induzidos por este fator, como as proteínas

COX-2, iNOS, VCAM-1, ICAM-1, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1 e interferon- γ ; por atuarem sobre a via das MAPK ou até mesmo inibindo a via de metabolização do ácido araquidônico, seja inibindo a síntese de LTB₄ (LOX-5) ou PGE₂ (COX-2) (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; DALEPRANE et al., 2012; ZHANG; TSAO, 2016).

O processo inflamatório pode ser iniciado a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A partir da interação entre as ROS e as células ocorre ativação mitocondrial das vias MAPKs e NF- κ B, bem como a via da Nrf2. A ativação de MAPKs e NF- κ B leva a ativação de fatores de transcrição que regulam mediadores inflamatórios (por exemplo, TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β). A desassociação de Nrf2 resulta na transcrição de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), heme oxigenase-1 (HO-1) e liberação de glutathione antioxidante endógena (GSH). Ambos os antioxidantes endógenos e exógenos podem sequestrar diretamente as ROS ou suprimir a transdução pro-inflamatória da via da NF- κ B, atenuando o estresse oxidativo. As setas indicam a ativação, enquanto as linhas perpendiculares mostram a inibição (ZHANG; TSAO, 2016)..

Na Figura 4 pode ser visualizada a atuação dos compostos fenólicos tanto na produção de enzimas antioxidantes como na inativação de vias inflamatórias.

Figura 4. Resumo das transduções de sinalização molecular reguladas pela ROS (Fonte: ZHANG; TSAO, 2016).

Os compostos fenólicos também participam no metabolismo dos lipídios, seja reduzindo as concentrações de lipídios circulantes, atenuando a esteatose hepática ou modulando a expressão de genes envolvidos na oxidação dos ácidos graxos. Jang e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato de arroz preto rico em antocianinas foi capaz de melhorar o perfil lipídico, aumentar a expressão de genes relacionados com o metabolismo de ácidos graxos no fígado e assim, atenuar a esteatose hepática em camundongos suplementados com dieta hiperlipídica. Mecanismo similar foi observado pelo flavonoide naringinina (PU et al., 2012).

Estudos demonstram que a ação biológica do pólen apícola é devida à presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos, que dentre outras propriedades biológicas possuem ação antioxidante e anti-inflamatória (ALMARAZ-ABARCA et al., 2007, CARPES et al., 2009; CAMPOS et al., 2010; KOMOSINSKA-VASSEV et al. 2015).

De acordo com Poiroux-Gonord et al. (2010), as variações encontradas em extratos vegetais são provavelmente atribuídas a forma de cultivo, o efeito do genótipo, a sazonalidade, as condições de crescimento e época de colheita da planta, que influenciam as concentrações de fenólicos numa variedade de plantas.

Os compostos fenólicos presentes no pólen apícola foram investigados por estudos internacionais. Cheng et al. (2013) analisando extratos de pólen apícola de *Schisandra chinensis*, planta originária da China onde está amplamente distribuída, encontraram 53,74 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (EAG/g) para fenólicos totais e 38,29 mg de equivalentes de rutina por grama de amostra (ER/g). LeBlanc et al. (2009) analisaram os compostos fenólicos e flavonoides de 6 tipos polínicos de pólen apícola do deserto de Sonora nos Estados Unidos, encontraram teores de fenólicos variando de 15,91 a 34,85 mg EAG/g, e os teores de flavonoides totais de 2,66 a 5,48 mg de quercetina/g de pólen apícola.

No Brasil, um estudo realizado por Freire et al. (2012), foi analisado o pólen apícola do município de Canavieiras-BA, foram encontrados valores de fenólicos totais entre 41,5 e 213,2 mg EAG/g de pólen apícola.

Neves, Alencar e Carpes (2009) os quais analisaram extratos etanólicos (70 %) de pólen apícola oriundos do Sudeste e Nordeste do Brasil, encontraram teores de 6,9 a 13,78 mg EAG/g para fenólicos e de 3,46 a 6,87 mg de quercetina/g de pólen apícola para flavonoides. Analisando amostras da região Sul do Brasil, Carpes et al. (2009) relataram teores de compostos fenólicos variando de 19,28 a 48,90 mg EAG/g, e os teores de flavonoides variaram de 2,10 a 28,33 mg de quercetina/g de pólen. Estes resultados não consideraram o perfil polínico das amostras de pólen apícola, não correlacionando estes com os teores de fenólicos e flavonoides.

Em estudo realizado por Arruda (2013), onde foram analisadas 62 amostras de pólen apícola provenientes de diversos estados brasileiros, os resultados encontrados para fenólicos totais variaram entre 12,60 e 84,22 mg GAE/g de pólen, sendo menor para as amostras da região Nordeste quando comparado com os das amostras das regiões Sudeste e Sul ($p = 0,027$ e $p = 0,002$ respectivamente). Já os resultados para flavonoides totais variaram entre 1,90 e 36,85 mg de quercetina/g de pólen, sendo que o conteúdo médio foi maior na

região Sul em comparação com as regiões Nordeste ($p= 0,050$) e Sudeste ($p= 0,025$). De modo geral as amostras de pólen apícola desidratado, produzidas na região Sul seguidas pelas amostras produzidas na região Sudeste, apresentaram maiores concentrações de compostos bioativos. Neste estudo, ainda foi observado a relação diretamente proporcional entre fenólicos totais e as porcentagens dos tipos polínicos *Anadenanthera*, *Asteraceae*, *Eucalyptus* e *Schinus* e inversamente proporcional com *Mimosa scabrella* e *Cocos nucifera*. Os flavonoides totais apresentaram correlação positiva com *Eucalyptus* e *Myrcia* e correlação negativa com *Schinus*, *Asteraceae*, *Poaceae* e *Vernonia*.

Assim, as quantidades e variações de compostos fenólicos nas amostras de pólen apícola entre os estudos mencionados, podem associar-se à característica botânica e origem geográfica da planta visitada pelas abelhas. Além disso, as formas e condições de extração, bem como, os solventes empregados influenciam na composição química da amostra (SERAFINI; BRANCO, 2013).

Os resultados encontrados para a atividade antioxidante do pólen brasileiro são consideravelmente diferentes entre as amostras, o EC₅₀ possui variação entre 0,35 a 13,42 mg pólen/mL extrato. Carpes et al., (2009) ao avaliarem a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de pólen apícola proveniente da região Sul do Brasil obtiveram valores de EC₅₀ entre 0,81 a 4,69 mg pólen/mL extrato. Arruda (2013) encontrou valores entre 0,35 e 13,42 mg pólen/mL extrato, já Campos et al., (2003) ao avaliarem amostras de pólen apícola coletadas em Portugal e Nova Zelândia encontraram valores de EC 50 entre 0,04 a 0,5 mg de pólen/mL de extrato.

O ensaio de poder redutor do íon férrico (FRAP) é um teste simples e direto de avaliação da capacidade antioxidante total de alimentos. Em contraste com outros ensaios, alguns autores reconhecem esta metodologia como ágil e robusta (LOPES et al., 2011). O FRAP avalia o poder antioxidante usando íon metálico como agente oxidante, medindo a habilidade dos componentes da amostra em reduzir o íon férrico. O íon ferroso resultante, em pH ácido, forma um complexo de intensa cor azul com a tripiridiltriazina (TPTZ), que é monitorado espectrofotometricamente a 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

O mesmo método foi utilizado por Marghitas et al. em 2009, para avaliar a capacidade antioxidante de doze amostras de PA de espécies florais

selecionadas provenientes da Romênia. Os autores utilizaram extratos metanólicos de PA e os resultados mostraram uma variação de 0,25 a 5,35 mmol ET/g de amostra para FRAP. LeBlanc et al. em 2009 avaliaram amostras de PA de diferentes espécies botânicas dos Estados Unidos pela mesma metodologia. Os autores encontraram uma variação de 0,24 a 3,22 mmol ET/g de amostra, neste estudo foram avaliados extratos etanólicos. Não existem até o momento dados de capacidade antioxidante pela metodologia FRAP de amostras de PA brasileiras.

O método ORAC é muito sensível e verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente à formação de um radical induzido de 2,2' – azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C. O radical reage com um composto fluorescente formando um produto não fluorescente. O efeito protetor do antioxidante é verificado calculando-se a área formada sob a curva de decréscimo da fluorescência da amostra versus tempo, quando comparada com o controle, que não apresenta atividade antioxidante.

Segundo estudo de Arruda (2013) a capacidade antioxidante pode variar em função da região estudada, e também está diretamente relacionada com a origem botânica. A atividade antioxidante quantificada pelo método de DPPH foi menor na região Centro-Oeste quando comparada a todas as demais regiões ($p < 0,05$) e maior na região Sul quando comparada com a região Nordeste ($p = 0,016$). Quando foi quantificada pelo método ORAC a atividade antioxidante variou entre 132,98 a 575,85 μmols de equivalentes de Trolox/ g de PA sendo maior na região Sul quando comparado a todas as demais regiões ($p < 0,05$).

Em estudo realizado por Arruda (2013), onde foram analisadas quimicamente 62 amostras de nove estados brasileiros, foi observado que as amostras de pólen coletadas na região Sul apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, bem como, da capacidade antioxidante, em relação as amostras de outros estados. Estes resultados foram correlacionados a presença das espécies florais *Anadenanthera*, *Asteraceae*, *Eucalyptus* e *Schinus*.

De-Melo (2015), analisou 69 amostras de nove estados brasileiros, cujos resultados demonstrou que as amostras da Região Sul também apresentaram valores mais elevados de fenólicos totais e atividade antioxidante, e estes, foram relacionados a partir da análise estatística de componentes principais a espécie botânica *Brassica*.

Neste sentido, o gênero *Eucalyptus*, *Brassica napus*, *Machaerium*, *Mimosa scabrella*, *Eupatorium* e *Euterpe* tornam-se alvos importantes para investigações, tendo em vista, a presença em alta porcentagem nas amostras provenientes dos três estados da região Sul.

1.4 Influência de fatores climáticos na composição de compostos bioativos

A presença de determinadas classes de bioativos (compostos fenólicos, fitoesteróis, ácidos graxos) nos alimentos se deve especialmente ao metabolismo secundário das plantas. Este metabolismo exerce um papel fundamental, gerando uma forte relação com o ambiente, visto que, podem auxiliar em mecanismos de defesa da planta, e assim, na sua sobrevivência (KLIEBENSTEIN, 2013). O reino vegetal produz mais de 100.000 metabólitos secundários que estão limitados a certos grupos taxonômicos. Baseados em vias biosintéticas, estes metabólitos secundários estão classificados em três grandes grupos: terpenos (isoprenoides), compostos fenólicos (fenilpropanoides e flavonoides) e compostos contendo nitrogênio (alcaloides, glicosinolatos e glicosídeos cianogênicos) (FANG et al., 2011).

Os metabólitos secundários são os componentes chave que contribuem com o odor, gosto e cor das plantas, protegendo estas em condições adversas como presença de patógenos, herbívoros e estresse ambiental como um mecanismo de defesa. Estes compostos secundários têm uma contribuição significativa na indústria farmacêutica e cosmética, assim como, na dieta devido as suas propriedades benéficas associadas (VERMA; SHUKLA, 2015).

As concentrações presentes nas plantas e alimentos são afetadas por diversos fatores biológicos e ambientais como temperatura, estiagem, salinidade, sazonalidade, ritmo circadiano, altitude, incidência solar, radiação UV, íons metálicos e deficiências de nutrientes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; GOUVEA et al., 2012).

A figura 5 mostra os principais fatores climáticos envolvidos no metabolismo secundários das plantas.

Figura 5. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Existem diversos estudos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar consideravelmente durante o ciclo dia/noite, impactando na concentração de óleo voláteis, alcaloides, glucosinolatos, glicosídeos, cianogênicos e tiocianatos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A temperatura pode influenciar os níveis de compostos fenólicos em mudas de milho roxo como demonstrado por Christie, Alfenito e Walbot (1994). Foi observado que a exposição de mudas de milho a baixas temperaturas promoveu maior acumulação de antocianinas. Da mesma forma foi demonstrado que, em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), um aumento de quatro a cinco vezes no conteúdo de ácido clorogênico e seus isômeros após submissão a baixas temperaturas.

Em estudo recente realizado por Shamloo et al. (2017), foram avaliados fatores genéticos e de temperatura nas concentrações de bioativos de trigo (*Triticum spp.*), entre eles, ácidos fenólicos, flavonoides, fitoesteróis e ácidos graxos. Foram avaliadas seis genótipos diferentes de trigo e três temperaturas de crescimento controlado (20, 25 e 30°C). Os resultados mostraram que, tanto

o conteúdo de ácidos fenólicos como de flavonoides aumentou significativamente com o aumento da temperatura e de crescimento. No entanto os teores de ácido graxo linoleico e linolênico e o campesterol diminuíram significativamente com o aumento da temperatura (30°C). Os resultados de influência do genótipo da planta mostraram que este fator não foi tão decisivo na composição de bioativos como a influência da temperatura.

As plantas estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade e quantidade de incidência luminosa. Estudos mostram uma correlação positiva entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, tais como, flavonoides, taninos e antocianinas. Isto pode ser explicado, principalmente, no caso de flavonoides e fenilpropanoides, pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar. No caso específico dos flavonoides, estes são acumulados principalmente em tecidos superficiais (tais como epiderme, subepiderme, pelos, cutícula e material epicuticular) e utilizados pela planta como filtros UV, pois absorvem radiação UV-B sem alterar a radiação fotossintética ativa (BIEZA; LOIS, 2001; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

1.5 Ensaios *in vivo* e pólen apícola

Existem diversos estudos que realizaram a caracterização físico-química do pólen apícola, conforme anteriormente abordado no item 1.3, porém estudos que propuseram a administração de PA em animais e humanos são escassos.

Em estudos com modelo animal, o PA foi administrado de duas formas: extrato e incorporado na ração. Entre as propriedades estudadas está a capacidade antioxidante e hepato-protetora de PA de *Schisandra chinensis* em camundongos (CHENG et al., 2013). O efeito protetor foi avaliado em ratos submetidos à indução de dano agudo no fígado por CCl₄, incluindo os efeitos do extrato em marcadores bioquímicos alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST), níveis de malondialdeído (MDA), superóxido-desmutase (SOD), glutatona-peroxidase (GSH-Px) em homogenato de fígado combinado com observações histopatológicas hepáticas.

Os resultados do estudo de Cheng et al. (2013) mostraram que a administração de extrato de PA proveniente da planta *Schisandra chinensis* foi

eficaz na prevenção de dano hepático induzido por CCl⁴ em ratos e, portanto, pode ser usado como um agente hepato-protetor. Este efeito pode ser, pelo menos em parte, devido à diminuição de radicais livres, de inibição da peroxidação de lipídios, e a um aumento da atividade antioxidante. De acordo com os resultados deste estudo, os compostos mais abundantes presentes neste PA são os flavonoides (quercetina, galangina, hesperetina, resveratrol e kaempferol) sendo considerados como o principal fator hepatoprotetor presente no extrato de PA de *Schisandra chinensis*.

O efeito hepatoprotetor do PA de castanheira foi avaliado por Yildiz et al. (2013) em ratos submetido a dano agudo por CCl⁴. Neste estudo analisou-se a composição química e avaliação das propriedades antioxidantes do PA de Castanheira, onde foram encontrados efeitos positivos como a recuperação dos níveis das enzimas AST e ALT, MDA e os níveis de SOD, bem como diminuiu o dano histológico e apoptose em hepatócitos após o tratamento com CCl⁴. Os resultados sugerem que PA de Castanheira pode ser utilizado como uma alternativa segura para o tratamento de doenças relacionadas ao fígado devido às quantidades de fenólicos presentes, conferindo propriedades antioxidantes ao produto.

O efeito anti-inflamatório do pólen de *Cistus sp.* foi avaliado por Maruyama (2010) onde 3 formas de administração foram utilizadas, pólen bruto, extrato aquoso e extrato etanólico em um modelo de indução de edema de pata por carragenina. O pólen apícola bruto suprimiu levemente os efeitos enquanto o extrato aquoso não promoveu efeito. Já o extrato etanólico mostrou forte inibição do edema de pata. O extrato etanólico inibiu a produção de NO e COX-2, mas não a atividade da COX-1, enquanto o extrato aquoso não afetou a produção de NO ou atividades de COX. Os flavonoides foram isolados e purificados a partir do extrato etanólico de PA, onde foram identificados pelo menos cinco flavonoides e seus glicosídeos: quercetina-7-rhamnosídeo, campferol-3-glicosídeo, isor-hamnetina, campferol e quercetina.

A conclusão de Maruyama (2010) é de que o extrato etanólico de pólen apícola mostrou uma potente atividade anti-inflamatória e seu efeito ocorre pela inibição da produção de NO, além da atividade inibidora da COX-2. Alguns flavonoides incluídos no PA podem participar em parte da ação anti-inflamatória.

O pólen apícola seria benéfico não apenas como um suplemento dietético, mas também como um alimento funcional.

O efeito tóxico do pesticida Propoxur (inseticida de carbamato), substância que induz ao estresse oxidativo, foi avaliado em ratos alimentados com PA. O PA, devido às suas propriedades biológicas (em particular, compostos fenólicos), foi capaz de diminuir a produção de radicais livres e melhorar a capacidade antioxidante. Portanto, concluiu-se que o PA pode ser usado com segurança como aditivo alimentar para fins profiláticos e também em combinação com outros medicamentos para promover o tratamento contra intoxicações causadas pelo agrotóxico Propoxur (ERASLAN; KANBUR; SILICI; 2009).

No estudo realizado por Medeiros et al. (2008) foi possível observar o potencial antialérgico de PA multifloral brasileiro (*Eucalyptus sp.*, *Cecropia*, *Eupatorium* e *Mimosa*). Foram administradas diferentes doses de extrato de PA (50, 100, 200 mg/kg) uma hora antes da indução do quadro alérgico por meio da administração de ovoalbumina aos animais. Os resultados mostraram uma recuperação no quadro alérgico geral pela diminuição das imunoglobulinas IgG1 e IgE, migração de marcadores pró-inflamatórios para os pulmões e ativação de eosinófilos.

Até o momento existem poucos estudos que avaliaram o consumo do PA assim como o seu potencial frente a patologias comumente encontradas na população. Da mesma forma, ensaios pré-clínicos com a utilização de células e animais ainda são escassos. Apesar deste quadro pouco explorado, existe um consenso do potencial do PA como um alimento rico em compostos bioativos, assim os efeitos do seu consumo tornam-se um importante foco de estudo.

2 Considerações finais

O pólen apícola vem sendo explorado quanto à sua composição em compostos bioativos, principalmente a presença de compostos fenólicos. Está estabelecido pela literatura que estes compostos possuem ação antioxidante e anti-inflamatória *in vitro*, e o PA segue este padrão. A predominância de algumas espécies botânicas no PA parece contribuir significativamente para o seu potencial antioxidante, tornando-o foco de avaliação. Entretanto, poucos estudos

confirmaram esses efeitos do PA *in vivo* sendo, portanto, alvo de pesquisas. Ensaio que avalie o seu consumo como alimento, bem como o seu potencial frente a condições fisiológicas causadoras de estresse oxidativo e inflamação, tornam-se necessárias.

3 Referências

- ALEMANY, L.; BARBERA, R.; ALEGRÍA, A.; LAPARRA, J. M. Plant sterols from foods in inflammation and risk of cardiovascular disease: A real threat? **Food and Chemical Toxicology**, v.69, p.140–149, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.038>>.
- ALBAHRANI, A. A.; GREAVES, R. F. Fat-soluble vitamins: Clinical indications and current challenges for chromatographic measurement. **Clinical Biochemist. Reviews**, v.37, n.1, p.27–47, 2016.
- ALMARAZ-ABARCA, N.; CAMPOS, M.D.G.; AVILA-REYES, J.A.; NARANJO-JIMENEZ, N.; CORRAL, J.H.; GONZALEZ-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, p.119–124, 2007. <http://doi:10.1016/j.jfca.2006.08.001>.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, n.1, p.105- 111, 2005. <http://doi:10.1016/j.jfca.2003.10.008>.
- ARRUDA, V.A.S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. [Tese] p.192, 2013.
- ARRUDA, V. A. S.; PEREIRA, A. A. S.; DE FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 2, p. 100–105, mar. 2013a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157512001925>>. Acesso em: 8 mar. 2013.

- ARRUDA, V. A. S.; SANTOS PEREIRA, A. A.; ESTEVINHO, L. M.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 51, p. 143–8, jan. 2013b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022013>>. Acesso em: 24 abr. 2013.
- BARRETO, L.M.R.C. **Pólen apícola brasileiro: perfil da produção, qualidade e caracterização organoléptica**. Botucatu, 2004. 150p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista.
- BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O.; DIB, A. P. S. **Produção de pólen no Brasil**. Taubaté: Cabral Universitária, 2006.
- BARRETO, L.M.R.C.; NORDI, J.C.; DIB, A.P.S.; CESAR, V.S.; ALVARELI, L.G.; NORDI, N.T.; CANELLA, J.B. Qualidade físico-química do pólen apícola produzido no Vale do Paraíba-SP. **Revista Biociências**, Taubaté, v.18, p.64-70, 2012.
- BASIM, E.; BASIM, H.; ÖZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 992–996, dez. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877405005819>>.
- BASTOS, D. H. M.; BARTH, O. M.; ROCHA, C. I.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; TORRES, E. A. S.; MICHELAN, M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (Apis) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais , Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v. 43, n. 43(2), p. 35–39, 2004.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; AREAS, J. A. G.. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 53(5):646-656, 2009.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. v. 76, p. 70–76, 1996.
- BIEZA, K.; LOIS, R. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels

- shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiol.**, v. 126, n. 3, p. 1105–1115, 2001.
- BOGDANOV, S.; BIERI, K.; GREMAUD, G.; IFF, D.; KÄNZIG, A.; SEILER, K.; STÖCKLI, H.; ZÜRCHER, K. Swiss Food Manual Chapter 23 B: **Bienenprodukte: Pollen, BAG** (Swiss Federal Office for Public Health), Berne, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001
- CAMPOS, M. G. R.; FRIGERIO, C.; LOPES, J.; BOGDANOV, S. What is the future of Bee-Pollen? **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 2, n. 4, p. 131-144, 2010. Disponível em: <<http://www.ibra.org.uk/articles/what-is-the-future-of-bee-pollen>>. Acesso em: 28 abr. 2013.
- CAMPOS, M.G.; CUNHA, A.; MARKHAM, K.R. Bee pollen: composition, properties and application. In: MIZRAHI, A.; LENSKEY, Y. **Bee products: properties, applications and apitherapy**. New York: Plenum Press, 1997. p.93-100. (Proceedings of an International Conference on Bee Products: properties, applications, and apitherapy, held may 26-30, 1996, in Tel Aviv, Israel).
- CAMPOS, M.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, A. P. An Approach to the Characterization of Bee Pollens via their Flavonoid / Phenolic Profiles. v. 8, n. September 1996, p. 181–185, 1997.
- CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MITCHELL, K.A.; MARKHAM, K.R.; 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, p.742-745, 2003
- CARPES, S. T.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Chemical composition and free radical scavenging activity of Apis mellifera bee pollen from Southern Brazil. **BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY**, v. 12, n. 03, p. 220–229, 2 out. 2009. Disponível em:

<<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v12n3384a.pdf>>.

Acesso em: 10 abr. 2014.

CHAWALA, J.; KVAMBERG, D. Hydrosoluble vitamins. In: Biller, J.; Ferro, J. M. **Handbook of Clinical Neurology**. v.120, p.891-914, 2014.

CHENG, N.; REN, N.; LEI, X.; ZHENG, J.; CAO, W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.234-240, 2013.

CHRISTIE, P. J.; ALFENITO, M. R.; WALBOT, V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. **Planta**, v. 194, n. 4, p. 541–549, 1994.

CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO de pólen. Artículo 785 – Resolucion 1550 de 12 de dezembro de 1990. Capitulo X, página 15. Disponível em: <http://www.apicultura.entupc.com/portal/legislacion/datos/polen.htm>.

Acesso em 12/07/2012.

COMBS JR, G. **The Vitamins**, 4.ed. Print Book, Academic Press, 2012.

CORNEJO, L.G. Pólen: tecnologia de su produccion, procesado, y comercializacion. Buenos Aires: IPTEA, 114p. 1994. Development in honey bees: part I. **Bee World**, v.86, n. 1, p.1-10.

DALEPRANE, J. B.; DA SILVA FREITAS, V.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L. A.; DÖRR, F. A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L. A.; ONG, T. P.; ABDALLA, D. S. P. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 6, p. 557–566, jun. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286311000866>>.

DE-MELO, A. A. M. Perfil químico e microbiológico , cor , análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado Perfil químico e microbiológico , cor , análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. [Tese] 2015.

DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. January, 2016.

- DE VRIES, J.H.M.; JANSEN, A.; KROMHOUT, D.; VAN DE BOVENKAMP, P.; VAN STAVEREN, W.A.; MENSINK, R.P.; KATAN, M.B.. The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged in seven countries. **J. Food Compos. Anal.** v.10, p.115– 141, 1997.
- ERASLAN, G.; KANBUR, M.; SILICI, S. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: the ameliorative effect of bee pollen. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 1, p. 86–91, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996165>>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- FANG, X.; YANG, C.; WEI, Y.; MA, Q. Genomics Grand for Diversified Plant Secondary Metabolites. **Pdr**, v. 33, n. 1, p. 53–64, 2011.
- FREIRE, K. R. L.; LINS, A. C. S.; D?REA, M. C.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1652–1664, 2012.
- FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; FILHO, H.G.; CURI, P.R.; GOMES DIERCKX, S.M.A.; FUNARI, A.R.M.; OLIVEIRA ORSI, R. Composição bromatológica e mineral de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.11, n.2, p.88-93, 2003
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS Leonardo Gobbo-Neto e Norberto P. Lopes*. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; SAKAMOTO, H. T.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; MELONI, F.; AMARAL, J. G. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus matto-grosensis* Less (Asteraceae: Vernoniae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139–2145, 2012.
- GRAIKOU, K.; KAPETA, S.; ALIGIANNIS, N.; SOTIROUDIS, G.; CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E.; CHINOU, I. Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation

- properties. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 33, 2011. Disponível em: <<http://journal.chemistrycentral.com/content/5/1/33>>.
- HERBERT JR, E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidology**, v.9, n.1, p.33-40, 1978.
- JANG, H.-H.; PARK, M.-Y.; KIM, H.-W.; LEE, Y.-M.; HWANG, K.-A.; PARK, J.-H.; PARK, D.-S.; KWON, O. Black rice (*Oryza sativa* L.) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 27, 2012. Disponível em: <<http://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-9-27>>.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A., SANTOS-HIDALGO, A.B., SAURA-CALIXTO, F. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. **J. Agric. Food Chem.** v.54, p.3462–3471, 2006.
- KLIEBENSTEIN, D. J. Making new molecules-evolution of structures for novel metabolites in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 112–117, 2013.
- KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAŻMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–6, 2015.
- KRELL, R. Value-added products from beekeeping. FAO - **Agricultural Services Bulletin**, v.124, p.87-113, 1996.
- LEBLANC, B. W.; DAVIS, O. K.; BOUE, S.; DELUCCA, A.; DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1299–1305, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.055>>.
- LOPES, J.; STANCIU, O. G.; CAMPOS, M. G.; MURADIAN, L. B.; MARGHITAS, L. A. BEE POLLEN ANTIOXIDANT ACTIVITY - A REVIEW: ACHIEVEMENTS AND FURTHER CHALLENGES. v. 2, n. 2, 2011.
- MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. cap.18, p.297-305.
- MANNING, R. Fatty acid composition of pollen and the effect of two dominant

- fatty acids (linoleic and oleic) in pollen and flour diets on longevity and nutritional composition of honey bees (*Apis mellifera*). **School of Biological Sciences and Biotechnology**, n. July, 2006.
- MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.
- MĂRGĂOAN, R.; MĂRGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; DULF, F. V.; BUNEA, A.; SOCACI, S. A.; BOBIȘ, O. Predominant and Secondary Pollen Botanical Origins Influence the Carotenoid and Fatty Acid Profile in Fresh Honeybee-Collected Pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 27, p. 6306–6316, 2014. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf5020318>>.
- MĂRGHITAȘ, L.A.; STANCIU, O.G.; DEZMIREAN, D.S.; BOBIȘ, O.; POPESCU, O.; BOGDANOV, S.S.; CAMPOS, M.C. *In vitro* capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. **Food Chemistry**, v.115, n.3, p.878-883, 2009.
- 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. 10, p. 30, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2906419&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- MEDEIROS, K.C.P.; FIGUEIREDO, C.A.V.; FIGUEREDO, T.B.; FREIRE, K.R.L.; SANTOS, F.A.R.; ALCANTARA-NEVES, N.M.; SILVA, T.M.S.; PIUVEZAM, M.R. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.41–46, 2008.
- MELO, I. L. P. de; FREITAS, A. S. De; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURANDIAN, L. B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado Correlation between nutritional composition and floral origin of dried bee pollen. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 346–353, 2009.
- MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA NETO, J.A.A. Composição

-
- e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1057-1065, 2007.
- MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1096–1101, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.020>>.
- NEGRI, G.; TEIXEIRA, E. W.; ALVES, M. L. T. M. F.; DE CAMARGO CARMELLO MORETI, A. C.; OTSUK, I. P.; BORGUINI, R. G.; SALATINO, A. Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from Southeast Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5516–5522, 2011.
- NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M. de; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. VII BMCFB, p. 107–110, 2009.
- OLIVEIRA, K. C. L. S.; MORIYA, M.; AZEDO, R. A. B.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de; TEIXEIRA, E. W.; ALVES, M. L. T. M. F.; MORETI, A. C. de C. C. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1099–1102, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-404220090005000003&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FEÁS, 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, jan. 2014.
- PERCIE DU SERT, P. Les pollens apicoles. **Phytothérapie**, v. 7, n. 2, p. 75–82, 30 abr. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10298-009-0375-x>>.
- POIROUX-GONORD, F.; BIDEL, L. P.; FANCIULLINO, A. L.; GAUTIER, H.; LAURI- LOPEZ, F.; URBAN, L. Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. **Journal of Agricultural and**
-

Food Chemistry, v. 58, p. 12065–12082, 2010.

- PROSTEK, A; GAJEWSKA, M.; KAMOLA, D.; BALASIMSKA, B. The influence of EPA and DHA on markers of inflammation in 3T3-L1 cells at different stages of cellular maturation. **Lipids in Health and Disease**, 13:3-9, 2014.
- PU, P.; GAO, D-M.; MOHAMED, S.; CHEN, J.; ZHANG, J.; ZHOU, X-Y.; ZHOU, N-J.; XIE, J.; JIANG, H. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 518:61-70, 2012.
- REIS, V.D.A.; MARCHINI, L.C. Análises físico-químicas de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis Mellifera* L.) em Piracicaba, São Paulo. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Florianópolis, 2000. **Anais**, Cd. Rom.
- SATTTLER, J. A. G.; DE MELO, I. L. P.; GRANATO, D.; ARAÚJO, E.; DA SILVA DE FREITAS, A.; BARTH, O. M.; SATTTLER, A.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**, v. 77, p. 82–91, nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>>.
- SERRA BONVEHÍ, J.; SOLIVA TORRENTÓ, M.; CENTELLES LORENTE, E. Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen Produced in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1848–1853, abr. 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0012300>>.
- SCHMIDT, J.O.; BUCHMANN, S.L. Other products of hive. In: GRAHAM, J.M.; AMGROSE, J.T.; LANGSTROTH, L.L. **The hive and the honey bee: a new book on beekeeping which continues the tradition of “Langstroth on the hive and the honeybee”**. Hamilton: Dadant, 1992. p.928-977
- SERAFINI, L. F.; BRANCO, P. Atividade antioxidante e composição centesimal de pólen apícola. 2013.
- SHAMLOO, M.; BABAWALE, E. A.; FURTADO, A.; HENRY, R. J.; ECK, P. K.; JONES, P. J. H. Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

-
- SHAY, J.; ELBAZ, H.A.; LEE, I.; ZIELSKE, S.P.; MALEK, M.H.; HÜTTEMANN, M. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 13 páginas, 2015.
- SILVA, A.M.O.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; CARVALHO, E.B.T.; LIMA, A.; NOVOA, A.V.; MANCINI-FILHO, J. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, v.24, p.121-130, 2011.
- SNODGRASS, R. E. **The anatomy of the honey bee**. In **The hive and the honey bee**. Hamilton, Illinois: Dadant & Sons, 1975.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.
- STANLEY, R.; LINSKENS, H. **Pollen: biology, biochemistry and management**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1974. 307p.
- SZCZÊSNA, T. Study on the Sugar Composition of Honeybee-collected Pollen. **Journal of Apicultural Science**, v. 51, n. 1, p. 15–22, 2007.
- TRAUTWEIN, E. A.; DEMONTY, I. Phytosterols: Natural compounds with established and emerging health benefits. **OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides**, v.14, n. 5, p. 259-266, 2007.
- XU, S.; LIU, Z.; LIU, P.,. HDL cholesterol in cardiovascular diseases: the good, the bad, and the ugly? **Int. J. Cardiol.** v.168, n.4, p.3157–3159, 2013.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105–113, 2015.
- YILDIZ O.; CAN Z.; SARAL Ö.; YULUL E.; ÖZTÜRK F.; Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.9, 2013.
- ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>>.
-

CAPÍTULO II

Avaliação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de pólen apícola de *Eucalyptus* sp.

Resumo

O pólen apícola (PA) é definido como o pólen das flores coletado pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, no qual é recolhido no ingresso da colmeia por um coletor. Estudos reconhecem o PA como um alimento funcional devido a variedade e quantidade de bioativos presentes. Dentre os compostos bioativos já identificados destacam-se os ácidos fenólicos e flavonoides, que pelo seu caráter antioxidante podem inibir ou diminuir os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs). Este trabalho teve por objetivo avaliar os teores de fenólicos e flavonoides totais, de 19 amostras de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. coletados em diferentes apiários de uma microrregião do estado do Rio Grande do Sul. Foi ainda avaliada a capacidade antioxidante por três métodos. Foram utilizados os métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu para a determinação do conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais. A atividade antioxidante dos extratos foi verificada utilizando-se os métodos de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e determinação do poder redutor férrico (FRAP). O teor de fenólicos totais variou de 17,3 a 44,3 mg EAG/g e o dos flavonoides totais de 1,3 a 4,4 mg EC/g de amostra. A capacidade antioxidante variou de 267,5 a 961,2 μ mol ET/g pelo método ORAC, de 37,7 a 147,3 μ mol ET/g pelo método FRAP, e de 0,41 a 1,61 mg pólen apícola/mL de extrato (EC50). Estes resultados mostram o potencial do PA de *Eucalyptus* sp como fonte de compostos fenólicos e flavonoides, os quais podem trazer benefícios a saúde dos consumidores.

1 Introdução

Os produtos da colmeia (pólen apícola, mel, geleia real, própolis) vem sendo estudados a fim de investigar as propriedades benéficas associadas ao seu consumo. Dentre estas estão a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana que são reconhecidamente associadas aos componentes bioativos encontrados nestes produtos (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015; SATTLER et al., 2015).

Estudos brasileiros demonstraram que o pólen apícola (PA) apresenta quantidades consideráveis de compostos bioativos (ARRUDA et al., 2013; BASTOS et al., 2004; DE-MELO, 2015; MELO et al., 2009), tais como compostos fenólicos, vitaminas antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, o PA apresenta alta capacidade antioxidante, sendo relacionada, principalmente, ao elevado conteúdo de compostos fenólicos como evidenciados pelos estudos de Carpes (2008), Arruda (2013) e De-Melo (2015).

Os compostos fenólicos são substâncias que atuam disponibilizando hidroxilas e assim, desempenham característica química redutora inibindo as espécies reativas ao oxigênio (EROS), as quais são responsáveis por diversos tipos de danos a nível celular. Esta proteção antioxidante está associada a um menor desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) (BASTOS, ROGERO, ARÊAS, 2009).

Existe hoje uma quantidade considerável de espécies botânicas presentes no PA que tiveram seu perfil físico-químico e de atividade antioxidante identificados e avaliados, porém grande parte das amostras apresentaram origem multifloral, ou seja, um mix de espécies botânicas presentes na mesma amostra (SOUZA, 2014; DE-MELO, 2015). Desta forma torna-se complexo estabelecer um padrão de composição dos bioativos nestas amostras, devido a interferência das diversas espécies botânicas presentes.

A realização da identificação do perfil polínico é a etapa inicial da avaliação dos produtos da colmeia (pólen apícola, própolis e mel), a partir dela pode-se categorizar e correlacionar os compostos bioativos presentes nestes produtos com a origem botânica ou floral. Alguns estudos mostraram a importância da avaliação de correlação entre o perfil químico e a espécie botânica em amostras de PA. Melo et al., (2009) encontraram correlação significativa das

espécies botânicas *Myrtaceae* ($r=0,95$) e *Passifloraceae* ($r=0,67$) com a vitamina C, e as espécies *Arecaceae* ($r=0,88$), *Cecropia* ($r=0,94$) e *Fabaceae* ($r=0,92$) com o β -caroteno em amostras do estado de São Paulo, enquanto Sattler et al. (2015) mostraram que o tipo botânico *Euterpe* correlacionou-se significativamente com os parâmetros α -, β -caroteno ($r=0,92$; $r=0,83$) e α -tocoferol ($r=0,63$); e o gênero *Piptocarpha* correlacionou-se ($r=0,99$) com δ -tocoferol. No estudo de Arruda (2013) foi possível observar correlação significativa entre fenólicos e flavonoides totais com o gênero *Eucalyptus* ($r=0,31$; $r=0,44$).

No estudo de Sattler et al. (2015), ficou clara a frequência de aparecimento de algumas espécies em amostras da região sul do Brasil, região esta considerada um dos polos produtores de pólen apícola brasileiro, onde observou-se que o gênero *Eucalyptus* apresentou maior frequência (76,2 %) de ocorrência entre 21 amostras avaliadas. Arruda (2013) ao avaliar amostras de pólen apícola ($n=63$) de nove estados brasileiros identificou as regiões Sul e Sudeste com maior quantidade de fenólicos e flavonoides totais, além de maior capacidade antioxidante avaliada por três métodos (DPPH, ORAC, sistema β -caroteno), sendo estes resultados correlacionados com a presença da espécie botânica *Eucalyptus sp.* É notável o potencial de produção deste tipo polínico no Brasil, especialmente na região sul e sudeste. Desta forma é importante a realização de estudos com ênfase em amostras com predominância de apenas uma espécie botânica visando a identificação de substâncias com propriedades benéficas a saúde do consumidor.

Os estudos até o momento mostram o potencial para a apicultura brasileira na produção do pólen apícola proveniente da flor de Eucalipto, porém pouco se sabe sobre o perfil de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do PA com predominância desta espécie botânica, assim como se a localização e o período de coleta podem influenciar nestes parâmetros. Diante do exposto este estudo teve por objetivo avaliar a produção de PA direcionada para o pólen apícola de *Eucalyptus sp.* buscando mais informações sobre a sua composição em fenólicos, e sua correlação com a capacidade antioxidante avaliada por três métodos diferentes.

2 Objetivos

2.1 Determinar o teor de compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante de amostras de PA de *Eucalyptus sp.*

2.2 Avaliar o impacto de fatores edafoclimáticos na composição química das amostras

3 Material e métodos

3.1 Amostragem

Foram coletadas 19 amostras de pólen apícola *in natura* produzidas por abelhas *Apis mellífera* em apiários instalados na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS). A estação está localizada na Rodovia BR-290, Km 146, na cidade de Eldorado do Sul-RS. Neste local existem diversos apiários que são utilizados (Figura 1) para a coleta de produtos da colmeia e realização de pesquisas na área de apicultura, tendo disponível uma área de 1.400 ha. Por apresentar diversos produtores associados a esta estação, as amostras refletem a produção de PA comercial da região, ao mesmo tempo em que apresenta uma estrutura experimental controlada.

Figura 1. Estação Experimental Agronômica (EEA-UFRGS) com as marcações de localização geográfica (*Global Position Satelity - GPS*) dos apiários participantes da pesquisa.

A Tabela 1 apresenta as informações dos apiários, período de coleta e a localização geográfica (GPS) dos apiários onde foram coletadas as amostras de PA de *Eucalyptus sp.*

Tabela 1. Informações dos apiários, data de coleta e localização geográfica (GPS) dos apiários onde foram coletadas as amostras de PA de *Eucalyptus sp.*

Apiário – Dia de coleta	Data de coleta	GPS
AP1-A	09/04/14	S 30°4'54.05" O 51°39'55.81"
AP1-B	14/04/14	
AP1-C	21/04/14	
AP1-D	28/04/14	
AP1-E	05/05/14	
AP2-A	09/04/14	S 30°5'38.90" O 51°40'47.97"
AP2-B	14/04/14	
AP2-C	21/04/14	
AP2-D	28/04/14	
AP2-E	05/05/14	
AP3-A	09/04/14	S 30°5'7.21" O 51°41'2.40"
AP3-D	28/04/14	
AP3-E	05/05/14	
AP4-D	28/04/14	S 30°05'14.08" O 51°40'12.89"
AP4-E	05/05/14	
AP5-A	09/04/14	S 30°6'34.27" O 51°40'3.39"
AP5-B	14/04/14	
AP6-D	28/04/14	S 30°04'57.75" O 51°40'20.84"
AP6-E	05/05/14	

3.2 Dados climáticos

Para a obtenção dos dados climáticos (temperatura compensada média, insolação e umidade) foram realizadas consultas, referentes as datas de coletas das amostras deste estudo, ao banco de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). A estação meteorológica (nº 83967) de onde os dados foram coletados fica localizada na cidade de Porto Alegre-RS.

3.3 Processamento

Após o transporte das amostras para o Laboratório de Apicultura (LABAPIS-UFRGS), as amostras foram desidratadas a 42 °C por 30 horas em estufa secadora de alimentos marca Biomatic®. Após o processamento, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (USP), onde permaneceram congeladas (-20 °C) e ao abrigo da luz, até o momento das análises.

3.4 Análise polínica

As amostras foram preparadas conforme método descrito por Barth et al. (2010), onde 2 g de cada amostra (cerca de 300 bolotas de pólen apícola) foram misturadas com etanol a 70 % (volume final: 13 mL) e a mistura deixada em repouso por 30 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a ultrassom por 5 min. Ao sedimento obtido após centrifugação (1400 g; 15 min) foi adicionado etanol a 70 % e feita uma nova homogeneização (ultrassom; 5 min). Após esta etapa, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Uma solução de água destilada:glicerina (1:1) foi adicionada ao sedimento até um volume final de 5 mL. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 30 min.

Uma gota do sedimento das amostras foi transferida para uma lâmina de microscopia e coberta com uma lamínula (22 x 22 mm). A lamínula foi vedada com esmalte e identificada para posterior observação em microscópio de luz fotônica (BARTH et al., 2010).

Os tipos polínicos foram identificados por comparação com informações já catalogadas e designados pelo táxon ao qual se assemelhavam (BARTH et al., 2010). Pelo menos 500 grãos foram contados para o cálculo das percentagens de cada tipo polínico na amostra e classificados conforme as classes de frequência em: pólen predominante (PP, >45 %), pólen acessório (PA, 15-45 %) e pólen isolado importante (PI, 3-15 %). Tipos polínicos com frequência inferior a 3 % não foram considerados. As amostras foram

classificadas como monoflorais quando apresentaram acima de 90 % de um mesmo tipo polínico ou 60 % ou mais de um tipo polínico sem a ocorrência de pólen acessório. Se não monoflorais, as amostras foram classificadas como heteroflorais (BARTH et al., 2010).

3.5 Preparo dos extratos

Para determinar os teores de fenólicos e flavonoides totais, capacidade antioxidante por ORAC, FRAP e DPPH, os compostos foram previamente extraídos das amostras conforme o método descrito por Carpes, (2008).

As amostras de PA foram trituradas utilizando moinho analítico (modelo IKA A11 basic, Wilmington, USA), e então pesados 500 mg em tubos modelo Falcon de 50 mL. Em seguida foram adicionados 15 mL de etanol 70 % e colocados em banho-maria a 50 °C por 30 minutos, sob agitação. Os tubos foram então centrifugados por 15 minutos a 2700 g e os sobrenadantes coletados, acondicionados em frascos de vidro âmbar e armazenados em congelador (-20 °C) até o momento das análises. Todos os extratos foram preparados em triplicata.

3.6 Quantificação de compostos fenólicos totais

Dentre muitos ensaios disponíveis para quantificação de polifenóis totais, o método Folin-Denis (FOLIN, 1912) é um dos mais usados. Este é baseado na reação entre polifenóis ou compostos aromáticos hidroxilados e o ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, formando um complexo azul que pode ser espectrofotometricamente monitorado a 750 nm. O método foi otimizado por Folin e Ciocalteu, (1927), com a adição de sulfato de lítio ao reagente para prevenir a precipitação no meio de reação, aumentando assim a sua sensibilidade. O método de Folin-Ciocalteu aqui descrito incorpora o uso da microplaca de 96 poços, que necessita menor quantidade de amostra e de reagentes aumentando assim a rapidez da análise.

Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 20 µL de padrão, amostra (extrato diluído) e controle de reagentes (água MilliQ). O controle foi realizado para cada amostra e para o controle de reagentes a fim de eliminar interferências

de cor da matriz. Foi ainda preparado um controle com 180µL de água MilliQ (não havendo a adição de Folin-Ciocalteu e Carbonato de Sódio). Posteriormente foi adicionado a cada poço, exceto Controles e Branco, 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. A placa foi então inserida em espectrofluorímetro de microplacas (Biotek, Synergy H1) onde se iniciou agitação por 5 minutos. Ao final desse período, foram adicionados 80 µL de Carbonato de Sódio a 7.5 % às amostras e padrões. Novamente o equipamento agitou a microplaca iniciando-se um período de incubação de 30 min. Após esse período, o equipamento novamente agitou a microplaca e realizou as leituras das absorbâncias a 760 nm.

- As análises foram realizadas em triplicata e os dados foram calculados pela seguinte equação:

$$C_{\mu\text{g/mL}} = (((Sp^n_{\text{média}} - CSp_{\text{média}}) - (Sb_{\text{média}} - CSb)) - Blk_{\text{média}}) - b) \div a * Fd$$

- Onde:

$C_{\mu\text{g/mL}}$ = Concentração em µg/mL

$Sp^n_{\text{média}}$ = Média das absorbâncias obtidas para as amostras

$CSp_{\text{média}}$ = Média das absorbâncias dos controles de amostras sem reagentes

$Std^n_{\text{média}}$ = Média das absorbâncias obtidas para cada nível da curva

$Blk_{\text{média}}$ = Média das absorbâncias dos brancos (água MilliQ)

$Sb_{\text{média}}$ = Média das absorbâncias dos controles de reagentes

CSb = Absorbância do controle dos controles de reagentes

b = Valor b da equação da reta

a = Valor a da equação da reta

Fd = Fator de diluição do extrato

3.7 Quantificação dos flavonoides totais

Para avaliação do conteúdo total de flavonoides das amostras foi utilizada a metodologia descrita por Xu et al., (2007).

Inicialmente foram preparados tubos de ensaio de 5 mL para controles de branco e amostra. No tubo controle de branco foi adicionado 200 µL de etanol 70 %, no tubo de controle de amostras foram adicionados 500 µL de extrato de

amostra + 1275 µL de etanol 70 % + 725 µL de H₂O. Para o tubo do branco foi adicionado apenas 1775 µL de etanol 70 %, enquanto que para o tubo de amostras foram adicionados 500 µL de extrato de amostra + 1275 µL de etanol 70 %. Todos os tubos apresentaram volume final de 1775 µL antes da etapa de inclusão dos reagentes. Após a preparação dos tubos a etapa dois envolve a pipetagem de reagentes apenas nos tubos de branco e amostra com o auxílio de um cronômetro. Ao iniciar a contagem no cronometro adicionou-se 75 µL de NaNO₂ e agitou-se todos os tubos. Ao atingir 6 minutos adicionou-se 150 µL de AlCl₃ e agitou-se todos os tubos. No tempo de 11 minutos adicionou-se 500 µL de NaOH e agitou-se todos os tubos. Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 200 µL de branco e 200 µL de extrato de amostra em triplicata. Após foram pipetados 200 µL do controle de branco e de amostra na quarta fileira de poços. Realizou-se a leitura a 510 nm.

- As análises foram realizadas em triplicata e os dados foram calculados pela seguinte equação:

$$\text{Abs} = ((\text{Std}^n_{\text{média}}) - (\text{Sb}_{\text{média}} - \text{CSb})) - \text{Blk}_{\text{média}}$$

▸ Onde:

Abs = Absorbância final

Stdⁿ_{média} = Média das absorbâncias obtidas para cada nível da curva

Sb_{média} = Média das absorbâncias dos controles de reagentes

CSb = Absorbância dos controles de reagentes

Blk_{média} = Média das absorbâncias dos brancos (água MilliQ)

Na plotagem da regressão linear com os valores obtidos no cálculo acima (no eixo y), contra os valores de concentração do padrão (no eixo x), obteve-se os valores de a e b da equação da reta e o coeficiente de correlação r².

Realizou-se o seguinte cálculo para a análise das amostras

$$C_{\mu\text{g/mL}} = (((\text{Sp}^n_{\text{média}} - \text{CSp}_{\text{média}}) - (\text{Sb}_{\text{média}} - \text{CSb})) - \text{Blk}_{\text{média}}) - b) \div a * Fd$$

▸ Onde:

C_{µg/mL} = Concentração em µg/mL

Spⁿ_{média} = Média das absorbâncias obtidas para as amostras

CSp_{média} = Média das absorbâncias dos controles de amostras sem reagentes

$Std^n_{média}$ = Média das absorvâncias obtidas para cada nível da curva

$Blk_{média}$ = Média das absorvâncias dos brancos (água MilliQ)

$Sb_{média}$ = Média das absorvâncias dos controles de reagentes

CSb = Absorvância do controle dos controles de reagentes

b = Valor b da equação da reta

a = Valor a da equação da reta

Fd = Fator de diluição do extrato

3.8 Atividade antioxidante pelo método DPPH•

A atividade antioxidante das amostras foi determinada pela capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) conforme descrito por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina de coloração amarela. A redução da cor do DPPH sob a ação do antioxidante foi então monitorada pelo decréscimo da absorvância a 517 nm. Foram preparadas 5 diluições (2 a 200 vezes) de cada extrato em etanol a 70 %. Em microplaca de 96 poços, 160 µL de solução do radical DPPH (6.10^{-5}) M em metanol 80 % foram adicionados a 80 µL de cada diluição da amostra em quadruplicatas. Foi realizado um controle ($Abs_{ControleAmostra}$: 80 µL de amostra + 160 µL de metanol a 80%) para eliminar a interferência da cor da amostra, bem como um controle do DPPH ($Abs_{ControleDPPH}$: 80 µL de etanol a 70 % + 160 µL de DPPH). Após 30 minutos em temperatura ambiente (sala climatizada a 22 °C) ao abrigo de luz, foi realizada a leitura a 517 nm em espectrofluorímetro de microplacas (Biotek, Synergy H1). A atividade antioxidante foi expressa em percentual de descoloração (PD) do DPPH• segundo a fórmula:

$$PD (\%) = \{1 - [Abs_{Amostra} - Abs_{ControleAmostra} / Abs_{ControleDPPH}]\} \times 100$$

Os resultados foram expressos em índice de concentração (EC_{50}), isto é, a concentração de amostra (mg de pólen apícola/mL) necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH. O EC_{50} é determinado a partir de uma regressão linear (r^2 mínimo de 0,93), onde y é o PD do DPPH e x é a concentração de cada uma das 5 diluições correspondentes (respeitando-se uma faixa de PD entre 9 e 93 %) de extrato de pólen apícola desidratado. Assim,

quanto menor o valor de EC_{50} , maior é a capacidade antioxidante dos compostos da amostra.

3.9 Atividade antioxidante pelo método (ORAC)

O método de avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) estima a habilidade da amostra em resistir ao dano oxidativo, refletindo os efeitos combinados de todos os seus antioxidantes. Um indicador sensível ao dano oxidativo, a fluoresceína, sofre oxidação pela adição do gerador de radical peroxila 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), sendo sua degradação monitorada fluorimetricamente.

Em sistema automatizado do espectrofluorímetro de microplacas (Biotek, Synergy H1), as diluições de cada extrato em triplicata (25 μ L) foram encubados a 37 °C com 150 μ L de solução de Fluoresceína (40 nM) por 30 min. Após esse período, foram adicionados 25 μ L de solução de AAPH (153 nM), iniciando-se o monitoramento fluorimétrico (485 nm de excitação e 528 nm de emissão) em intervalos de 1 min, por 1 hora. A integral (área sob a curva) foi recolhida através do software Gen 5 e os resultados foram calculados através de curva padrão de Trolox® (6,25 a 100 μ M) e expressos em μ mol ET/grama de amostra. Quanto maior a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência (descontando o teste em branco), maior a capacidade antioxidante da amostra.

3.10 Atividade antioxidante pelo método FRAP

A determinação do poder redutor férrico (FRAP) foi obtida por meio do método descrito por (BENZIE; STRAIN, 1996). Foi utilizado espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (Biotek instruments Inc., VT, USA) com microplaca de poliestireno com 96 poços e fundo transparente. O reagente FRAP foi preparado com tampão acetato de sódio 300 mM pH 3,6, solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ) (Flucka Chemicals Siusse) 10 mM em ácido clorídrico (Synth) 40 mM e solução de cloreto férrico (Synth) 20 mM, na proporção 10:1:1. O reagente foi aquecido em banho-maria à 37 °C até o momento do uso. Na microplaca foram adicionados 20 μ L de amostra, controle e padrão Trolox. Em seguida, foram adicionados, rapidamente, 150 μ L de reagente FRAP aquecido

em cada poço. Logo, iniciou-se o período de incubação por oito minutos, à mesma temperatura. Após esse período, foi realizada a leitura das absorbâncias a 593 nm. A curva padrão foi preparada com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) (Sigma Aldrich) na concentração de 12 a 800 µM. Os resultados foram expressos em µmol equivalentes Trolox (ET).g⁻¹ de amostra.

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos por médias seguidas do desvio padrão (n=3). A análise inferencial para comparar os apiários foi realizada por meio de análise unidirecional de variâncias (ANOVA) seguida do teste de Fisher menos significativo para comparar os valores médios. Welch-ANOVA foi usado para dados heterocedásticos. A homocedasticidade foi analisada pelo teste de Brown-Forsythe, de acordo com os princípios delineados por Granato, Calado e Jarvis (2014). A análise de correlação entre os compostos bioativos e a atividade antioxidante *in vitro* (n=57 pontos de dados) foi baseada nos coeficientes de correlação de Pearson. Valores de probabilidade abaixo de 0,05 foram considerados significativos. O software Statistica v. 13.3 (Statsoft, EUA) foi utilizado em todas as análises.

4 Resultados e discussão

A Tabela 2 apresenta os dados climáticos referentes as cinco datas de coleta das amostras de PA de *Eucalyptus sp.* do presente estudo.

Tabela 2. Dados climáticos (temperatura compensada média, insolação e umidade relativa) das amostras de PA de *Eucalyptus sp.* coletadas em cinco datas.

Dia de coleta	Temperatura c. média (°C)	Insolação (horas)	Umidade relativa (%)
A	23,6	6,2	74,0
B	16,4	9,1	73,5
C	20,9	7,6	80,5
D	19,3	7,2	70,8
E	20,2	4,4	87,5

Os dados de identificação da origem botânica das amostras realizada por análise microscópica são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados das amostras, gênero, percentual de pólen predominante (% PP), pólen acessório (% PA) e pólen isolado (% PII).

Amostras	Gênero	% PP	% PA	% PII
AP1-A	Heterofloral	<i>Eucalyptus</i> (62,3 %)	<i>Myrcia</i> (31,1 %)	<i>Zeamays</i> (3,1 %)
AP1-B	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (91,7 %)	-	<i>Zeamays</i> (7,6 %)
AP1-C	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (95 %)	-	-
AP1-D	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (95,7 %)	-	<i>Poaceae</i> (4,3 %)
AP1-E	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (100 %)	-	-
AP2-A	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (96 %)	-	<i>Poaceae</i> (3 %)
AP2-B	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (87,3 %)	-	<i>Poaceae</i> (7 %); <i>Asteraceae</i> (5,6 %).
AP2-C	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (94,7 %)	-	<i>Zeamays</i> (4,4 %).
AP2-D	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (96,9 %)	-	<i>Poaceae</i> (3,1 %)
AP2-E	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (95,9 %)	-	<i>Poaceae</i> (4,1 %)
AP3-A	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (95 %)	-	<i>Zeamays</i> (3,9 %)
AP3-D	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (99,1 %)	-	-
AP3-E	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (100 %)	-	-
AP4-D	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (98,5 %)	-	-
AP4-E	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (89,3 %)	-	<i>Myrcia</i> (9,4 %)
AP5-A	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (95,2 %)	-	<i>Poaceae</i> (4,8 %)
AP5-B	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (86 %)	-	<i>Poaceae</i> (14,1 %)
AP6-D	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (86,8 %)	-	<i>Myrcia</i> (10,5 %)
AP6-E	Monofloral	<i>Eucalyptus</i> (100 %)	-	-

PP = pólen predominante (mais de 45 %). PA = pólen acessório (de 15 a 45 %), PII= pólen isolado importante (de 3 a 15 %).

De acordo com a análise polínica foi possível confirmar a presença do tipo polínico *Eucalyptus sp.* como o pólen predominante sendo que a maioria delas foram classificadas como pólen apícola monofloral.

Os resultados de fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidante (ORAC, FRAP e DPPH) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização dos fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidante (ORAC, FRAP e DPPH) das amostras de PA de *Eucalyptus sp.*, agrupados por apiários.

Amostras	Fenólicos (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EC/g)	ORAC (μ mol ET/g)	FRAP (μ mol ET/g)	DPPH - EC50 (mg/mL extrato)
AP1-A	20,9 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,0	267,48 $\pm$ 6,7	54,3 $\pm$ 0,6	1,03 $\pm$ 0,1
AP1-B	17,3 $\pm$ 1,5	1,4 $\pm$ 0,1	433,69 $\pm$ 38,0	37,7 $\pm$ 2,7	1,61 $\pm$ 0,1
AP1-C	23,6 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,0	304,6 $\pm$ 12,0	62,9 $\pm$ 2,8	0,90 $\pm$ 0,0
AP1-D	36,4 $\pm$ 2,8	4,4 $\pm$ 0,4	626,16 $\pm$ 14,8	107,4 $\pm$ 2,4	0,50 $\pm$ 0,0
AP1-E	39,0 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,1	961,16 $\pm$ 4,7	115,8 $\pm$ 1,1	0,46 $\pm$ 0,0
Média (n=5)	27,46 $\pm$ 9,7 ^c	2,70 $\pm$ 1,3 ^{ab}	518,62 $\pm$ 284,38	75,62 $\pm$ 34,20 ^b	0,90 $\pm$ 0,5 ^a
AP2-A	25,7 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,0	411,94 $\pm$ 12,8	74,3 $\pm$ 3,2	0,75 $\pm$ 0,0
AP2-B	28,6 $\pm$ 1,2	2,0 $\pm$ 0,0	354,97 $\pm$ 12,8	147,3 $\pm$ 5,1	0,66 $\pm$ 0,0
AP2-C	29,7 $\pm$ 1,7	3,2 $\pm$ 0,2	386,63 $\pm$ 26,1	89,6 $\pm$ 3,1	0,66 $\pm$ 0,0
AP2-D	32,3 $\pm$ 2,5	2,9 $\pm$ 0,2	441,35 $\pm$ 30,1	105,8 $\pm$ 0,5	0,59 $\pm$ 0,0
AP2-E	44,3 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,3	625,7 $\pm$ 6,8	137,8 $\pm$ 2,8	0,41 $\pm$ 0,0
Média (n=5)	32,1 $\pm$ 7,2 ^{ab}	2,72 $\pm$ 0,6 ^a	444,12 $\pm$ 106,38	110,96 $\pm$ 31,10 ^a	0,61 $\pm$ 0,1 ^b
AP3-A	32,6 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 0,2	481,92 $\pm$ 15,2	99 $\pm$ 2,2	0,67 $\pm$ 0,0
AP3-D	36,5 $\pm$ 3,5	3,4 $\pm$ 0,1	458,17 $\pm$ 18,4	119,3 $\pm$ 3,8	0,58 $\pm$ 0,0
AP3-E	41,0 $\pm$ 3,2	3,3 $\pm$ 0,2	436,58 $\pm$ 39,7	129,7 $\pm$ 1,8	0,59 $\pm$ 0,0
Média (n=3)	36,7 $\pm$ 4,2 ^a	3,19 $\pm$ 0,3 ^a	458,9 $\pm$ 22,7	116,0 $\pm$ 15,6 ^a	0,61 $\pm$ 0,0 ^b
AP4-D	32,4 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,2	363,48 $\pm$ 26,3	106,2 $\pm$ 2,4	0,61 $\pm$ 0,0
AP4-E	39,2 $\pm$ 0,9	3,9 $\pm$ 0,1	729,84 $\pm$ 30,7	126,8 $\pm$ 1,8	0,52 $\pm$ 0,0
Média (n=2)	35,8 $\pm$ 4,8 ^a	3,51 $\pm$ 0,5 ^a	546,7 $\pm$ 259,1	116,5 $\pm$ 14,6 ^a	0,57 $\pm$ 0,1 ^b
AP5-A	29,4 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 0,1	377,54 $\pm$ 23,6	84,8 $\pm$ 1,1	0,81 $\pm$ 0,0
AP5-B	23,2 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,1	298,49 $\pm$ 9,3	52,7 $\pm$ 2,0	1,21 $\pm$ 0,1
Média (n=2)	26,3 $\pm$ 4,4 ^c	2,01 $\pm$ 0,1 ^{bc}	338,0 $\pm$ 55,9	68,8 $\pm$ 22,7 ^b	1,01 $\pm$ 0,3 ^a
AP6-D	28,3 $\pm$ 2,1	1,3 $\pm$ 0,3	303,8 $\pm$ 31,6	138,8 $\pm$ 3,7	0,8 $\pm$ 0,0
AP6-E	38,4 $\pm$ 1,6	2,5 $\pm$ 0,2	544,6 $\pm$ 16,2	122,7 $\pm$ 2,6	0,5 $\pm$ 0,0
Média (n=2)	33,3 $\pm$ 7,1 ^{ab}	1,88 $\pm$ 0,8 ^c	424,2 $\pm$ 170,3	130,8 $\pm$ 11,4 ^a	0,64 $\pm$ 0,2 ^b
MD geral (n=19)	32,0 $\pm$ 4,3	2,7 $\pm$ 0,6	455,0 $\pm$ 73,8	103,1 $\pm$ 24,93	0,72 $\pm$ 0,2

Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05), ANOVA one-way.

Conforme demonstrado na Tabela 4, o pólen apícola de *Eucalyptus sp.* apresentou em média alta quantidade de compostos fenólicos (32 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra) e flavonoides (2,7 mg de

equivalentes de catequina por grama de amostra) e por consequência uma considerável atividade antioxidante pelos métodos avaliados (ORAC, FRAP e DPPH).

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com Carpes (2008) que avaliaram amostras (n=32) da região Sul do Brasil, onde encontraram valores médios de fenólicos totais de 30,7 mg de EAG/g e de flavonoides entre 0,4 e 17,5 mg EC/g de PA. Arruda et al., (2013) ao avaliar amostras de PA da região nordeste encontrou valores de fenólicos totais de 13,8 a 24,6 EAG/g e de flavonoides de 2,5 a 6,9 EC/g de PA, enquanto que De-Melo em 2015, encontrou valores entre 6,5 e 29,2 EAG/g para fenólicos totais e 0,4 a 17,5 EC/g para flavonoides de 56 amostras de 9 estados brasileiros.

No presente estudo, ao avaliar as amostras agrupadas por localização geográfica (apiário), houve diferenças entre as médias para os parâmetros avaliados. As amostras coletadas no apiário AP2, AP3 e AP4 apresentaram maior quantidade de fenólicos totais e de atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH. Da mesma forma, quando as amostras foram agrupadas por dia de coleta (com intervalos de uma semana), podem-se observar diferenças significativas para quase todos os parâmetros avaliados (Figura 2).

No último dia de coleta (Dia E) foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) para quase todos os parâmetros avaliados (fenólicos totais, flavonoides, ORAC, FRAP e DPPH) indicando que o período de coleta pode influenciar na composição de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante. Cabe destacar que no dia E ocorreu o menor tempo de insolação (4,4 horas) indicando uma possível correlação.

Ao avaliar possíveis mudanças na composição polínica foi possível notar que não houve diferenças no perfil polínico das amostras entre as semanas de coleta, assim a origem botânica não foi considerada um fator interferente nos resultados químicos, possivelmente os fatores climáticos influenciaram no metabolismo de bioativos das plantas poliníferas.

Figura 2. Fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de PA de *Eucalyptus* sp. agrupadas por dia de coleta.

Os resultados dos testes de correlação entre os parâmetros estudados mostram que eles se correlacionaram e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Gráficos de correlação entre os parâmetros avaliados em amostras de PA de *Eucalyptus sp.*

Respostas	Fenólicos Totais	Flavonoides Totais	ORAC	FRAP	DPPH	Temp Comp. Méd. (°C)	Insolação (horas)	Umidade Relativa (%)
Fenólicos Totais	1.000 p= ---							
Flavonoides Totais	.693 p=.000	1.000 p= ---						
ORAC	.662 p=.000	.586 p=.000	1.000 p= ---					
FRAP	.780 p=.000	.395 p=.002	.390 p=.003	1.000 p= ---				
DPPH	-.855 p=.000	-.695 p=.000	-.518 p=.000	-.801 p=.000	1.000 p= ---			
Temp Comp. Méd. (°C)	.077 p=.567	.087 p=.520	.006 p=.960	-.123 p=.361	-.261 p=.050	1.000 p= ---		
Insolação (horas)	-.725 p=.000	-.414 p=.001	-.612 p=.000	-.439 p=.001	.625 p=.000	-.530 p=.000	1.000 p= ---	
Umidade Rel. (%)	.564 p=.000	.214 p=.110	.574 p=.000	.307 p=.020	-.376 p=.004	.123 p=.360	-.744 p=.000	1.000 p= ---

ORAC=Capacidade de absorção de radicais de oxigênio; FRAP= Determinação do poder redutor do ferro; DPPH= Sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; Temp. Comp. Méd.=Temperatura compensada média.

Os resultados de correlação estatística entre os parâmetros químicos, de atividade antioxidante e fatores climáticos mostraram que houve correlação entre alguns fatores avaliados.

O parâmetro de fenólicos totais se correlacionou com maior atividade antioxidante pela metodologia FRAP assim como pela metodologia DPPH, portanto quanto maior o teor de fenólicos no PA, maior a atividade antioxidante *in vitro*.

A análise mostra também, que quanto maior foi a insolação a que as amostras foram submetidas, menor é a quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante avaliado por ORAC e DPPH. Os parâmetros temperatura

compensada média e umidade relativa não foram correlacionados aos parâmetros químicos.

Assim pode-se destacar que o tempo de insolação foi um fator interferente na composição de fenólicos totais e consequentemente na atividade antioxidante, mostrando a relação entre o ambiente e a composição de bioativos de pólen apícola de *Eucalyptus sp.*

5 Conclusões

Os resultados do presente trabalho mostram o potencial do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* como fonte de compostos fenólicos. Além disso as amostras de PA-EU apresentaram considerável potencial antioxidante, avaliado por diferentes métodos, mostrando características de um alimento funcional.

A coleta de diversas amostras da mesma origem botânica em diferentes períodos de coleta foi um ponto chave do trabalho, possibilitando avaliar de maneira inédita a relação entre fatores climáticos e a composição química, isolando o fator de predominância polínica.

Por fim deve-se levar em consideração para futuros estudos de identificação e composição de bioativos, o potencial polinífero da espécie *Eucalyptus sp.* no país, com foco na produção apícola (mel, própolis e pólen apícola), visto a ampla distribuição desta espécie pelo território brasileiro.

6 Referências

- ARRUDA, V.A.S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. [Tese] p.192, 2013.
- ARRUDA, V.A.S.; PEREIRA, A.A.S.; DE 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**, v.29, n.2, p.100–105, 2013.
- BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical

- origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.
- BASTOS, D.H.M.; BARTH, O.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S.; MICHELAN, M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais , Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.43, n.2, p.35–39, 2004.
- BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p.646–56, 2009.
- BENZIE, 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.76, p.70–76, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LTW – Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- CARPES, S. T. **Características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil**. Universidade Federal do Paraná, [Tese] 2008.
- CARPES, S. T.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY**, v. 12, n. 03, p. 220–229, 2 out. 2009. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v12n3384a.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.
- DE-MELO, A. A. M. Perfil químico e microbiológico , cor , análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado Perfil químico e microbiológico , cor , análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. [Tese] 2015.
- FOLIN, O. NITROGEN RETENTION IN THE BLOOD IN EXPERIMENTAL ACUTE NEPHRITIS OF THE CAT. **Journal of Experimental Medicine**, v.

- 16, n. 6, p. 789–796, 1 dez. 1912. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/cgi/content/long/16/6/789>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS. **J. Biol. Chem.**, v. 73, n. 2, p. 627–650, 1 jun. 1927. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/content/long/73/2/627>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- GRANATO, D.; CALADO, V. M. A. ; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Research International*, v.55, p.137-149, 2014.
- KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAŻMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/297425/>>.
- MELO, I. L. P. de; FREITAS, A. S. De; BARTH, O. M.; DE, L. B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado Correlation between nutritional composition and floral origin of dried bee pollen. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 346–353, 2009.
- SATTTLER, J. A. G.; MELO, I. L. P.; GRANATO, D.; ARAÚJO, E.; DA SILVA DE FREITAS, A.; BARTH, O. M.; SATTTLER, A.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**, v. 77, p. 82–91, nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>>.
- SOUZA, B. R. Quantificação das vitaminas do complexo B (B1, B2) e vitâmeros das vitaminas B3 e B6 em amostras de pólen apícola desidratado provenientes da região Sul do Brasil. 2014. 124f. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- XU, B.J; CHANG, S.K. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v.27, n.2, p.S159-66, 2007

CAPÍTULO III

Caracterização do perfil de ácidos graxos e fitoesteróis em pólen apícola de *Eucalyptus* sp.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o conteúdo de ácidos graxos e fitoesteróis em pólen apícola de *Eucalyptus* sp. produzido em diferentes apiários de uma microrregião do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Foram analisadas 18 amostras de pólen apícola (PA) desidratado coletadas entre abril e maio de 2014. O perfil de ácidos graxos e fitoesteróis foi analisado por cromatografia gasosa. Foram ainda analisados fatores climáticos (umidade relativa, temperatura e insolação), localização e data de coleta das amostras com o objetivo de avaliar a relação destes fatores com a composição química. Com a extração de gordura total confirmou-se a baixa concentração de lipídeos nas amostras de PA, com resultados variando entre $2,3 \pm 0,1$ e $4,6 \pm 0,6$ %. Entretanto, o perfil de ácidos graxos (AGs) mostrou que mais de 50 % destes são AGs poli-insaturados. As amostras de PA de *Eucalyptus* sp. apresentaram considerável concentração de fitoesteróis ($1,2 \pm 0,0$ – $5,6 \pm 0,9$ mg/g), com predominância do β -sitoesterol na maioria das amostras (70 %). Os resultados de análise de componentes principais (PCA) mostraram que os fatores umidade relativa e insolação estavam associados com a composição química das amostras. Estes resultados sugerem que o PA pode ser um alimento fonte de fitoesteróis e que a composição sofre influência de fatores climáticos.

1 Introdução

O pólen apícola (PA) apresenta baixa quantidade de gordura (3-8 %), porém sua maior parte é composta de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) (BASTOS et al., 2004; MĂRGĂOAN et al., 2014). Além disso, PA apresenta vários componentes minoritários, incluindo fenólicos, carotenoides, tocoferóis e fitoesteróis. Estes componentes podem exercer ação anti-inflamatória, *antioxidante*, antimicrobiana, antiviral e antialérgica trazendo benefícios à saúde ou prevenindo desordens metabólicas relacionadas ao envelhecimento e/ou a uma dieta desbalanceada (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015; LOPES et al., 2011; SATTLER et al., 2015).

Os ácidos graxos (AGs) são lipídios simples podendo ser classificados quanto ao tamanho da cadeia de hidrocarbonetos, a presença de ramificações, insaturações (dupla-ligações) e a posição da primeira ligação dupla. OS AGPIs não podem ser sintetizados pelos humanos sendo então classificados como "essenciais" pois devem ser ingeridos em quantidades adequadas pela dieta (LOPATEGI et al., 2016). Estudos mostram que os AGPIs, tais como os da série n-3 (linolênico), n-6 (linoleico), triacilglicerol de cadeia média e diacilglicerol, reduzem o acúmulo de tecido adiposo abdominal e de lipídios no fígado e soro, além de melhorar os níveis pressóricos e glicêmicos por meio da regulação transcricional de genes envolvidos no metabolismo lipídico e de glicose (NAGAO; YANAGITA, 2008).

Além dos AGPIs, os fitoesteróis (esteróis e estanois de origem vegetal) são frequentemente usados para tratamento de dislipidemias, pois a sua ingestão regular promove a redução dos níveis de colesterol, principalmente lipoproteína de baixa intensidade (LDL). No estudo conduzido pela European Food Safety Authority (2008) foi estabelecido que a ingestão diária de dois gramas de estanois vegetais reduzem em 10 % o LDL sérico resultando em um decréscimo significativo de doenças cardiovasculares e mortalidade (WONG, 2014; EFSA, 2008).

Existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram os componentes minoritários em amostras de PA (BASTOS et al., 2004; MANNING, 2006; MĂRGĂOAN et al., 2014; PERCIE DU SERT, 2009). Portanto, torna-se importante a caracterização do PA quanto a composição de ácidos graxos e a

fração insaponificável, que pode agregar valor ao PA como um componente dietético. Com isso, o objetivo deste estudo foi analisar o conteúdo de ácidos graxos e fitoesteróis em pólen apícola de *Eucalyptus* sp, verificando a influência dos fatores climáticos sobre os mesmos.

2 Objetivos

2.1 Caracterizar o perfil de ácidos graxos e fitoesteróis de amostras de PA de *Eucalyptus* sp.

2.2 Avaliar o impacto de fatores climáticos nestes componentes.

3 Material e Métodos

Foram utilizadas 17 amostras de PA de *Eucalyptus* sp. para análise de ácidos graxos, sendo excluídas as amostras AP2-B e AP6-E, e nas análises de fitoesteróis foram utilizadas 18 amostras, sendo excluída a AP2-B, apresentadas no capítulo II (item 3.1).

3.1 Extração da gordura total e perfil de ácidos graxos

As amostras utilizadas foram processadas e previamente trituradas conforme descrito no capítulo II. Os lipídeos do pólen apícola foram extraídos segundo o método descrito por Folch, Lee e Stanley (1957), onde foram pesados cerca de 500 miligramas (mg) de amostra a qual foram adicionados 5 mL da solução metanol:clorofórmio (proporção 1:2) e homogeneizados por um minuto. Em seguida, a mistura obtida foi filtrada e coletada. O resíduo contido no filtro foi então homogeneizado novamente com 5 mL da solução metanol:clorofórmio (1:2) por 1 minuto e novamente filtrado – procedimento repetido mais uma vez, totalizando três lavagens. Todo o filtrado foi então transferido para uma proveta e o volume foi medido para acréscimo de 1/4 de cloreto de potássio (KCl 0,88%). A mistura foi agitada manualmente e a fase superior foi aspirada. O volume residual foi aferido para adicionar 1/4 da solução metanol:água (1:1). Após agitação, a fase superior foi aspirada e a solução restante foi filtrada em sulfato

de sódio e coletada em tubos de esterificação. O solvente foi evaporado em atmosfera de nitrogênio (N₂).

Os ácidos graxos foram então transformados em ésteres metílicos utilizando Trifluoreto de boro (BF₃) em metanol. A fração lipídica foi diluída em 1 mL de tolueno, adicionados 3 mL de BF₃ (14 %) e levado ao aquecimento em banho maria (50 °C por 10 minutos). Os tubos foram então resfriados e, em seguida, adicionado 100 µL de ácido acético glacial, 5 mL de água destilada e 5 mL de hexano; a mistura foi agitada por 20 segundos em vortex e deixada em repouso para a separação de fases. A fase superior foi recuperada e filtrada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). A fase inferior foi lavada novamente com 5 mL de hexano, agitada em vortex por 20 segundos e deixada em repouso para a separação de fases. A fase superior foi recuperada e filtrada em sulfato de sódio anidro. O solvente coletado foi evaporado em N₂ e os ésteres metílicos foram ressuspensos em 250 µL de hexano e a solução foi transferida para um *vial* e injetado no cromatógrafo à gás (CG), conforme metodologia descrita pela AOAC (2002).

Para a identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes nas amostras por CG foi utilizado um cromatógrafo marca Shimadzu GC (modelo 2010), com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida (100 m; 0,25 mm de diâmetro interno; 0,2 µm de espessura do filme / SP-2560); nas seguintes condições: temperatura da coluna isotérmica a 140 °C por 5 minutos e então aquecimento de 4 °C por minuto até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 260 °C, respectivamente. Foi utilizado o gás hélio (1 mL/min) como gás de arraste e a razão de divisão da amostra no injetor (*split*) igual a 1/50. A identificação dos ácidos graxos foi realizada com base na comparação com os tempos de retenção relativos à mistura de padrões de metil-ésteres C4-C24 (padrão sigma-18919). A porcentagem relativa de cada ácido graxo foi calculada em relação ao total de gordura (soma da área de todos os picos). Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão das porcentagens, realizados em triplicata.

3.2 Análise dos fitoesteróis

A extração dos fitoesteróis foi realizada em duas etapas, conforme metodologia adaptada de Naeemi et al. (1995) e Almeida (2009): saponificação a quente e extração da matéria insaponificável. Foram testadas cinco condições de saponificação (Cs): a primeira utilizou KOH 3 % em banho maria a 50°C sob agitação durante três horas; e nas outras quatro foram utilizadas diferentes concentrações de KOH (15 %, 30 %, 50 % e 65 %) em banho maria a 80°C sob agitação por trinta minutos.

Foram pesados 500 mg de amostra, adicionados 150 µL do padrão interno (5α-colestano, sigma C8003, na concentração de 1 mg/mL) e 5 mL da solução de KOH (30 %) e submetida a saponificação em banho maria (80 °C por 30 min), condição selecionada a partir do teste anterior. Em seguida as amostras foram resfriadas, e adicionados 5 mL de água MilliQ e 5 mL de hexano. A solução foi agitada e a fase superior coletada. A fase inferior foi lavada novamente com 5 mL de hexano, agitada em vortex e deixada em repouso para a separação de fases. A fase superior foi novamente coletada, evaporada em N₂ e ressuspensa em 250 µL de hexano para injeção no CG.

Foi utilizado um CG da marca Shimadzu (modelo 2010), com detector de ionização de chama e coluna de sílica (5 % difenil, 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno/SPB-5). A temperatura inicial da coluna foi de 180 °C, seguida de aquecimento de 20 °C/min até 280 °C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 290 °C e 300 °C, respectivamente. Foi utilizado o gás hélio (1,5 mL/min) como gás de arraste e a razão de divisão da amostra no injetor (*split*) igual a 1/50. A identificação dos picos foi realizada através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões Sigma (campesterol – C5157, estigmasterol – S6126 e β-sitosterol – S9889) e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno 5α-colestano (Sigma-Aldrich C8003).

3.3 Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos por médias seguidas do desvio padrão (n = 3). Com o objetivo de comparar os apiários e os dias de

coleta, realizou-se ANOVA unidirecional (dados homocedásticos) ou Welch-ANOVA (dados heteroscedásticos), enquanto o teste de Fisher foi o menos significativo para identificar diferentes meios. O teste de Brown-Forsythe foi utilizado para verificar a homocedasticidade entre os grupos com $p < 0,05$ (Granato, Calado, Jarvis, 2014). Coeficientes de correlação linear foram calculados para avaliar a associação entre os teores de ácidos graxos, fitoesteróis e condições climáticas. O software Statistica v. 13.3 (Statsoft, EUA) foi utilizado em todas as análises.

Com o objetivo de caracterizar as amostras de pólen apícola coletadas em dias diferentes nos apiários selecionados, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos valores em triplicata dos teores de fitoesteróis e ácidos graxos. Os resultados foram transformados em escores z de acordo com a Equação 1:

$$z_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde z é o valor padronizado para cada valor da resposta, x_{ij} representa o valor original para o objeto (i) do atributo medido (j), $\bar{x}_j$ é o valor médio da variável j, e s_j é o desvio padrão para a resposta. A PCA foi baseada na análise de correlação e as variâncias foram computadas como somas de quadrados/n-1. Cargas fatoriais superiores a 0,60 foram usadas para projetar os extratos no plano do fator (PC1 x PC2) (Granato et al., 2018). O software Statistica v. 13.3 (Statsoft, EUA) foi utilizado na análise multivariada.

4 Resultados e discussão

4.1 Caracterização de ácidos graxos

A Tabela 1 mostra que o perfil de ácidos graxos presentes nas 17 amostras de PA de *Eucalyptus sp.* é bastante variável. Porém, ao avaliar o conteúdo de lipídeos totais, assim como dos grupos de ácidos graxos (saturados- AGS, insaturados- AGI, monoinsaturados- AGMI e poli-insaturados- AGPI), com

as amostras agrupadas por apiário (mesma microrregião de produção e coleta) não se observou diferenças significativas entre eles (Tabela 2).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos (%) do pólen apícola de *Eucalyptus* sp.

	C16:0	C18:0	C18:1c n9	C18:2t	C18:2c n6	C20:0	C18:3c n3	C22:0	C24:4 n6	C24:0
AP1-A	30 ± 0,3	1,8 ± 0,1	6,7 ± 0,1	2,9 ± 0,0	19 ± 0,5	1,2 ± 0,0	27 ± 0,5	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0
AP1-B	31 ± 0,2	1,8 ± 0,0	6,1 ± 0,0	3,6 ± 0,0	18 ± 0,6	1,3 ± 0,0	24 ± 0,3	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,0
AP1-C	27 ± 0,1	1,7 ± 0,1	9,0 ± 0,1	2,6 ± 0,0	26 ± 0,8	1,6 ± 0,0	22 ± 0,4	0,9 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
AP1-D	19 ± 0,4	2,9 ± 0,2	21 ± 1,7	3,3 ± 0,1	30 ± 2,4	1,2 ± 0,0	9,0 v 0,7	0,8 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,0
AP1-E	17 ± 0,4	1,7 ± 0,1	11 ± 0,3	2,5 ± 0,1	48 ± 1,8	1,1 ± 0,0	6,9 ± 0,8	1,1 ± 0,0	NE	0,4 ± 0,0
Média	25 ± 6,6^a	2,0 ± 0,5	11 ± 6,1	3,0 ± 0,5^c	28 ± 12^c	1,3 ± 0,2^c	18 ± 9,2^a	0,8 ± 0,1^{bc}	0,3 ± 0,2^{cd}	0,4 ± 0,0^b
AP2-A	26 ± 0,4	2,4 ± 0,0	9,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1	24 ± 1,4	1,9 ± 0,0	21 ± 0,6	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0
AP2-C	28 ± 0,4	2,1 ± 0,1	9,0 ± 0,3	3,7 ± 0,1	23 ± 0,2	1,9 ± 0,0	23 ± 0,4	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	NE
AP2-D	19 ± 0,1	1,7 ± 0,1	12 ± 0,4	NE	34 ± 1,9	1,4 ± 0,0	11 ± 0,3	1,0 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0
AP2-E	19 ± 0,1	1,6 ± 0,1	9,4 ± 0,3	2,3 ± 0,1	48 ± 1,1	NE	9,4 ± 0,2	1,0 ± 0,0	NE	0,4 ± 0,0
Média	23 ± 4,6^a	1,9 ± 0,4	9,9 ± 1,1	2,4 ± 1,7^b	32 ± 12^{bc}	1,3 ± 0,9^c	16,1 ± 7^a	0,8 ± 0,3^c	0,4 ± 0,3^c	0,3 ± 0,2^c
AP3-A	21 ± 0,1	2,4 ± 0,1	14 ± 0,2	4,2 ± 0,5	28 ± 2,5	1,8 ± 0,1	14 ± 1,0	0,9 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0
AP3-D	18 ± 0,3	1,9 ± 0,0	13 ± 0,2	2,6 ± 0,1	47 ± 0,3	1,1 ± 0,0	7,2 ± 0,3	1,0 ± 0,0	NE	0,5 ± 0,0
AP3-E	18 ± 0,1	1,3 ± 0,1	9,8 ± 0,2	3,0 ± 0,1	50 ± 0,3	1,2 ± 0,0	7,2 ± 0,2	1,3 ± 0,0	NE	0,6 ± 0,0
Média	19 ± 1,8^b	1,9 ± 0,6	13 ± 2,0	3,3 ± 0,8^{bc}	42 ± 12^a	1,4 ± 0,4^{ab}	9,6 ± 4,2^b	1,0 ± 0,2^a	0,2 ± 0,3^{de}	0,6 ± 0,0^d
AP4-D	20 ± 0,4	1,7 ± 0,2	13 ± 2,4	4,0 ± 0,2	33 ± 1,8	1,1 ± 0,0	12 ± 0,7	0,9 ± 0,0	NE	1,5 ± 0,3
AP4-E	16 ± 0,2	1,5 ± 0,1	14 ± 0,6	3,5 ± 0,1	43 ± 1,0	1,2 ± 0,0	7,5 ± 0,2	1,1 ± 0,0	NE	1,2 ± 0,1
Média	18 ± 3,0^b	1,6 ± 0,1	14 ± 0,7	3,8 ± 0,4^b	38 ± 6,6^{ab}	1,2 ± 0,0^c	9,7 ± 3,0^b	1,0 ± 0,1^{ab}	0,0 ± 0,0^{de}	1,4 ± 0,2^a
AP5-A	22 ± 0,1	2,1 ± 0,1	11 ± 0,5	5,4 ± 0,4	26 ± 1,2	1,7 ± 0,1	16 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,2
AP5-B	27 ± 0,2	2,1 ± 0,0	5,7 ± 0,1	5,3 ± 0,1	21 ± 1,0	1,9 ± 0,0	21 ± 0,3	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,0
Média	25 ± 4^a	2,1 ± 0,0	8,4 ± 3,7	5,3 ± 0,1^a	24 ± 3,4^c	1,8 ± 0,0^a	19 ± 3,4^a	1,2 ± 0,3^a	1,1 ± 0,2^a	0,9 ± 0,2^d
AP6-D	26 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,0	8,3 ± 0,2	4,9 ± 0,1 ^a	20 ± 0,5 ^c	1,9 ± 0,0 ^a	23 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,0 ^c	0,6 ± 0,0 ^b	0,7 ± 0,1 ^d
Média total	23 ± 3,3	1,9 ± 0,2	11 ± 2,2	3,8 ± 1,1	31 ± 8,3	1,5 ± 0,3	16 ± 5,2	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,4	0,7 ± 0,4

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). NE=Não encontrado.

Tabela 2. Conteúdo de lipídios (%) do pólen apícola de *Eucalyptus sp.*

Amostras	Lipídeos totais (%) [*]	Ácidos Graxos (%) [*]			Poli-insaturados
		Saturados	Insaturados	Monoinsaturados	
AP1-A	2,3 ± 0,1	37 ± 0,5	57,3 ± 0,1	6,7 ± 0,1	50 ± 1,0
AP1-B	2,4 ± 0,3	38 ± 0,3	53,8 ± 0,3	6,1 ± 0,0	47 ± 1,0
AP1-C	2,7 ± 0,4	35 ± 0,3	61,1 ± 0,7	9,0 ± 0,1	51 ± 1,2
AP1-D	3,2 ± 0,5	26 ± 0,9	63,4 ± 1,2	22 ± 1,7	42 ± 3,2
AP1-E	3,3 ± 0,3	22 ± 0,7	68,7 ± 0,7	11 ± 0,3	58 ± 2,7
MD (n=5)	2,8 ± 0,5	32 ± 7,0^a	60,9 ± 5,7^{bcd}	11 ± 6,4^{bc}	50 ± 5,6
AP2-A	3,5 ± 0,2	31 ± 0,6	59,2 ± 0,7	9,5 ± 0,1	50 ± 2,1
AP2-C	3,7 ± 0,6	33 ± 0,6	59,1 ± 0,1	9,0 ± 0,4	50 ± 0,7
AP2-D	3,2 ± 0,1	25 ± 0,4	61,1 ± 0,8	11 ± 0,4	45 ± 2,2
AP2-E	3,1 ± 0,4	24 ± 0,2	69,3 ± 0,4	9,4 ± 0,3	58 ± 1,3
MD (n=4)	3,3 ± 0,8	28 ± 4,6^a	62,2 ± 4,9^{bc}	9,9 ± 1,0^{bc}	51 ± 5,1
AP3-A	3,2 ± 0,4	27 ± 0,4	61,0 ± 1,0	14 ± 0,2	47 ± 3,9
AP3-D	2,8 ± 1,1	22 ± 0,3	70,1 ± 0,4	13 ± 0,2	57 ± 0,7
AP3-E	4,6 ± 0,6	22 ± 0,2	70,0 ± 0,1	9,8 ± 0,2	60 ± 0,6
MD (n=3)	3,5 ± 1,0	24 ± 2,8^b	67,0 ± 5,2^a	12 ± 2,0^{ab}	55 ± 6,8
AP4-D	3,7 ± 0,5	26 ± 0,9	62,1 ± 0,4	13 ± 2,4	49 ± 2,7
AP4-E	3,7 ± 0,6	21 ± 0,4	67,8 ± 0,4	14 ± 0,6	54 ± 1,3
MD (n=2)	3,7 ± 0,6	23 ± 3,1^b	64,9 ± 4,0^{ab}	14 ± 0,7^a	51 ± 3,2
AP5-A	3,1 ± 0,6	28 ± 0,6	60,1 ± 0,6	11 ± 0,5	42 ± 1,5
AP5-B	3,7 ± 0,6	33 ± 0,3	54,2 ± 0,5	5,7 ± 0,1	42 ± 1,3
MD (n=2)	3,4 ± 0,4	30 ± 3,5^a	57,2 ± 4,2^c	8,4 ± 3,7^c	42 ± 0,0
AP6-D	2,9 ± 0,2	32 ± 0,3 ^a	56,9 ± 0,3 ^c	8,3 ± 0,2 ^c	43 ± 0,6
Média Total	3,3 ± 0,4	28 ± 3,8	62,1 ± 5,4	11 ± 2,2	49 ± 4,9

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que o pólen apícola apresenta uma baixa quantidade média de lipídios totais (3,3 ± 0,4), porém mais de 50 % destes são de ácidos graxos poli-insaturados.

No estudo de Bastos et al., (2004) onde avaliaram quatorze amostras de PA dos estados de Minas Gerais e São Paulo encontraram valor médio de ácidos graxos insaturados de 18,6 a 55,9 %. Neste trabalho duas amostras foram classificadas pela origem botânica como *Eucalyptus sp.*, a primeira com característica monofloral apresentou AGPI médio de 39,8 % e AGS de 47,6 %, enquanto que a segunda amostra de característica polifloral com predominância de *Eucalyptus sp.* apresentou valor médio de AGPI de 55,9 % e de AGS de 31,8 %.

Na Figura 1 estão apresentados os gráficos referentes ao perfil de ácidos graxos presentes nas amostras de pólen apícola de *Eucalyptus sp.* agrupadas por dia de coleta. De acordo com a Figura 1, as amostras coletadas nos dias D e E (final de Abril e início de Maio) apresentaram menor quantidade de AGS (Figura 1-M) e maior quantidade de AGPI (Figura 1-E).

Uma vez que trabalhos que avaliam os fitoesteróis em amostras de PA são escassos na literatura, foram realizados testes utilizando cinco diferentes condições de extração a fim de confirmar qual a melhor metodologia a ser utilizada para as análises com o PA. Os cromatogramas referentes às três amostras testadas estão apresentados na Figura 2 e a quantificação dos fitoesteróis nas diferentes condições é mostrada na Tabela 3.

E – (C18:2c n6) **F – (C18:3c n3)** **G – (C20:0)** **H – (C22:0)** **I – (C20:4 n6)** **J – (C24:0)** **L – Lipídios totais** **M - Saturados**

Figura 1. Perfil de ácidos graxos presentes nas amostras de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. agrupadas por dia de coleta. **(A)** C16:0 (palmítico); **(B)** C18:0 (esteárico); **(C)** C18:1c n9 (oleico); **(D)** C18:2t n6 (*trans*-linoleico); **(E)** C18:2c n6 (*cis*-linoleico); **(F)** C18:3c n3 (α -linolênico); **(G)** C20:0 (eicosanoico); **(H)** C22:0 (docosanoico); **(I)** C20:4 n6 (araquidônico); **(J)** C24:0 (tetracosanoico); **(L)** Lipídios totais; **(M)** Saturados; **(N)** Insaturados; **(O)** Poli-insaturados; **(P)** Monoinsaturados.

4.2 Avaliação de métodos de extração para identificação de fitoesteróis

Figura 2. Cromatogramas correspondentes à análise de fitoesteróis de três amostras de pólen apícola de *Eucalyptus sp.* em cinco diferentes condições de extração (Cs), e das soluções padrões (Mix de padrões – **A**; β-sitosterol – **B**; 5α-colestano – **C**).

Tabela 3. Quantificação dos fitoesteróis de três amostras de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. em cinco diferentes condições de extração (Cs).

	PD interno [#]	Fitoesteróis (mg/g)*				
	% recuperado	Campesterol	Estigmasterol	β-sitoesterol	NI	Total
Amostra A						
Cs 1 (3 %)	47 ± 40	0,59 ± 0,13		0,44 ± 0,11	1,4 ± 0,31 ^a	2,4 ± 0,55 ^b
Cs 2 (15 %)	67 ± 18	0,87 ± 0,01		0,55 ± 0,04	3,4 ± 0,19 ^b	4,9 ± 0,17 ^a
Cs 3 (30 %)	69 ± 7,2	0,93 ± 0,09		0,55 ± 0,07	4,4 ± 0,36 ^b	5,9 ± 0,43 ^a
Cs 4 (50 %)	53 ± 4,7	0,55 ± 0,37		0,40 ± 0,27	3,7 ± 0,94 ^b	4,7 ± 1,6 ^{ab}
Cs 5 (65 %)	68 ± 3,6	0,77 ± 0,20		0,55 ± 0,07	3,9 ± 0,73 ^b	5,2 ± 0,95 ^a
Amostra B						
Cs 1 (3 %)	76 ± 17	0,06 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,00 ^b	1,1 ± 0,19	0,14 ± 0,02 ^a	1,3 ± 0,23 ^c
Cs 2 (15 %)	55 ± 20	0,08 ± 0,00 ^{bc}	0,03 ± 0,01 ^{ab}	1,4 ± 0,05	0,41 ± 0,04 ^b	1,9 ± 0,00 ^b
Cs 3 (30 %)	48 ± 8,4	0,08 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,00 ^{ab}	1,6 ± 0,07	0,45 ± 0,04 ^b	2,1 ± 0,09 ^b
Cs 4 (50 %)	44 ± 3,6	0,11 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	2,2 ± 0,12	0,45 ± 0,05 ^b	2,8 ± 0,14 ^a
Cs 5 (65 %)	40 ± 7,7	0,09 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	2,2 ± 0,22	0,48 ± 0,06 ^b	2,8 ± 0,28 ^a
Amostra C						
Cs 1 (3 %)	81 ± 1,5 ^a	0,19 ± 0,02 ^b		0,60 ± 0,04	0,42 ± 0,14 ^b	1,2 ± 0,19 ^b
Cs 2 (15 %)	68 ± 20 ^{ab}	0,61 ± 0,17 ^a		1,8 ± 0,40	0,92 ± 0,25 ^{ab}	3,3 ± 0,82 ^a
Cs 3 (30 %)	59 ± 30 ^{ab}	0,58 ± 0,20 ^a		1,6 ± 0,38	0,94 ± 0,30 ^{ab}	3,1 ± 0,88 ^a
Cs 4 (50 %)	41 ± 9,6 ^{ab}	0,66 ± 0,16 ^a		1,6 ± 0,28	1,1 ± 0,24 ^a	3,3 ± 0,68 ^a
Cs 5 (65 %)	54 ± 12 ^b	0,53 ± 0,03 ^a		1,7 ± 0,18	0,91 ± 0,20 ^{ab}	3,1 ± 0,41 ^a
Média						
Cs 1 (3 %)	68 ± 18	0,28 ± 0,28		0,71 ± 0,34	0,64 ± 0,64	1,6 ± 0,66
Cs 2 (15 %)	63 ± 7,2	0,52 ± 0,40		1,3 ± 0,63	1,6 ± 1,6	3,4 ± 1,5
Cs 3 (30 %)	59 ± 11	0,53 ± 0,43		1,2 ± 0,58	1,9 ± 2,2	3,7 ± 2,0
Cs 4 (50 %)	46 ± 6,2	0,44 ± 0,29		1,4 ± 0,90	1,8 ± 1,7	3,6 ± 1,0
Cs 5 (65 %)	54 ± 14	0,46 ± 0,34		1,5 ± 0,83	1,8 ± 1,9	3,7 ± 1,3

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si estatisticamente (ANOVA one-way seguida de Tukey, p<0,05). Ni= não identificados.

[#]Porcentagem de recuperação em relação a quantidade inserida na amostra e a quantificação através da curva padrão.

Todas as condições testadas foram capazes de extrair e separar apropriadamente os picos referentes aos fitoesteróis nas amostras de pólen. Porém, a Cs 3 (30 %) resultou em maior quantidade de fitoesteróis totais extraídos, aliada a uma boa recuperação do padrão interno. Sendo, portanto, a condição escolhida para analisar as outras amostras, como mostra a Tabela 4.

4.3 Caracterização de fitoesteróis

Tabela 4. Composição de fitoesteróis (mg/g) do pólen apícola de *Eucalyptus* sp.

Amostras	Fitoesteróis [mg/g (%)]*				
	Campesterol	Estigmasterol	β -sitosterol	NI	Total
AP1-A	0,42 $\pm$ 0,01 (11)	0,02 $\pm$ 0,00 (0,54)	0,27 $\pm$ 0,01 (7,3)	2,99 $\pm$ 0,23 (81)	3,70 $\pm$ 0,25
AP1-B	0,64 $\pm$ 0,10 (12)	0,02 $\pm$ 0,00 (0,36)	0,24 $\pm$ 0,03 (4,3)	4,67 $\pm$ 0,73 (84)	5,56 $\pm$ 0,85
AP1-C	0,36 $\pm$ 0,11 (11)	0,04 $\pm$ 0,03 (0,5)	0,43 $\pm$ 0,12 (13)	2,66 $\pm$ 0,39 (75)	3,48 $\pm$ 0,58
AP1-D	0,10 $\pm$ 0,01 (5,7)	0,03 $\pm$ 0,00 (2,3)	0,95 $\pm$ 0,07 (56)	0,63 $\pm$ 0,03 (37)	1,71 $\pm$ 0,09
AP1-E	0,03 $\pm$ 0,01 (1,7)	0,03 $\pm$ 0,00 (1,3)	1,45 $\pm$ 0,54 (74)	0,51 $\pm$ 0,05 (23)	2,03 $\pm$ 0,61
MD (n=5)	0,31 $\pm$ 0,25 (9,6)^{ab}	0,03 $\pm$ 0,01 (0,9)	0,67 $\pm$ 0,52 (24)^{bc}	2,29 $\pm$ 1,75 (66)^a	3,30 $\pm$ 1,54^a
AP2-A	0,23 $\pm$ 0,02 (16)	0,03 $\pm$ 0,00 (2,1)	0,38 $\pm$ 0,03 (27)	0,77 $\pm$ 0,02 (54)	1,42 $\pm$ 0,02
AP2-C	0,39 $\pm$ 0,01 (20)	0,02 $\pm$ 0,00 (1,0)	0,40 $\pm$ 0,03 (21)	1,13 $\pm$ 0,07 (59)	1,93 $\pm$ 0,10
AP2-D	0,06 $\pm$ 0,01 (4,7)	0,03 $\pm$ 0,00 (2,4)	0,79 $\pm$ 0,15 (62)	0,39 $\pm$ 0,03 (31)	1,27 $\pm$ 0,18
AP2-E	0,07 $\pm$ 0,01 (5,7)	0,03 $\pm$ 0,00 (2,4)	0,63 $\pm$ 0,05 (51)	0,49 $\pm$ 0,03 (40)	1,23 $\pm$ 0,07
MD (n=4)	0,19 $\pm$ 0,16 (11)^{bc}	0,03 $\pm$ 0,01 (2,2)	0,55 $\pm$ 0,20 (37)^{bc}	0,69 $\pm$ 0,33 (50)^b	1,46 $\pm$ 0,32^c
AP3-A	0,23 $\pm$ 0,03 (10)	0,02 $\pm$ 0,00 (0,8)	1,25 $\pm$ 0,14 (52)	0,89 $\pm$ 0,05 (37)	2,39 $\pm$ 0,22
AP3-D	0,02 $\pm$ 0,00 (0,8)	0,03 $\pm$ 0,00 (1,2)	1,81 $\pm$ 0,02 (73)	0,61 $\pm$ 0,03 (25)	2,47 $\pm$ 0,05
AP3-E	0,03 $\pm$ 0,00 (1,4)	0,05 $\pm$ 0,00 (2,3)	1,60 $\pm$ 0,07 (73)	0,51 $\pm$ 0,03 (23)	2,18 $\pm$ 0,04
MD (n=3)	0,09 $\pm$ 0,12 (3,9)^c	0,03 $\pm$ 0,02 (1,4)	1,55 $\pm$ 0,28 (66)^a	0,67 $\pm$ 0,20 (28)^b	2,35 $\pm$ 0,14^b
AP4-D	0,06 $\pm$ 0,01 (4,1)	0,04 $\pm$ 0,00 (2,8)	0,52 $\pm$ 0,01 (36)	0,83 $\pm$ 0,03 (57)	1,46 $\pm$ 0,05
AP4-E	0,02 $\pm$ 0,00 (1,4)	0,03 $\pm$ 0,00 (2,1)	0,91 $\pm$ 0,04 (62)	0,50 $\pm$ 0,04 (34)	1,46 $\pm$ 0,08
MD (n=2)	0,04 $\pm$ 0,03 (2,8)^c	0,04 $\pm$ 0,01 (2,4)	0,71 $\pm$ 0,27 (49)^{bc}	0,67 $\pm$ 0,24 (46)^b	1,46 $\pm$ 0,01^c
AP5-A	0,40 $\pm$ 0,04 (19)	0,03 $\pm$ 0,00 (1,4)	0,72 $\pm$ 0,04 (33)	1,00 $\pm$ 0,04 (47)	2,15 $\pm$ 0,04
AP5-B	0,35 $\pm$ 0,01 (27)	0,03 $\pm$ 0,01 (2,3)	0,18 $\pm$ 0,02 (15)	0,74 $\pm$ 0,05 (57)	1,30 $\pm$ 0,07
MD (n=2)	0,38 $\pm$ 0,03 (23)^a	0,03 $\pm$ 0,00 (1,9)	0,45 $\pm$ 0,38 (24)^c	0,87 $\pm$ 0,19 (52)^b	1,72 $\pm$ 0,60^{bc}
AP6-D	0,51 $\pm$ 0,01 (21)	0,02 $\pm$ 0,00 (0,8)	0,93 $\pm$ 0,28 (32)	1,12 $\pm$ 0,06 (46)	2,58 $\pm$ 0,33
AP6-E	0,02 $\pm$ 0,00 (3,4)	0,05 $\pm$ 0,01 (2,2)	1,09 $\pm$ 0,38 (29)	0,86 $\pm$ 0,13 (46)	2,02 $\pm$ 0,49
MD (n=2)	0,26 $\pm$ 0,34 (12)^a	0,04 $\pm$ 0,02 (1,5)	1,01 $\pm$ 0,11 (31)^b	0,99 $\pm$ 0,18 (46)^{ab}	2,30 $\pm$ 0,40^{ab}
Média Total	0,21 $\pm$ 0,13 (10)	0,03 $\pm$ 0,00 (1,3)	0,82 $\pm$ 0,40 (31)	1,03 $\pm$ 0,63 (58)	2,10 $\pm$ 0,71

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si estatisticamente (ANOVA one-way seguida de Tukey, $p < 0,05$). NI – Não identificado.

Os resultados da Tabela 4 mostram que as amostras de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. apresentaram quantidades consideráveis de fitoesteróis totais, variando entre $1,23 \pm 0,07$ e $5,56 \pm 0,85$ miligrama por grama de amostra (média = $2,10 \pm 0,71$ mg/ g). A maioria das amostras continha o beta-sitosterol como componente principal, com uma média de 31 % do total de fitoesteróis.

Existe uma escassez de dados sobre composição de fitoesteróis presentes no pólen apícola na literatura. Por meio do estudo realizado por Percie Du Sert (2009), foi possível identificar a presença de fitoesteróis em amostras de pólen apícola proveniente de três espécies botânicas; Cistus, Castanheira e Nogueira. O PA de Cistus apresentou quantidades consideráveis de avenasterol

(1,08 mg/g) e 24-thilcolesterol (0,76 mg/g), o PA de Castanheira, foi confirmada a presença de sitosterol (1,11 mg/g) e brassicasterol (0,46 mg/g). Já no pólen apícola proveniente da *Nogueira*, foram encontrados sitosterol (0,74 mg/g) e avenasterol (0,39 mg/g). No presente trabalho foi possível identificar estigmasterol, campesterol e β -sitosterol, sendo as quantidades de fitoesteróis encontradas nas amostras de *Eucalyptus sp.* maiores.

Neste sentido, apesar do pólen apícola ser considerado um alimento de origem animal pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001), ele não contém colesterol em sua composição e sim uma elevada quantidade de fitoesteróis. Os resultados sugerem que o PA pode ser usado como uma importante fonte dietética de β -sitosterol, acrescentando valor ao produto por aumentar os potenciais benefícios à saúde.

Existem diversos fatores que podem interferir na composição química das plantas e alimentos de origem vegetal. Dentre os fatores abióticos estão a exposição a diferentes temperaturas, incidência de luz (UV), umidade relativa e exposição a contaminantes ambientais como o ozônio (IRITI et al., 2009; SINGER; ZOU; WESELAKE, 2016).

A Figura 3, apresenta o percentual (%) de fitoesteróis por grama de amostra de pólen apícola agrupadas por dia de coleta.

Figura 3. Percentual (%) de campesterol nas amostras por semana de coleta **(a)** e percentual de estigmasterol **(b)**; percentual de sitoesterol **(c)**; miligramas de outros fitoesteróis por grama de amostra **(d)**; miligramas de fitoesteróis totais **(e)** por grama de amostra de pólen apícola agrupadas por dia de coleta.

No estudo realizado por Iriti et al. (2009) foi avaliado a influência da exposição de feijões ao ozônio ambiental (O^3) no conteúdo de lipídios totais e fitoesteróis. Os resultados mostraram que os feijões que foram expostos a O^3 tiveram o teor de lipídios totais aumentado em 28,6 %, assim como as quantidades dos fitoesteróis β -sitoesterol, campesterol e estigmasterol em 77, 66, 52 %, respectivamente. Ao nível celular a membrana das plantas, composta principalmente por AGPIs é o primeiro alvo de ação pelo O^3 que é capaz de induzir peroxidação lipídica. Assim as plantas aumentam um mecanismo

funcional de proteção as membranas aumentando a produção de fitoesteróis como um contra-ataque a exposição de espécies reativas geradas pela exposição ao O³.

Um dos fatores abióticos de maior influência na composição de ácidos graxos de plantas é a deficiência hídrica. Segundo Zhong et al., (2011) o teor de lipídios totais de folhas de plantas pode diminuir em resposta deficiência hídrica. A deficiência hídrica quando foi avaliada em folhas de Cártamo (*Carthamus tinctorius*) diminuiu a proporção dos ácidos graxos linolênico e linoleico, da mesma forma, houve uma redução da produção de C18:3 e desaparecimento do ácido graxo palmitoleico (C16:1) em folhas de Sálvia (*Salvia officinalis*) (ZHONG et al., 2011).

4.4 Estudo de correlação entre os parâmetros avaliados

A Tabela 5 apresenta os valores de correlação (Spearman) entre os parâmetros químicos avaliados e fatores climáticos seguidos pelo valor de significância ($p < 0,05$).

Os resultados mostram que a temperatura não esteve correlacionada à nenhum parâmetro químico avaliado, no entanto, a umidade relativa esteve positivamente correlacionada ($p < 0,05$) com a maior presença de ácidos graxos poli-insaturados. Cabe destacar que o fator insolação apresentou correlação positiva com a presença de ácidos graxos saturados, e correlação negativa com C18:2c n6 (ácido graxo linoleico), insaturados e poli-insaturados ($p < 0,05$).

Tabela 5. Valores de correlação entre os parâmetros químicos e fatores climáticos.

	Temperatura	Insolação	Umidade Relativa	Fitoesteróis	Outros	Campesterol	Estigmasterol	Sitoesterol	C16:0	C18:0	C18:1c n9	C18:2t n6	C18:2c n6	C20:0	C18:3 n3	C22:0	C20:4 n6	C24:0	Saturados	Insaturados	Mono-insaturados	Poli-insaturados
Temperatura	1.000 p= ---																					
Insolação	-.482 p=.00	1.000 p= ---																				
Umidade Relativa	.096 p=.51	-.726 p=.00	1.000 p= ---																			
Fitoesteróis	-.117 p=.42	.373 p=.00	-.163 p=.26	1.000 p= ---																		
Outros	-.129 p=.37	.474 p=.00	-.188 p=.19	.932 p=0.0	1.000 p= ---																	
Campesterol	-.069 p=.63	.621 p=.00	-.359 p=.01	.679 p=.00	.761 p=.00	1.000 p= ---																
Estigmasterol	-.043 p=.76	-.304 p=.03	.210 p=.14	-.373 p=.00	-.403 p=.00	-.598 p=.00	1.000 p= ---															
Sitoesterol	.060 p=.67	-.482 p=.00	.199 p=.16	-.142 p=.32	-.480 p=.00	-.591 p=.00	.296 p=.03	1.000 p= ---														
C16:0	-.035 p=.81	.653 p=.00	-.347 p=.01	.592 p=.00	.754 p=.00	.911 p=0.0	-.468 p=.00	-.738 p=.00	1.000 p= ---													
C18:0	.197 p=.17	.365 p=.01	-.534 p=.00	-.114 p=.43	-.088 p=.54	.178 p=.21	-.268 p=.06	-.118 p=.41	.146 p=.31	1.000 p= ---												
C18:1c n9	.123 p=.39	-.264 p=.06	-.068 p=.63	-.370 p=.00	-.478 p=.00	-.594 p=.00	.253 p=.07	.488 p=.00	-.689 p=.00	.443 p=.00	1.000 p= ---											

Continua...

	Temperatura	Insolação	Umidade Relativa	Fitoesteróis	Outros	Campesterol	Estigmasterol	Sitoesterol	C16:0	C18:0	C18:1c n9	C18:2t n6	C18:2c n6	C20:0	C18:3 n3	C22:0	C20:4 n6	C24:0	Saturados	Insaturados	Mono-insaturados	Poli-insaturados
C18:2t n6	-.151 p=.29	.474 p=.00	-.543 p=.00	-.175 p=.22	-.109 p=.45	.367 p=.00	-.227 p=.11	-.281 p=.05	.238 p=.09	.302 p=.03	-.139 p=.33	1.000 p= ---										
C18:2c n6	-.035 p=.80	-.725 p=.00	.610 p=.00	-.404 p=.00	-.565 p=.00	-.848 p=.00	.4962 p=.00	.704 p=.00	-.864 p=.00	-.475 p=.00	.358 p=.01	-.555 p=.00	1.000 p= ---									
C20:0	.121 p=.40	.522 p=.00	-.461 p=.00	.083 p=.56	.095 p=.51	.511 p=.00	-.292 p=.04	-.223 p=.12	.476 p=.00	.448 p=.00	-.173 p=.23	.668 p=.00	-.691 p=.00	1.000 p= ---								
C18:3 n3	.097 p=.50	.601 p=.00	-.381 p=.00	.509 p=.00	.671 p=.00	.900 p=.00	-.490 p=.00	-.730 p=.00	.977 p=0.0	.190 p=.19	-.661 p=.00	.322 p=.02	-.903 p=.00	.562 p=.00	1.000 p= ---							
C22:0	-.129 p=.37	-.414 p=.00	.358 p=.01	-.309 p=.03	-.444 p=.00	-.485 p=.00	.451 p=.00	.502 p=.00	-.648 p=.00	-.364 p=.01	.191 p=.18	.046 p=.75	.630 p=.00	-.323 p=.02	-.655 p=.00	1.000 p= ---						
C20:4 n6	.008 p=.95	.623 p=.00	-.516 p=.00	.183 p=.20	.295 p=.04	.734 p=.00	-.395 p=.00	-.538 p=.00	.652 p=.00	.433 p=.00	-.415 p=.00	.751 p=.00	-.808 p=.00	.695 p=.00	.707 p=.00	-.191 p=.18	1.000 p= ---					
C24:0	-.147 p=.31	-.160 p=.27	-.045 p=.75	-.254 p=.07	-.272 p=.05	-.330 p=.02	.307 p=.03	.174 p=.23	-.430 p=.00	-.296 p=.03	.266 p=.06	.294 p=.04	.249 p=.08	-.101 p=.48	-.395 p=.00	.492 p=.00	-.191 p=.18	1.000 p= ---				
Saturados	-.021 p=.88	.700 p=.00	-.425 p=.00	.531 p=.00	.698 p=.00	.913 p=0.0	-.475 p=.00	-.747 p=.00	.989 p=0.0	.242 p=.09	-.634 p=.00	.351 p=.01	-.919 p=0.0	.573 p=.00	.981 p=0.0	-.640 p=.00	.730 p=.00	-.395 p=.00	1.000 p= ---			
Insaturados	.118 p=.41	-.764 p=.00	.598 p=.00	-.388 p=.00	-.561 p=.00	-.843 p=.00	.483 p=.00	.728 p=.00	-.858 p=.00	-.367 p=.00	.481 p=.00	-.638 p=.00	.965 p=0.0	-.663 p=.00	-.878 p=.00	.544 p=.00	-.841 p=.00	.195 p=.17	-.911 p=0.0	1.000 p= ---		
Monoinsaturados	.128 p=.38	-.243 p=.09	-.077 p=.59	-.309 p=.03	-.414 p=.00	-.563 p=.00	.245 p=.08	.464 p=.00	-.654 p=.00	.442 p=.00	.996 p=0.0	-.170 p=.24	.331 p=.02	-.180 p=.21	-.631 p=.00	.165 p=.25	-.414 p=.00	.251 p=.08	-.604 p=.00	.461 p=.00	1.000 p= ---	
Poli-insaturados	.031 p=.83	-.661 p=.00	.715 p=.00	-.198 p=.17	-.314 p=.02	-.516 p=.00	.351 p=.01	.465 p=.00	-.469 p=.00	-.729 p=.00	-.194 p=.18	-.577 p=.00	.822 p=.00	-.601 p=.00	-.508 p=.00	.482 p=.00	-.624 p=.00	.035 p=.81	-.564 p=.00	.764 p=.00	-.218 p=.13	1.000 p= ---

4.5 Análise de componentes principais (PCA)

Para uma análise exploratória, do conjunto de dados apresentados neste capítulo, foi utilizada a análise multivariada de componentes principais (PCA). Nesta análise foram incluídos todos os parâmetros químicos e climáticos (umidade relativa, insolação e temperatura) a fim de investigar associações entre dia de coleta, localização e influência do clima na composição química do pólen apícola de *Eucalyptus sp.*

A Figura 4 apresenta o conjunto de dados investigado na análise de componentes principais.

Figura 4. Scatter plot, baseado na análise de componentes principais, das amostras de pólen apícola coletadas em diferentes apiários (A) e os factor loadings (B).

A Figura 4-A apresenta a projeção dos dois componentes principais (PC1 x PC2), composta por 1078 dados, na qual explicou 65% da variabilidade total dos dados experimentais, o que torna significativo esse estudo já que trata-se de avaliação de fatores climáticos.

Como pode-se observar no gráfico de PCA (Figura 4-B), o fator localização não foi um determinante na composição de ácidos graxos e fitoesteróis, visto que não houve similaridades ou conjuntos de dados de mesmo local de produção. O fator temperatura apresentou associação com a presença de sitoesterol, estigmasterol e com os ácidos graxos C22:00 e C24:00. Não foram observadas outras associações importantes relativas a temperatura.

O fator umidade relativa foi associado à presença de ácidos graxos poli-insaturados, resultado este, que corrobora a análise de correlação apresentada anteriormente. Além disso a umidade relativa está associada a maior presença de ácidos graxos insaturados e C18:2c n6.

Conforme apresentado na Figura 4-A, formou-se um agrupamento no quadrante superior-direito caracterizado pelo dia de coleta E, este pode ser explicado tanto pela associação com a umidade relativa como pela presença de maiores quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, ácidos graxos insaturados e C18:2c n6. De maneira oposta, o fator insolação está inversamente associado com os fatores acima mencionados, visto que, a insolação está localizada no quadrante inferior-esquerdo, resultado que também corrobora com o estudo de correlação. Assim, pode-se dizer que quanto maior a insolação, menor é a presença de AGPI, AGI e ácido graxo linoleico (C18:2c n6).

Assim este modelo exploratório e experimental apesar de envolver diversos fatores ambientais interferentes, pode servir de base para trabalho futuros, avaliando o impacto da mudança e variação climática na produção e qualidade de produtos apícolas.

5 Conclusões

O pólen apícola de *Eucalyptus sp.* é a principal fonte botânica de produção de pólen apícola no Brasil, onde a partir das análises propostas apresentou quantidades variáveis tanto de ácidos graxos como de fitoesteróis. Apesar do PA apresentar baixo teor de lipídios os componentes majoritários são os AGPIs (>50 %) que possuem benefícios a saúde comprovados relacionados ao seu consumo. A partir dos dados de fitoesteróis levantados, se abre uma nova perspectiva em relação ao potencial do PA como alimento funcional, visto que foram encontradas quantidades consideráveis destes.

Foram encontradas variações na composição relacionadas ao dia de coleta, porém a localização não foi um determinante na composição. Os resultados mostram que alguns fatores climáticos - umidade relativa e insolação - apresentaram influência na composição de ácidos graxos e fitoesteróis das amostras de pólen apícola de *Eucalyptus sp.*

6 Referências

- ALMEIDA, C.A.S. Avaliação dos principais fitoesteróis em óleos vegetais e azeite. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. [Dissertação] p.89, 2009.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Arlington, Official Method. n.996.06, cap.41, p.20-24A, 2002.
- BASTOS, D.H.M.; BARTH, O.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S.; MICHELAN, M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais , Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.43, n.2, p.35–39, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001.
- EFSA (European Food Safety Authority) panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA). (2008). Scientific substantiation of a health claim related to plant stanol esters and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC). Nº 1924/2006. The EFSA Journal (vol. 825, pp. 1–13).
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.
- GRANATO, D.; CALADO, V. M. A. & JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Research International*, v.55, p.137-149, 2014.
- GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v.72, p.83-90, 2018.
- IRITI, M.; DI MARO, A.; BERNASCONI, S.; BURLINI, N.; SIMONETTI, P.; PICCHI, V.; PANIGADA, C.; GEROSA, G.; PARENTE, A.; FAORO, F.

- Nutritional traits of bean (*phaseolus vulgaris*) seeds from plants chronically exposed to ozone pollution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.1, p.201–208, 2009.
- KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAŻMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1–6, 2015.
- LOPATEGI, A.; LÓPEZ-VICARIO, C.; ALCARAZ-QUILES, J.; GARCÍA-ALONSO, V.; RIUS, B.; TITOS, E.; CLÀRIA, J. Role of bioactive lipid mediators in obese adipose tissue inflammation and endocrine dysfunction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.419, n.5, p.44–59, 2016.
- LOPES, J.; STANCIU, O.G.; CAMPOS, M.G.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MARGHITAS, L.A. Bee pollen antioxidant activity - a review : achievements and further challenges. **Journal of Pharmacognosy**, v.2, n.2, p.25-38, 2011.
- MANNING, R. Fatty acid composition of pollen and the effect of two dominant fatty acids (linoleic and oleic) in pollen and flour diets on longevity and nutritional composition of honey bees (*Apis mellifera*). Perth: Murdoch University. [Thesis] p. 198, 2006.
- MĂRGĂOAN, R.; MĂRGHITAȘ, L.A.; DEZMIREAN, D.S.; DULF, F.V.; BUNEA, A.; SOCACI, S.A.; BOBIȘ, O. Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee-collected pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.27, p.6306–6316, 2014.
- NAEEMI ED, AHMAD N, AL SHARRAH TK, BEHBAHANI M. Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. **J AOAC Int** 1995;78:1522–5.
- NAGAO, K.; YANAGITA, T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. **Progress in Lipid Research**, n.47, v.2, p.127–146, 2008.
- PERCIE DU SERT, P. Les pollens apicoles. **Phytothérapie**, v.7, p.75–82, 2009.
- SATTTLER, J.A.G.; MELO, I.L.P.; GRANATO, D.; ARAÚJO, E.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; SATTTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**, v.77, n.2,

p.82–91, 2015.

SINGER, S. D.; ZOU, J.; WESELAKE, R. J. Abiotic factors influence plant storage lipid accumulation and composition. **Plant Science**, v. 243, p. 1–9, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.11.003>>.

WONG, A. Chemical and microbiological considerations of phytosterols and their relative efficacies in functional foods for the lowering of serum cholesterol levels in humans: A review. **Journal of Functional Foods**, v.6, p.60-67, 2014.

ZHONG, D.; DU, H.; WANG, Z.; HUANG, B. Genotypic variation in fatty acid composition and unsaturation levels in bermudagrass associated with leaf dehydration tolerance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.136, n.1, p.35–40, 2011.

CAPÍTULO IV

Avaliação do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus* sp. sobre parâmetros bioquímicos e inflamatórios em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.

Resumo

Os compostos fenólicos vêm sendo extensivamente estudados quanto as suas propriedades em doenças metabólicas. Doenças com grande incidência na população como a obesidade, resistência à insulina, diabetes, hipertrigliceridemia e desordens hepáticas geram no organismo quadros crônicos de estresse oxidativo e de inflamação. Os estudos têm mostrado que o pólen apícola (PA) é uma fonte de bioativos, especialmente os compostos fenólicos, porém existe uma escassez de dados a respeito dos seus efeitos biológicos. Este estudo teve por objetivo a avaliação do potencial antioxidante e anti-inflamatório *in vivo* de PA de *Eucalyptus* sp. (PA-EU), utilizando camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Na amostra de PA-EU que foi incorporada a ração foram identificados, por cromatografia líquida, três compostos fenólicos majoritários (rutina, 3n-tris-*p*-feruloil-espermidina e miricetina). Foram utilizados 70 camundongos (C57BL/6), distribuídos em sete grupos (n=10): Controle normolipídico (NL); Controle hiperlipídico (HL); Dieta NL com 5 % de PA; Dieta HL com 2,5 % de PA; Dieta HL com 5% de PA; Dieta HL com extrato hidro-alcóolico de PA (EPA) a 2,5 %; e Dieta HL com EPA a 5 %. Após 10 semanas, os animais foram eutanasiados e coletados sangue e tecidos (fígado e adiposos). Os animais que receberam dieta HL consumiram menos ração, porém ganharam mais peso, além de aumentar a glicose, colesterol total, HDL- e LDL-colesterol no soro, quando comparados ao grupo com dieta NL (p<0,05). De uma forma geral, o consumo de PA não influenciou na melhora

destes parâmetros bioquímicos. Não foram observadas alterações na capacidade antioxidante, na produção de espécies reativas e nem na atividade das enzimas antioxidantes no fígado dos animais. Entretanto, foi observado um aumento significativo de glutathione reduzida (GSH) em todos os grupos que receberam PA. Quanto aos parâmetros inflamatórios os grupos HL+PA2,5 % e HL+PA5 % reduziram os níveis das citocinas IL1- β , IL-6 e MCP-1 ($p < 0,05$) e TNF- α apenas o grupo HL+PA5 % apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$). Assim, estes resultados mostraram um efeito importante do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* no perfil inflamatório, visto que ocorreu uma diminuição nos níveis presentes no tecido hepático dos animais.

Palavras-chaves: Pólen Apícola de *Eucalyptus sp.*, compostos fenólicos, capacidade antioxidante, potencial anti-inflamatório.

1 Introdução

O pólen apícola (PA) é dos produtos da colmeia (incluindo também própolis, mel e geleia real) que vem despertando interesse na literatura científica devido a sua composição nutricional e à presença de compostos bioativos (LOPES et al., 2011; RZEPECKA-STOJKO et al., 2015). Diversos trabalhos mostraram a presença de quantidades consideráveis de vitaminas antioxidantes (C, E e carotenoides) e do complexo B (B¹, B², B³, B⁶), ácidos graxos poli-insaturados, fitoesteróis e compostos fenólicos, incluindo flavonoides; estando primariamente relacionados a origem botânica do PA (BASTOS et al., 2004; MELO et al., 2009; PERCIE DU SERT, 2009; ARRUDA et al., 2013ab; DE-MELO, 2015; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015; SATTLER et al., 2015).

Os compostos fenólicos são substâncias derivadas do metabolismo secundários das plantas, sendo amplamente distribuídos na natureza e divididos em diversas classes: ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico), flavonoides (flavonois, flavonas, flavanois, flavanonas, isoflavonas e proantocianidinas), estilbenos e ligninas (GHARRAS, 2009).

Dentre as funções relacionadas a estes compostos estão as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antineoplásica, antimutagênica e imunomodulatória, sendo consenso na literatura que a inclusão destes na dieta pode trazer benefícios a saúde, prevenindo e/ou atenuando o quadro inflamatório e de estresse oxidativo crônico ocasionado pela obesidade, assim como o aparecimento subsequente de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015).

Diversos ácidos fenólicos e flavonoides foram identificados em pólen apícola, porém a avaliação deste em modelos *in vivo* foi pouco avaliada. O potencial antialérgico do PA de *Eucalyptus sp.* foi investigado por Medeiros et al. (2008), utilizando modelo de indução de edema de pata em camundongos sensibilizados com ovo-albumina (efeito alérgico). Após a avaliação de diversos parâmetros relacionados a um quadro alérgico, tais como IgE, IgG1, migração celular pulmonar e atividade da peroxidase eosinofílica (EPO), foi possível verificar que o PA de *Eucalyptus sp.* e o seu principal componente - miricetina

(flavonoide), foi capaz de atuar como um potente antialérgico diminuindo o tamanho do edema, a produção de IgE e IgG1 e a EPO.

O efeito antioxidante do extrato aquoso de PA de *Brassica napus L.* foi avaliado por Eraslan et al. (2009) em modelo de estresse oxidativo induzido pela administração de Carbaril, um agrotóxico comumente utilizado na agricultura. Os resultados mostraram que a administração de extrato de PA na maior dose (100 mg/kg de peso) foi capaz de atenuar o estresse oxidativo pelo aumento das enzimas antioxidantes (SOD e catalase) e da glutathione (GSH) em diferentes órgãos (incluindo o fígado), além da redução da produção de MDA nos mesmos tecidos.

O efeito anti-inflamatório do pólen apícola de *Cistus sp.* foi avaliado por Maruyama (2010) onde três formas de administração foram utilizadas: pólen bruto, extrato aquoso e extrato etanólico; em modelo de indução de edema de pata por carragenina (agente inflamatório). O pólen bruto suprimiu levemente os efeitos inflamatórios, enquanto o extrato etanólico mostrou importante redução da produção de óxido nítrico (NO) e cicloxigenase 2 (COX-2), os quais são sinalizadores de estresse oxidativo e de inflamação, respectivamente. Os flavonoides foram isolados e purificados a partir do extrato etanólico de PA, onde foram identificados pelo menos cinco flavonoides e seus glicosídeos: quercetina-7-ramnosídeo, campferol-3-glicosídeo, isoramnetina, campferol e quercetina.

Cheng et al. (2013) mostraram que a administração de extrato de PA proveniente da planta *Schisandra chinensis* foi eficaz na prevenção de dano hepático induzido por CCl₄ em ratos (estresse oxidativo agudo). De acordo com os resultados deste estudo, os compostos mais abundantes nestas amostras de PA foram os flavonoides (quercetina, galangina, hesperetina, resveratrol e campferol); os quais foram relacionados à prevenção do aumento das aminotransferases sérica e do malonaldeído (MDA) hepático, bem como um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx).

Nos estudos de Arruda (2013), Sattler (2013) e De-Melo (2015) ficou evidenciado a predominância da espécie botânica *Eucalyptus sp.* em amostras de PA das regiões sudeste e sul do Brasil, além disso, este tipo de PA apresentou maior quantidade de fenólicos e flavonoides totais, assim como maior atividade antioxidante *in vitro*.

Levando-se em conta a escassez de dados a respeito dos efeitos biológicos do pólen apícola de *Eucalyptus* sp. (PA-EU), este estudo teve por objetivo a avaliação do potencial antioxidante e anti-inflamatório *in vivo* deste alimento, utilizando modelo animal submetido à dieta hiperlipídica.

2 Objetivos

2.1 Caracterizar quimicamente o pólen apícola de *Eucalyptus* sp. (PA-EU) e avaliar *in vitro* a atividade antioxidante.

2.2 Avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatório de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. (PA-EU) em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica.

3 Material e métodos

3.1 Obtenção e caracterização química da amostra de PA e das dietas

A amostra de pólen apícola (PA) produzida por abelhas *Apis mellifera* foi coletada em apiário localizado no município de São Mateus no Estado do Espírito Santo, sendo processada (desidratada) no próprio local e posteriormente enviada ao Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), sob-refrigeração. Primeiramente, foi realizada a avaliação da origem botânica da amostra (análise polínica), conforme método descrito por Barth et al. (2010) e já detalhado no capítulo II (item 2.3), sendo confirmada a predominância (>99 %) de *Eucalyptus* sp. A amostra de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. (PA-EU) foi então triturada em moinho analítico (modelo IKA A11 basic, Wilmington, USA) e mantida em freezer (-20 °C) até análises posteriores.

As sete dietas (rações) foram fabricadas pela empresa Prag Soluções (Prag Soluções, Jaú, SP, Brasil; www.pragsolucoes.com.br), sendo a dieta normolipídica (NL) preparada de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para animais adultos (AIN-93M) e a dieta hiperlipídica (HL) adaptada da formulação AIN-93M, contendo 58 % de lipídios e tendo a banha como a principal fonte de lipídios. Foram fabricadas também rações NL com

incorporação de PA e HL com incorporação de PA e de extrato de PA em duas concentrações. Os laudos das rações estão apresentados na Tabela 1.

A etapa inicial envolveu a caracterização química da amostra de PA-*EU* e das rações produzidas, sendo realizadas as análises de quantificação dos compostos fenólicos totais (incluindo flavonoides) e avaliação da capacidade antioxidante por duas técnicas diferentes (ORAC e DPPH), conforme métodos apresentados no capítulo II (itens 3.6 a 3.10). Em seguida, foi também avaliado o perfil dos compostos fenólicos presentes no PA-*EU* e nas rações, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) nas seguintes condições: coluna C18 de fase reversa (MERCK LICHROSPHER 100RP 18E, 250 mm/4,6 mm; 5 µm) e pré-coluna Purospher RP-18E (4x4 mm; 5 µm), operadas a temperatura de 25 °C; fase móvel composta por água acidificada com ácido fórmico a 5 % (A) e metanol (B), com gradiente crescente até 100 %B, no fluxo de 0,8 mL/min (RUBILAR et al., 2007; DE-MELO, 2015). Os compostos fenólicos foram detectados por varredura entre 240 e 400 nm e quantificados conforme o comprimento de onda mais adequado para cada composto utilizando uma curva padrão correspondente. Os polifenóis foram identificados através da comparação dos analitos com os respectivos tempos de retenção e espectros UV-Vis dos respectivos padrões (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em mg/g de amostra. Os principais fenólicos encontrados no PA-*EU* foram confirmados por Espectrometria de Massas (CLAE-EM), conforme metodologia descrita por (DALEPRANE et al., 2012).

Além disso, foi realizada a determinação de lipídios totais (extrator intermitente de Soxhlet) nas amostras (PA-*EU* e rações), conforme metodologia padronizada por Almeida-Muradian et al. (2015); e o perfil de ácidos graxos foi confirmado por cromatografia gasosa, de acordo com a metodologia apresentada no capítulo III (item 3.1).

Tabela 1. Laudo das rações produzidas pela empresa Prag Soluções.

Ingredientes	Quantidade (%)						
	NL	HL	NL+ PA5%	HL+ PA2,5%	HL+ PA5%	HL+ EPA2,5%	HL+ EPA5%
Amido de milho	46,57	14,95	41,57	12,45	9,95	12,45	9,95
Caseína	14,0	20,0	14,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Amido dextrinizado	15,5	11,0	15,5	11,0	11,0	11,0	11,0
Sacarose	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Banha	-	30,0	-	30,0	30,0	30,0	30,0
Celulose microcristalina	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mix mineral AIN 93G	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix Vitamina AIN 93	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina	0,18	0,3	0,18	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT	0,0008	0,0028	0,0008	0,0028	0,0028	0,0028	0,0028
PA (g)*	-	-	5,0	2,5	5,0	-	-
Extrato de PA (mL)**	-	-	-	-	-	2,5	5,0

Legenda: BHT= hidroxitoluenobutilado; PA= pólen apícola. NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA 5% - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + PA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA 5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*As doses escolhidas se basearam nos artigos de Kolesarova *et al.* (2013) e Yildizet *et al.* (2013) onde foram utilizadas respectivamente doses de 6 e 12 mg/dia e de 12 e 20 mg/dia de PA para ratos, sendo extrapoladas para peso e consumo de camundongos da linhagem C57BL/6.

**Os grupos HL + EPA2,5 % e HL + EPA5 % tiveram seus extratos calculados para incorporação na ração a partir da concentração de compostos fenólicos totais presentes em 2,5 g e 5,0 g de PA desidratado, assim foi administrado quantidades proporcionais de compostos fenólicos totais para todos os grupos que recebam PA sendo possível a comparação entre os diferentes tratamentos.

3.2 Ensaio biológico

O ensaio com animais foi realizado de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (Protocolo CEUA/FCF/499, Anexo 1) da FCF/USP. Foram utilizados 70 camundongos machos da linhagem C57BL/6, apresentando em média 2,5 meses (75 dias) de idade, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da FCF e do Instituto de Química/USP. Os animais foram distribuídos, de acordo com o peso inicial (de

forma que as médias de peso entre os grupos fossem as mesmas), em sete grupos (n=10) conforme mostrado na Figura 1; sendo mantidos em gaiolas de plástico (5 animais em cada) em uma sala com temperatura e umidade controladas e fotoperíodo (claro/escuro) de 12 horas, recebendo dieta e água *ad libitum* durante todo o período experimental. O consumo alimentar e o ganho de peso corporal foram monitorados duas vezes por semana, durante todo o período experimental.

Figura 1. Desenho experimental do ensaio biológico.

(TOTG - Teste oral de tolerância a glicose; PA - Pólen apícola)

Na 9ª semana (após 60 dias de intervenção) foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Após serem submetidos a oito horas de jejum, os animais tiveram a glicemia medida (tempo 0). Em seguida, receberam uma solução de glicose (Sigma G5767), na concentração de dois gramas por quilo de peso corpóreo, via intragástrica. A glicose sanguínea foi então medida nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose; através da coleta de uma gota de sangue pela veia caudal, com o auxílio de um glicosímetro (AccuCheck Performa, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha). A

concentração de glicose versus tempo foram plotados e a área sob a curva (AUC) calculada para cada animal.

Ao final da 10^a semana (70 dias de intervenção), após jejum de 8 horas, os animais foram anestesiados (cetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg) por via intraperitoneal e em seguida eutanasiados. Foram coletados o sangue, por punção submandibular, os coxins adiposos (retroperitonal e epididimal) e os tecidos hepático, renal, cerebral e cardíaco, que foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O sangue foi centrifugado a 1200 g durante 15 minutos (4 °C) e, o soro obtido, assim como os tecidos, foram armazenados a – 80 °C até o momento das análises.

3.2.1 Parâmetros Bioquímicos no soro

Foram avaliados os parâmetros glicose (G), triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e frações (HDLc - *High Density Lipoprotein* e LDLc – *Low Density Lipoprotein*), atividade das enzimas alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases, fosfatase alcalina (FAL) e as proteínas totais (PT). Todos esses parâmetros foram quantificados no soro utilizando kits comerciais validados (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil) em um analisador bioquímico automático (Labmax 240).

3.2.2 Marcadores de função hepática

O tecido hepático dos animais foi pesado e homogeneizado, em homogeneizador tipo ultra-turrax (modelo T10 basic, marca IKA), com um volume de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra pesada. A solução foi então centrifugada a 38.000 g por 30 minutos à temperatura de 4 °C, e sobrenadante gerado foi mantido em microtubos *Eppendorf*, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a –80 °C até o momento das análises.

A determinação do conteúdo de proteínas dos homogeneizados foi realizada segundo o método de Bradford (1985), obtendo-se as leituras no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Rochester, USA). A quantidade de proteína das amostras foi

calculada a partir da curva-padrão utilizando albumina de soro bovino (Sigma A4503) sendo utilizada para expressar os resultados obtidos nas análises descritas a seguir.

A capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC) foi medida conforme método descrito por Prior et al. (2003). Em uma placa de 96 poços, uma alíquota de 25 µL do homogeneizado diluído foi misturado com de uma solução de fluoresceína (40 nM) e incubados a uma temperatura de 37 °C por 30 minutos antes da adição de 25 µL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (153 mM), que deu início à reação. A intensidade de fluorescência foi verificada a cada um minuto durante uma hora, em leitor de placas (Synergy H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA), excitação em 493nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20). A capacidade antioxidante foi determinada pela equação de regressão entre uma curva padrão de Trolox (6,25-100 µM) e a área sob a curva de decaimento de fluoresceína (AUC), e os resultados expressos em milimolar de equivalentes de Trolox por mg de proteína (mM ET/mg PT).

A determinação da peroxidação lipídica no tecido hepático foi realizada por quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), com adaptações. Em microtubos, foram adicionadas 200 µL dos homogeneizados e 950 µL da solução de ácido tiobarbitúrico (0,32 %) diluída em ácido acético (20 % pH 3,5), os quais foram incubados em banho termostatzado a 85 °C durante uma hora. Em seguida, foram resfriados, adicionados 50 µL de dodecil sulfato de sódio (8,1 %) e centrifugado a 20300 g durante 15 minutos (4 °C). A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm e os dados expressos em nmol de TEP por mg de proteína, após utilização de uma curva padrão de 1,1',3,3'-Tetraetoxipropano - TEP (0,5–8,0 nmol).

O conteúdo de glutathiona (GSH) nos homogeneizados foi realizado segundo protocolo descrito por Tietze (1969), com adaptações. Os homogeneizados foram ressuspensos em solução de EDTA (10⁻³M) em ácido tricloroacético 5 %, centrifugado a 43000 g por 15 minutos (4 °C) e o sobrenadante coletado. Posteriormente, foi colocado em placa de 96 poços, 270 µL de tampão fosfato pH 7,0 e 20 µL do sobrenadante contendo GSH. Em seguida, adicionou-se 10 µL de DTNB (5 mM) dissolvido em etanol, agitou-se

por 15 segundos e a absorbância foi medida a 412 nm em leitor de placas (Synergy H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). A concentração de GSH foi quantificada utilizando uma curva padrão de GSH (50-800 μ M/Sigma G4251) e o resultado expresso em μ M GSH/mg PT.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) citoplasmática foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969), que quantifica o ânion superóxido produzido pela enzima xantina oxidase na presença da xantina. O ânion superóxido produzido oxida o citocromo C e esta oxidação é medida considerando o aumento da densidade ótica. Enquanto a determinação da atividade da catalase (CAT) foi realizada segundo a metodologia descrita por Beutler (1975), a qual se baseia na quantificação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima mediante a diminuição da densidade ótica. Já a atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), foram determinadas seguindo o método estabelecido por Sies (1979). Ambas, fundamentam-se na medição do decaimento da densidade ótica a 340 nm, promovido pela oxidação do NADPH durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) catalisada pela GR. A diferença é que, no meio de reação da GPx, além do NADPH, contém também GSH e GR. Todos os resultados foram expressos em unidade de enzima por miligrama de proteína (U/mg PT). Entende-se por uma unidade (U): SOD - atividade da enzima que promove 50 % de inibição da reação da xantina a 25 °C em pH 7,8; CAT - atividade da enzima que realiza a hidrólise de 1 μ M de H₂O₂ por minuto a 37 °C em pH 8,0; e, GPx e GR - atividade da enzima que oxida 1 μ M de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7,0.

3.2.3 Quantificação de citocinas inflamatórias no tecido hepático

Uma fração congelada do tecido hepático (100 mg) foi homogeneizada separadamente, com 1 mL de tampão RIPA pH 7,4 (0,625 % de Nonidet P-40, 0,625 % de desoxicolato de sódio, fosfato de sódio 6,25 mM e EDTA 1 mM), contendo 10 μ g/mL de um *cocktail* inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 g e 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. A determinação das citocinas interleucinas 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), da proteína quimiotática de

monócitos-1 (MCP-1) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi realizada através de imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando-se painel de *kit* comercial miliplex® (Cat. #MCYTOMAG-70K, Millipore), conforme indicação do fabricante. Os resultados foram corrigidos pela concentração de proteína utilizando-se o método de Bradford (1985) conforme descrito na metodologia do item 3.2.2 da metodologia.

3.3 Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada a análise de variância (one-way ANOVA), seguida do pós-teste Tukey, utilizando o software *GraphPad Prism* 5.0. Todas as análises foram feitas em triplicata e os dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com nível de significância de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Caracterização química da amostra de PA-EU e das rações

Os resultados de capacidade antioxidante e do perfil de compostos fenólicos da amostra de pólen apícola de *Eucalyptus sp.* (PA-EU) e das rações com PA-EU são apresentados na Tabela 2.

A avaliação da capacidade antioxidante da amostra de PA-EU mostrou o potencial antioxidante comparado aos dados apresentados no capítulo II para amostras da mesma espécie (*Eucalyptus sp.*), tanto para ORAC quanto para DPPH. A análise das rações mostrou uma proporcionalidade entre os grupos com inclusão de PA-EU nas duas concentrações (2,5 e 5 %), especialmente para o teor de fenólicos totais.

A partir da avaliação do perfil de fenólicos da amostra PA-EU por CLAE-UV foi possível a identificação de apenas dois compostos de maior concentração; miricetina e rutina, porém, quando posteriormente avaliado por CLAE-EM foram identificados oito compostos, sendo quatro de maior concentração, a quercetina-diglicosídeo, miricetina, rutina e n-n-n-tris-*p*-feruloil-espermidina.

A n-n-n-tris-*p*-feruloil-espermidina é um conjugado de poliamina com compostos fenólicos que faz parte de um grupo de substâncias bioativas com potencial antimicrobiano (BASSARD et al., 2010). A ocorrência de derivados de espermidina foi reportada em amostras de PA produzidas em Belgrado, Sérvia (MIHAJLOVIC et al., 2015) e em amostras de *Mimosa scabrella* produzidas em Mato Grosso, Brasil (DE-MELO, 2015).

Nas plantas, além das poliaminas livres, existem as poliaminas conjugadas a ácidos hidroxinâmicos (aminas de ácido-hidroxicinâmico (AAHs)) que são amplamente distribuídas em diversas espécies de plantas superiores (LUO et al., 2009), que são amplamente distribuídas em diversas espécies de plantas superiores (LUO et al., 2009). Estas AAHs estão envolvidas em diversos processos de crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo divisão celular, floração, resposta a estresse ambiental e fatores bióticos. Não foram encontrados trabalhos que avaliaram o potencial antioxidante e anti-inflamatório da n-n-n-tris-*p*-feruloil-espermidina em ensaios *in vitro* ou *in vivo*.

Outro componente identificado, a miricetina é um fenólico que apresenta estrutura relacionada com diversos outros como a quercetina, morina, campferol e fisetina. Este composto é algumas vezes referido como uma hidroxiquercetina devido a sua similaridade estrutural. As propriedades nutracêuticas e antioxidantes da miricetina são muito valorizadas, existindo evidências científicas sobre o seu potencial anti-inflamatório, analgésico, antitumoral, hepatoprotetor e antidiabético (SEMWAL et al., 2016).

Como pode ser visto na Tabela 2, um dos componentes encontrados em maior concentração no PA-EU foi a rutina também conhecida como quercetina-3-rutinosídeo. É classificada como um flavonol glicosídeo formado pelo flavonol quercetina e o dissacarídeo rutinose. A rutina apresenta propriedades sequestradoras de espécies oxidantes como o radical OH, radical superóxido e radical peroxil. Além disso ela apresenta diversas atividades biológicas, como antialérgica, anti-inflamatória, vasoativa, antitumoral, antibacteriana e antiviral. Associado ao exposto, alguns estudos demonstram o efeito hipolipidêmico e antidiabético da rutina (SHARMA et al., 2013).

Tabela 2. Capacidade antioxidante e compostos fenólicos da amostra de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. (PA-EU) e das rações as quais ela foi incorporada.

Análise	Amostra PA-EU	Rações**						
		NL	HL	NL + PA5%	HL + PA2,5%	HL + PA5%	HL + EPA2,5%	HL + EPA5%
ORAC ($\mu\text{M ET/g}$)	518 $\pm$ 50	6,4 $\pm$ 1,5 ^b	7,7 $\pm$ 0,1 ^b	29 $\pm$ 0,2 ^a	21 $\pm$ 5,1 ^{ab}	31 $\pm$ 5,2 ^a	21 $\pm$ 2,5 ^{ab}	33 $\pm$ 7,3 ^a
DPPH• (EC ₅₀ mg/mL)*	0,42 $\pm$ 0,00	152 $\pm$ 63 ^b	704 $\pm$ 292 ^a	17 $\pm$ 0,62 ^b	26 $\pm$ 1,0 ^b	17 $\pm$ 0,33 ^b	22 $\pm$ 0,84 ^b	16 $\pm$ 0,10 ^b
FT (mg EAG/g)	32 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 0,0 ^d	0,5 $\pm$ 0,0 ^d	2,2 $\pm$ 0,0 ^a	1,2 $\pm$ 0,1 ^c	2,0 $\pm$ 0,0 ^b	1,3 $\pm$ 0,1 ^c	1,9 $\pm$ 0,0 ^b
FVT (mg EC/g)	3,9 $\pm$ 0,2	0,00 $\pm$ 0,00 ^d	0,00 $\pm$ 0,00 ^d	0,06 $\pm$ 0,01 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^d	0,06 $\pm$ 0,01 ^b	0,02 $\pm$ 0,00 ^c	0,10 $\pm$ 0,01 ^a

Perfil de compostos fenólicos (mg/g)

Quercetina diglicosídeo	0,23 $\pm$ 0,02	-	-	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Quercetina 3-o-glicosil-6-o-pentosídeo	0,09 $\pm$ 0,007	-	-	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Isoramnetina 3-o-ramnosil-glicosídeo	0,06 $\pm$ 0,002	-	-	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Miricetina	1,33 $\pm$ 0,03	-	-	0,03	0,02	0,04	0,01	0,04
Rutina	5,71 $\pm$ 0,29	-	-	0,18	0,09	0,18	0,08	0,18
Quercetina	0,10 $\pm$ 0,008	-	-	0,01	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Campferol	0,41 $\pm$ 0,02	-	-	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,01
n-n-n-tris-p-feruloil-espermidina	3,99 $\pm$ 0,2	-	-	0,17	0,06	0,18	0,08	0,16
Totais (CLAE)	11,93 $\pm$ 0,59	-	-	0,35	0,17	0,36	0,14	0,40

ORAC= capacidade de absorção dos radicais oxigenados; ET= equivalente de Trolox; FT= fenólicos totais; EAG= equivalente de ácido gálico; FVT= flavonoides totais; EC= equivalente de catequina. NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA 5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + PA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), com resultados expressos em EC₅₀ [concentração de amostra (mg/mL) necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH•]. Assim, quanto menor o valor de EC₅₀, maior é a capacidade antioxidante dos compostos da amostra.

**Letras diferentes na mesma linha representam significância (p<0,05; ANOVA one-way).

Na Figura 2 estão apresentados os cromatogramas representativos da amostra (a) e dos padrões (b) que foram quantificados por CLAE-UV, assim como o cromatograma da amostra (c) identificando os picos encontrados na espectrometria de massas (CLAE-EM). Nesta figura também pode ser visualizados os espectros de massas identificando os picos base (1 a 8) encontrados e fragmentos (d).

a. Cromatograma do PA-EU (CLAE-UV).

b. Cromatograma dos padrões (CLAE-UV).

c. Cromatograma do PA-EU (CLAE-EM).

Figura 2. Cromatogramas (CLAE-UV e -EM) e espectros de massas dos compostos fenólicos majoritários presentes na amostra de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. (PA-EU).

CLAE-UV = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta visível, -EM = acoplado a espectro de massas; $[M^+]$ = íon molecular, $[MS^{2+}]$ = fragmentos de íons. Picos: **1** (Quercetina-diglicosídeo), **2** (Quercetina-3-o-glicosil-6-o-pentosídeo), **3** (Isoramnetina-3-o-ramnosil-glicosídeo), **4** (miricetina), **5** (rutina), **6** (quercetina), **7** (campferol) e **8** (n-n-n-tris-p-feruloil-espermidina).

Os resultados da composição de ácidos graxos das amostras de PA-EU e das rações estão apresentados na tabela 3. Pode-se verificar que a quantidade de AGS, AGMI e AGPI não apresentaram diferença significativa entre os grupos HL.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos da amostra de pólen apícola de *Eucalyptus* sp. (PA-EU) e das rações as quais ela foi incorporada.

Análise	Amostra PA-EU	Rações**						
		NL	HL	NL + PA5%	HL + PA2,5%	HL + PA5%	HL + EPA2,5%	HL + EPA5%
LT (Soxhlet; %)	1,8 ± 0,1	4,1 ± 0,1 ^d	33 ± 0,2 ^b	4,3 ± 0,1 ^d	34 ± 0,1 ^{ac}	34 ± 0,5 ^{bc}	34 ± 0,0 ^a	33 ± 0,0 ^b
LT (Folch; %)*	1,4 ± 0,7	3,4 ± 0,4 ^b	23 ± 3,0 ^a	4,1 ± 0,1 ^b	20 ± 1,6 ^a	20 ± 2,0 ^a	18 ± 0,9 ^a	19 ± 2,3 ^a
Perfil de ácidos graxos (%)								
C14:0	-	-	1,2 ± 0,0	-	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,0
C14:1	1,0 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-
C16:0	22 ± 1,7	16 ± 1,3	21 ± 0,0	14 ± 1,0	22 ± 0,2	22 ± 0,1	22 ± 0,2	21 ± 0,1
C16:1	-	-	1,4 ± 0,0	-	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,0
C18:0	3,7 ± 0,3	5,4 ± 0,2	16 ± 0,1	4,5 ± 0,2	15 ± 0,2	15 ± 0,2	16 ± 0,3	16 ± 0,1
C18:1c n-9	9,8 ± 1,2	21 ± 1,7	35 ± 0,4	22 ± 1,6	36 ± 1,6	35 ± 0,2	35 ± 0,2	35 ± 0,2
C18:2t	1,1 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	-
C18:2c n-6	24 ± 3,7	48 ± 0,5	21 ± 0,3	50 ± 0,1	21 ± 0,3	21 ± 0,2	21 ± 0,2	21 ± 0,1
C20:0	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	-	0,6 ± 0,1	-	-	-	-
C20:1	-	-	0,6 ± 0,0	-	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
C18:3c n-3	16 ± 3,1	5,8 ± 0,4	1,5 ± 0,1	6,0 ± 0,3	1,6 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,0
ΣNI	9,5 ± 3,7	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,2	3,3 ± 0,6	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,2
Saturados	38 ± 3,3	23 ± 1,6 ^b	38 ± 0,1 ^a	19 ± 1,4 ^c	38 ± 0,5 ^a	38 ± 0,3 ^a	38 ± 0,6 ^a	38 ± 0,3 ^a
AGMI	11 ± 0,8	21 ± 1,7 ^b	37 ± 0,4 ^a	22 ± 1,6 ^b	38 ± 1,7 ^a	37 ± 0,3 ^a	37 ± 0,3 ^a	37 ± 0,3 ^a
AGPI	41 ± 6,2	54 ± 0,9 ^b	22 ± 0,3 ^c	56 ± 0,3 ^a	22 ± 0,3 ^c	22 ± 0,3 ^c	22 ± 0,3 ^c	22 ± 0,1 ^c
Razão n-6/n-3	1,5	8,2	14	8,4	13	13	12	13

ORAC= capacidade de absorção dos radicais oxigenados; ET= equivalente de Trolox; FT= fenólicos totais; EAG= equivalente de ácido gálico; FVT= flavonoides totais; EC= equivalente de catequina. NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + PA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Lípídeos totais extraídos segundo o método de Folch, Lee e Stanley (1957) e utilizado para a análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa.

**Letras diferentes na mesma linha representam significância (p<0,05; ANOVA one-way).

4.2 Ensaio biológico

A influência do PA-EU e EPA-EU sobre o ganho de peso foi avaliada em camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta hiperlipídica (HL) suplementada com 2,5 % e 5 % de PA-EU ou 2,5 % e 5 % de EPA-EU. A Tabela 4 mostra que os camundongos alimentados com PA e EPA apresentaram peso corporal igual ao controle HL após 10 semanas. Já os animais que receberam a dieta normolipídica (NL) e normolipídica com pólen apícola (NL+PA5 %), apresentaram maior ingestão alimentar quando comparados aos grupos HL, porém, devido a densidade calórica dos grupos NLS ser menor, o consumo calórico de todos os grupos foi igual. Importante ressaltar que os grupos HL+PA e HL+EPA, independente da concentração, não exerceram influência sobre o padrão de consumo de ração, quando comparado ao grupo HL.

Tabela 4. Peso corpóreo e consumo alimentar dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)*	Consumo médio de ração (g/dia)*	Consumo médio calórico (cal/dia)
NL	27 ± 2,3	30 ± 2,8	2,5 ± 1,5 ^b	3,4 ± 0,15 ^a	13
HL	27 ± 2,3	42 ± 4,5	15 ± 3,1 ^a	2,7 ± 0,16 ^b	14
NL + PA5%	29 ± 1,1	34 ± 2,7	5,5 ± 2,5 ^b	3,7 ± 0,06 ^a	14
HL + PA2,5%	26 ± 1,6	42 ± 4,7	16 ± 4,0 ^a	2,5 ± 0,04 ^b	13
HL + PA5%	27 ± 2,5	40 ± 4,3	13 ± 3,1 ^a	2,5 ± 0,14 ^b	13
HL + EPA2,5%	27 ± 1,7	44 ± 3,3	17 ± 3,2 ^a	2,8 ± 0,11 ^b	15
HL + EPA5%	26 ± 2,3	42 ± 3,9	16 ± 2,3 ^a	2,7 ± 0,04 ^b	14

NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de pólen apícola (PA); HL + PA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Letras diferentes na mesma coluna representam significância (p<0,05; ANOVA one-way).

Como apresentado na Tabela 4, o consumo da dieta hiperlipídica permitiu maior ganho de peso corporal aos animais dos grupos HL e, consequente, acúmulo de gordura nos coxins adiposos epididimal e retroperitoneal (Figura 3). Na Tabela 5 estão apresentados os pesos dos tecidos coletados (adiposos, hepático, renal, cardíaco e cerebral). Houve diferença significativa entre os grupos NL e HL apenas para os coxins adiposos (epididimal e retroperitoneal). Contudo, não houve alterações no peso desses tecidos com a incorporação de PA-EU e EPA-EU, quando comparados ao grupo HL.

a. Camundongos C57BL/6, NL (esquerda) e HL (direita).

b. Camundongos C57BL/6, NL (esquerda) e HL (direita).

c. Tecido hepático dos camundongos, NL (esquerda) e HL (direita).

d. Tecido adiposo dos camundongos, NL (esquerda) e HL (direita), Retroperitoneal (acima) e Epididimal (abaixo).

Figura 3. Imagens mostrando as diferenças clínicas e teciduais dos camundongos (C57BL/6) pertencentes aos grupos normo- e hiperlipídico.

Tabela 5. Peso dos tecidos dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.

Grupos	Peso dos tecidos (g)*					
	Retroperitonal*	Epididimal*	Fígado	Rins	Coração	Cérebro
NL	0,51 ± 0,09 ^b	1,0 ± 0,19 ^b	1,4 ± 0,10	0,64 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,73 ± 0,03
HL	0,99 ± 0,13 ^a	2,6 ± 0,36 ^a	1,6 ± 0,29	0,67 ± 0,06	0,45 ± 0,06	0,72 ± 0,03
NL+PA 5 %	0,66 ± 0,18 ^b	1,4 ± 0,41 ^b	1,6 ± 0,12	0,65 ± 0,03	0,46 ± 0,05	0,74 ± 0,05
HL+PA 2,5 %	0,95 ± 0,11 ^a	2,6 ± 0,22 ^a	1,6 ± 0,32	0,67 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,74 ± 0,06
HL+PA 5 %	0,90 ± 0,12 ^a	2,5 ± 0,41 ^a	1,5 ± 0,19	0,69 ± 0,07	0,46 ± 0,04	0,77 ± 0,08
HL+EHPA 2,5 %	0,93 ± 0,09 ^a	2,3 ± 0,46 ^a	1,8 ± 0,22	0,73 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,74 ± 0,03
HL+EHPA 5 %	0,93 ± 0,16 ^a	2,5 ± 0,43 ^a	1,5 ± 0,27	0,68 ± 0,05	0,45 ± 0,04	0,74 ± 0,06

NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de pólen apícola (PA); HL + PA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Letras diferentes na mesma coluna representam significância (p<0,05; ANOVA one-way).

4.2.1 Parâmetros bioquímicos do soro

A influência da dieta hiperlipídica sobre a tolerância à glicose foi avaliada pelo teste oral de tolerância a glicose (TOTG), realizado uma semana antes da eutanásia (10 semanas), assim como a glicemia de jejum após a eutanásia, e os resultados estão apresentados na Figura 4. Não foi observada diferença significativa na resposta glicêmica entre os grupos estudados.

Figura 4. Teste oral de tolerância a glicose (TOTG), realizado uma semana antes da eutanásia, e glicemia de jejum após a eutanásia, dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.

NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de pólen apícola (PA); HL + PA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio (n=10); Letras diferentes representam significância (p<0,05; ANOVA one-way).

Após 10 semanas de intervenção, também foram determinadas as concentrações de triglicerídeos, colesterol total e suas frações HDLc e LDLc (Figura 5), assim como as enzimas indicadoras da função hepática - ALT, AST e FAL, e as proteínas totais (Figura 6); todas medidas no soro dos animais após jejum de 8 horas. Não foram observadas alterações nas concentrações desses metabólitos com a dieta hiperlipídica quando comparada ao grupo NL e também quando comparados aos grupos HL com incorporação de pólen apícola de *Eucalyptus sp.* (PA-EU) e Extrato hidro-alcóolico de pólen apícola de *Eucalyptus sp.* (EPA-EU), independente da concentração.

Resultados descritos por Rzepecka-Stojko et al. (2017), demonstraram que camundongos (fêmeas) C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica e extrato de pólen apícola polifloral proveniente da Polônia (incorporado na ração), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos níveis de TG e HDL, quando comparados ao grupo hiperlipídico. No entanto, os autores observaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de LDL e CT,

entre os grupos suplementados com extrato de pólen e o grupo que recebeu somente dieta hiperlipídica.

Figura 5. Lipidograma sérico dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.

NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA 5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de pólen apícola (PA); HL + PA 2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA 5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA 2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL + EPA 5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio (n=10); Letras diferentes representam significância (p<0,05; ANOVA one-way).

Figura 6. Enzimas indicadoras da função hepática (ALT, AST e FAL) e proteínas totais séricas dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.

NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA 5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de pólen apícola (PA); HL + PA 2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA 5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA 2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL + EPA 5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio (n=10); Letras diferentes representam significância ($p < 0,05$; ANOVA one-way).

4.2.2 Marcadores de estresse oxidativo no tecido hepático

Os resultados da capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC), das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da quantidade de glutathiona reduzida (GSH) no tecido hepático dos animais estão apresentados na Figura 7. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos controles NL e HL para os três parâmetros avaliados. Consequentemente, não houve alteração nos resultados dos grupos intervenção quanto a análise de ORAC e TBARS. Porém, de forma interessante, pode-se observar um aumento significativo ($p < 0,05$) na GSH em todos os grupos que receberam PA, tanto na forma integral como de extrato. Os grupos NL + PA 5 % e HL + EPA 2,5 % apresentaram mais GSH ($p > 0,05$) em relação aos dois grupos controles (NL e HL), indicando um aumento da produção deste componente no sistema antioxidante dos animais.

Figura 7. Capacidade de absorção dos radicais de oxigênio (ORAC), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona (GSH) no tecido hepático dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.

NL – dieta normolipídica; HL – dieta hiperlipídica; NL + PA5 % - dieta normolipídica com incorporação de 5 % de pólen apícola (PA); HL + PA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de PA; HL + PA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de PA; HL + EPA2,5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 % - dieta hiperlipídica com incorporação de 5 % de extrato de PA.

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio (n=10); Letras diferentes representam significância (p<0,05; ANOVA one-way).

Diversos estudos vêm demonstrando a capacidade de polifenóis provenientes de vinho e chá preto assim como flavonoides, por exemplo, quercetina, campferol, luteonina, e outros, em modular genes relacionados a glutathiona (GSH). Entre os mecanismos envolvidos, está à ativação de elementos responsivos antioxidantes (AREs) que são encontrados ligados a genes promotores, os quais produzem elemento com ação antioxidante, entre

eles a γ -GCS (γ -glutamil cisteína sintetase). Esta enzima é um elemento chave para a formação da GSH e assim do seu potencial como agente antioxidante (RODRIGUEZ-RAMIRO et al., 2015; MASELLA et al., 2005).

A atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR); foi medida no homogeneizados de fígado conforme mostra a Figura 8. A dieta hiperlipídica não influenciou a atividade das enzimas antioxidantes. Assim, não foi possível avaliar o efeito da incorporação de PA e EPA nas dietas com relação aos seus efeitos na atividade destas enzimas.

Figura 8. Atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR); no tecido hepático dos camundongos alimentados durante 70 dias com dietas incorporadas com PA-EU e EPA-EU.

NL- normolipídica; HL- hiperlipídica; NL+PA5 %- normolipídica com incorporação de pólen apícola (PA) 5 %; HL+PA2,5 %- hiperlipídica com 2,5 % de PA; HL+PA5 %- hiperlipídica com 5 % de PA; HL+EPA2,5 %- hiperlipídica com 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 %- hiperlipídica com 5 % de extrato de PA. *Resultados expressos em média $\pm$ desvio (n=10); Letras diferentes representam significância ($p < 0,05$; ANOVA one-way).

4.2.3 Marcadores de inflamação no fígado

A influência do PA-EU e EPA-EU sobre o perfil inflamatório foi avaliada em camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta hiperlipídica (HL) suplementada com 2,5 % e 5 % de PA-EU ou 2,5 % e 5 % de EPA-EU. Os resultados da Figura 9 mostram que os camundongos alimentados com PA nas concentrações 2,5 e 5 % apresentaram redução na produção das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e MCP-1. O grupo HL+PA5 % ainda reduziu a produção da (TNF- α).

Figura 9. Perfil das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, MCP-1, IL-10 e TNF- α) do homogenato do fígado dos camundongos.

NL- normolipídica; HL- hiperlipídica; NL+PA5 %- normolipídica com incorporação de pólen apícola (PA) 5 %; HL+PA2,5 %- hiperlipídica com 2,5 % de PA; HL+PA5 %- hiperlipídica com 5 % de PA; HL+EPA2,5 %- hiperlipídica com 2,5 % de extrato de PA; HL+EPA5 %- hiperlipídica com 5 % de extrato de PA. *Resultados expressos em média $\pm$ desvio (n=10); Letras diferentes representam significância ($p < 0,05$; ANOVA one-way).

Os resultados mostram a influência do consumo de PA-EU apícola no perfil inflamatório dos grupos estudados. A incorporação e consumo de PA-EU na forma integral promoveu redução ($p < 0,05$) em todos os parâmetros inflamatórios no fígado dos animais, no entanto o extrato hidro-alcóolico de PA-EU, apesar da redução visível não apresentou diferenças ($p > 0,05$) em relação aos grupos controle. Desta forma pode-se considerar que o isolamento dos bioativos (compostos fenólicos) não foi efetivo da mesma forma que a incorporação integral na prevenção do quadro inflamatório crônico de baixo grau promovido pela dieta hiperlipídica.

Alguns autores investigaram a absorção de compostos fenólicos isolados ou na matriz alimentar em animais e humanos. No estudo de Hollman et al. (1999) realizado em humanos com ileostomia, foi possível identificar que a administração oral de quercetina aglicona (isolada) teve menor absorção/disponibilização no plasma (24 %) quando comparada a quercetina glicosilada presente em cebolas (52 %). Lesser et al. (2004) mostraram que a biodisponibilidade de quercetina é influenciada com a presença de gordura na matriz. Neste estudo realizado em porcos a administração conjunta de quercetina a uma dieta com 17 % de gordura aumentou em 50 % a absorção do flavonoide quando comparada a dieta com 3 % de gordura.

A biodisponibilidade de compostos fenólicos pode ser afetada por diversos fatores, entre eles a matriz alimentar, processamento, fatores ligados ao hospedeiro (sexo, idade, composição da microflora intestinal), assim como a interação dos polifenóis com outras moléculas (proteínas salivares e enzimas digestivas) (LEWANDOWSKA et al., 2013).

Poucos estudos avaliaram a consumo integral ou *in natura* de pólen apícola, geralmente é considerada a avaliação de extratos deste alimento utilizando solventes orgânicos. Conforme mostrado por (MARUYAMA et al., 2010) a utilização de extrato etanólico de PA foi mais eficiente quando comparada com a administração de PA bruto em modelo de inflamação aguda.

Dentre os efeitos encontrados pelo extrato estão a redução da produção de óxido nítrico (NO) e ciclooxigenase 2 (COX-2), os quais são sinalizadores de estresse oxidativo e de inflamação, respectivamente.

Os principais mecanismos de ação dos polifenóis na inflamação incluem a inibição de vias inflamatórias como da NF- κ B, MCP-1 e IL-1 β , IL-6 e TNF- α . (HUSSAIN et al, 2016). Além disso, os polifenóis podem modular a atividade de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico como as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e óxido nítrico sintase (iNOS) (GUPTA et al., 2014).

Os principais fenólicos encontrados no PA-*EU* administrado aos animais foram a rutina, miricetina, campferol e quercetina, podem ser encontrados em diversas fontes do reino vegetal apresentando propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (SANTHAKUMAR et al., 2018). A rutina, principal flavonoide encontrado no PA-*EU* é um importante constituinte da dieta presente em alimentos como maçã, chás, trigo-sarraceno, tomate, laranja, limão e espinafre. Em modelo animal de indução aguda de inflamação por CCl₄ a rutina reduziu a produção de marcadores inflamatórios como NF- κ B, TNF- α , COX-2 e suprimiu a expressão da iNOS e aumentou a da Nrf2 (HOSSEINZADEH et al., 2014).

Lee et al. (2013) avaliaram o efeito hepatoprotetor de extratos etanólicos de Trigo-sarraceno rico em rutina e quercetina, em modelo animal de indução de dano hepático por CCl₄ e etanol. A administração do extrato reduziu a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , gerando um efeito protetor no fígado dos animais.

5 Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram que, embora a dieta hiperlipídica tenha ocasionado um ganho de peso excessivo e alterado os parâmetros bioquímicos no soro dos animais, a presença de PA nesta dieta não foi capaz de atenuar estas alterações bioquímicas. Entretanto foi possível observar um aumento do conteúdo de GSH em todos os grupos que receberam o PA da forma integral tanto na forma de extrato. Este resultado sinaliza para a possível influência dos polifenóis encontrados no PA em modular uma resposta antioxidante por aumento da GSH.

A avaliação de potencial anti-inflamatório de PA na incorporada a dieta dos animais, mostrou que este alimento pode modular a produção de citocinas inflamatórias causadas por um quadro crônico inflamatório de baixo grau. Esta parece ser uma informação útil para continuar investigando quais vias estão envolvidas neste potencial anti-inflamatório além de possíveis efeito do PA *in vivo*.

6 Referências

- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; BERA, A.; FELSNER, M.L.; CANO, C.B. Produtos Apícolas. In: Almeida-Muradian LB, Penteado MDVC, editores. Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.183-98, 2015.
- ARRUDA, V.A.S. Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. [Tese] p.192, 2013
- 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**, v.29, p.100-105, 2013a.
- ARRUDA, V.A.S.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ESTEVINHO, M.L. ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Propriedades biológicas do pólen apícola de coqueiro, coletado na Região Nordeste do Brasil. **Magistra**, v. 25, p. 1-6, 2013b.
- BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.
- BASSARD, J.E.; ULLMANN, P.; BERNIER, F; WERCK-REICHHART, D. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. **Phytochemistry**, v.71, p.1808-1824, 2010.
- BASTOS, D.H.M.; BARTH, O.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO,

- P.O.; TORRES, E.A.S.; MICHELAN, M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.43, n.2, p.35-39, 2004.
- BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p.646–56, 2009.
- BEUTLER, E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 2º ed. New York, London: Grune & Stratton. p.89-90, 1975.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.677-685, 1985.
- CHENG, N.; REN, N.; LEI, X.; ZHENG, J.; CAO, W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 234-240, 2013.
- DALEPRANE, J.B.; FREITAS, V.S.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L.A.; DÖRR, F.A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L.A.; ONG, T.P.; ABDALLA, D.S.P. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, n.6, p.557–566, 2012.
- DE-MELO, A.A.M. Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. [Tese] p.341, 2015.
- ERASLAN, G.; KANBUR, M.; SILICI, S. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: the ameliorative effect of bee pollen. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v.47, n.1, p.86–91, 2009.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

-
- GHARRAS, H. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. **International journal of food science & technology**, v.44, n.12, p.2512–2518, 2009.
- GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; DESHMUKH-TASKAR, P.; HINOJOSA, M.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 91–99, out. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.006>>.
- HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Health Effects and Bioavailability of Dietary Flavonols. **Free Radical Research**, v. 31, n. sup1, p. 75–80, 31 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694044>>.
- HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 9, p. 783–788, set. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40618-014-0096-3>>.
- HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M. C. B.; RAHU, N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/7432797/>>.
- KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAŻMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1–6, 2015.
- LEE, C.-C.; SHEN, S.-R.; LAI, Y.-J.; WU, S.-C. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury. **Food & Function**, v. 4, n. 5, p. 794, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3fo30389f>>.
- LESSER, S.; CERMAK, R.; WOLFFRAM, S. Bioavailability of Quercetin in Pigs Is Influenced by the Dietary Fat Content. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1508–1511, 1 out. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/134/6/1508/4688826>>.
- LEWANDOWSKA, U.; SZEWCZYK, K.; HRABEC, E.; JANECKA, A.; GORLACH, S. Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of

- Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12183–12199, 18 dez. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf404439b>>.
- LOPES, J.; STANCIU, O.G.; CAMPOS, M.G.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MARGHITAS, L.A. Bee pollen antioxidant activity - a review. **Achievements and further challenges**, v.2, n.2, p.25-38, 2011.
- LUO, J.; FUELL, C.; PARR, A.; HILL, L.; BAILEY, P.; ELLIOTT, K.; FAIRHURST, S. a; MARTIN, C.; MICHAEL, A. J. A Novel Polyamine Acyltransferase Responsible for the Accumulation of Spermidine Conjugates in Arabidopsis Seed. **the Plant Cell Online**, v. 21, n. 1, p. 318–333, 2009. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.108.063511>>.
- 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.10, p30, 2010.
- MASELLA, R.; BENEDETTO, R.D.; VARI, R.; FILES, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The journal of nutritional biochemistry**, v.16, n.10, p.577–586, 2005.
- MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.
- MEDEIROS, K.C.P.; FIGUEIREDO, C.A.V.; FIGUEREDO, T.B.; FREIRE, K.R.L.; SANTOS, F.A.R.; ALCANTARA-NEVES, N.M.; SILVA, T.M.S.; PIUVEZAM, M.R. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.41–46, 2008.
- MELO, I.L.P.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.3, p.346–353, 2009.
- MIHAJLOVIC, L.; RADOSAVLJEVIC, J.; BURAZER, L.; SMILJANIC, K.; CIRKOVIC VELICKOVIC, T. Composition of polyphenol and polyamide compounds in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen and sub-pollen particles. **Phytochemistry**, v. 109, p. 125–132, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.022>>.

- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358, 1979.
- PERCIE DU SERT, P. Les pollens apicoles. **Phytothérapie**, v.7, n.2, p.75–82, 2009.
- PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.11, p.3273–3279, 2003.
- RODRIGUEZ-RAMIRO, I.; VAUZOUR, D.; MINIHANE, A.M. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.75, n.01, p.47–60, 2016.
- RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M.J. Separation and HPLC-MS Identification of Phenolic Antioxidants from Agricultural Residues: Almond Hulls and Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.25, p.10101–10109, 2007.
- RZEPECKA-STOJKO, A.; KABAŁA-DZIK, A.; KUBINA, R.; JASIK, K.; KAJOR, M.; WRZEŚNIOK, D.; STOJKO, J. Protective Effect of Polyphenol-Rich Extract from Bee Pollen in a High-Fat Diet. **Molecules**, v.23, n.805, 2018
- RZEPECKA-STOJKO, A.; STOJKO, J.; KUREK-GÓRECKA, A.; GÓRECKI, M.; KABAŁA-DZIK, A.; KUBINA, R.; MOŹDZIERZ, A.; BUSZMAN, E. Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. **Molecules**, v.20, n.12, p.21732–21749, 2015.
- SANTHAKUMAR, A. B.; BATTINO, M.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 113, n. January, p. 49–65, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29360556>>.
- SATTTLER, J.A.G. Quantificação das vitaminas antioxidantes E (α -, β -, γ -, δ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A (α -, β -caroteno) e composição

-
- química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. [Dissertação] p.115, 2013.
- SATTLER, J.A.G.; MELO, I.L.P.; GRANATO, D.; ARAÚJO, E.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; SATTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**, v.77, p.82–91, 2015.
- SEMWAL, D. K.; SEMWAL, R. B.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–31, 2016.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects - a review. **Journal of functional foods**, v.18, p.820–897, 2015.
- SHARMA, S.; ALI, A.; ALI, J.; SAHNI, J. K.; BABOOTA, S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 22, n. 8, p. 1063–1079, 25 ago. 2013.
- SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO E.; BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v.27, p.502-22, 1969.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os componentes bioativos da dieta, incluindo os compostos fenólicos, ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) e fitoesteróis, vêm sendo exaustivamente investigados com relação aos seus efeitos benéficos ao organismo. Estes estudos estão focados principalmente nas suas atividades antioxidante e anti-inflamatória. Neste sentido, alimentos ricos nesses componentes tem sido alvo de estudos que avaliam seus efeitos fisiológicos. O pólen apícola é um desses alimentos, que vêm sendo reconhecido pela sua composição de bioativos, entre eles, vitaminas, fitoesteróis, AGPIs e compostos fenólicos, porém poucos estudos avaliaram seu efeito *in vivo*. O Brasil possui um potencial de produção apícola devido a grande disponibilidade de fontes políferas, dentre elas a espécie *Eucalyptus sp.*, que é encontrada em diversas regiões do país.

Nesta linha, foi investigado o pólen apícola de *Eucalyptus* quanto a sua composição de bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. No primeiro capítulo, foram apresentados os dados da literatura que apontam para a necessidade de investigação do potencial do pólen apícola em modelos envolvendo animais (fisiológicos). O segundo capítulo confirmou que as amostras de pólen apícola de *Eucalyptus sp.* produzidas em uma micro região do Rio Grande do Sul apresentam quantidades consideráveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante, recebendo influência do período de coleta e fatores climáticos. Neste mesmo contexto, foi ainda observado no capítulo três que, apesar do PA apresentar baixa quantidade de lipídeos, a maior parte dos seus ácidos graxos são poli-insaturados. Além disso, foi identificada uma quantidade considerável de fitoesteróis, sendo também influenciada por fatores climáticos.

Com relação aos efeitos do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* *in vivo*, que foram apresentados no capítulo quatro, os resultados do presente estudo mostraram que o PA não provocou alterações no peso e no metabolismo lipídico dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, mas apresentou a ação positiva em aumentar os níveis de GSH no fígado em todos os animais que receberam PA-EU integral ou na forma de extrato; porém este efeito não parece ser

dependente da quantidade oferecida.

Quanto aos parâmetros inflamatórios os grupos onde receberam PA-EU reduziram significativamente os níveis de citocinas inflamatórias, porém quando esta mesma amostra foi incorporada na forma de extrato na ração o consumo da mesma em duas concentrações não promoveu alterações. Assim, estes resultados mostraram um efeito importante do pólen apícola de *Eucalyptus sp.* no perfil inflamatório, visto que ocorreu uma diminuição nos níveis de citocinas presentes no tecido hepático dos animais.

De uma forma geral o presente trabalho mostrou a presença de bioativos em pólen apícola de *Eucalyptus sp.*, onde pôde-se observar a influência do clima na composição deste alimento e ainda o potencial anti-inflamatório *in vivo*. A partir deste trabalho novas perspectivas se abrem quanto ao potencial bioativo deste alimento, sendo necessários novos estudos que avaliem mecanismo de ação dos compostos bioativos identificados neste alimento e também em novos modelos de investigações *in vivo*.

Anexo 1 – Certificado CEUA/FCF

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 34.2015-P499

São Paulo, 15 de junho de 2015.

Prezado(a) Senhor(a),

Cumpre-nos informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em reunião realizada em 12 de junho de 2015, **APROVOU** o projeto de pesquisa **"Qualificação química de pólen apícola e sua influência sobre parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação in vivo"** (Protocolo CEUA nº 499), apresentado por Vossa Senhoria, recomendando o que segue:

- a) No FR (9.2): corrigir (LPE);
- b) No FR (9.5): corrigir (não é OGM);
- c) No FR (9.11): acrescentar a dieta de intervenção;
- d) No FR (10.3.1): incluir jejum do OGTT (conforme PP, pg. 15);
- e) No FR (10.6): incluir dextrose.

As questões apontadas acima devem ser atendidas e informadas em carta assinada pelos responsáveis, enquanto as respectivas alterações, conforme o caso, deverão ser implementadas no Formulário de Registro e/ou no Projeto de Pesquisa.

Decorrido o prazo de sessenta dias, sem manifestações de Vossa Senhoria, quanto ao atendimento das solicitações acima, o processo será arquivado.

Cordialmente,

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a). José Augusto Gasparotto Sattler
Orientador(a): Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian
FBF/FCF/USP

Legenda: FR → Formulário de Registro. PP → Projeto de Pesquisa

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Anexo 2 – Ficha do aluno

19/03/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 7496841/2 - José Augusto Gasparotto Sattler

Email:	jasattler@usp.br
Data de Nascimento:	08/01/1985
Cédula de Identidade:	RG - 9069879055 - RS
Local de Nascimento:	Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Nutrição - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Rio Grande do Sul - Brasil - 2007
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Bromatologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	19/05/2014
Início da Contagem de Prazo:	19/05/2014
Data Limite para o Depósito:	21/05/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ligia Bicudo de Almeida Muradian - 19/05/2014 até o presente. Email: ligiabi@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Jorge Mancini Filho - 10/08/2016 até o presente. Email: jmancini@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 19/05/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 12/08/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 19/05/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 19/03/2018 15:51:15

19/03/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 7496841/2 - José Augusto Gasparotto Sattler

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMB5804-3/2	O Órgão Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	06/10/2014	17/11/2014	60	4	80	A	N	Concluída
EFB5759-1/3	Suplementação Nutricional Aplicada à Atividade Motora (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	05/11/2014	02/12/2014	60	4	100	A	N	Concluída
QBQ5747-8/1	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/11/2014	30/11/2014	15	1	80	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0406 Fiscalização de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2015	30/06/2015	-	3	-	-	-	-
HNT5759-2/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/03/2015	06/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5870-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição I	03/03/2015	11/05/2015	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBA5900-2/2	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	28/04/2015	18/05/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5874-6/2	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	01/11/2016	12/12/2016	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	22
Estágios:			
Total:	0	20	22

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/08/2016.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 19/03/2018 15:51:15

Anexo 3 – Informações para os membros de bancas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo 4 – Currículo Lattes

José Augusto Gasparotto Sattler

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2182782467315374>

Última atualização do currículo em 09/09/2018

Resumo informado pelo autor

Nutricionista graduado pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Especialista em Nutrição Esportiva e Treinamento Físico (UNISINOS). Mestre em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (USP). Atualmente doutorando em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (USP). Atua nos temas: identificação de compostos bioativos de alimentos como pólen apícola, mel, óleo das sementes de romã e melão-de-são-caetano; avaliação de bioativos alimentares em modelos in vitro e in vivo de inflamação e estresse oxidativo.

(Texto informado pelo autor)

Links para Outras Bases:

[SciELO - Artigos em texto completo](#) [Scopus](#)

Nome civil

Nome José Augusto Gasparotto Sattler

Dados pessoais

Filiação Aroni Sattler e Ivete Maria Sattler
Nascimento 08/01/1985 - Taquari/RS - Brasil
Carteira de Identidade 9069879055 SJS - RS - 04/01/2002
CPF 002.948.600-96

Formação acadêmica/titulação

- 2014** Doutorado em Ciências dos Alimentos.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Caracterização do potencial bioativo do pólen apícola de *Eucalyptus* sp. in vitro e sua influência sobre parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação in vivo
 Orientador: Dra. Lígia Bicudo de Almeida Muradian
 Co-orientador: Dr. Jorge Mancini-Filho
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2014** Mestrado em Ciência dos Alimentos.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Quantificação das vitaminas antioxidantes E (α -, β -, γ -), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A (α -, β -caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido na região Sul do Brasil, Ano de obtenção: 2014
 Orientador: Dr. Lígia Bicudo de Almeida Muradian
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2010** Especialização em Nutrição Esportiva e Treinamento Físico.
 Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil
 Título: A INFLUÊNCIA DA HIDRATAÇÃO NO ESTRESSE OXIDATIVO DE INDIVÍDUOS TREINADOS
 Orientador: Dr. João Antônio Bonatto Costa
- 2003 - 2007** Graduação em Nutrição.
 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
 Título: SÍNDROME METABÓLICA: CAUSAS, CONSEQUÊNCIAS E TRATAMENTO.
 Orientador: Dr. Martine Elisabeth Kienzie Hagen
- 2000 - 2002** Ensino Médio (2o grau) .
 Colégio Marista Champagnat, CMC, Brasil

Formação complementar

- 2017 - 2017** Extensão universitária em Noções básicas de cultivo celular e técnicas de pipetagem para melhorar sua. (Carga horária: 4h).
 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, FMVZ-USP, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Treinamento para uso da plataforma Turnitin. (Carga horária: 3h).
 DTSibi - USP, DTSiBi, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Desafios da Interdisciplinaridade na Nutrição. (Carga horária: 4h).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Tendências no Mundo da Publicação Acadêmica. (Carga horária: 4h).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (Carga horária: 8h).
 Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Colunas de HPLC e CG e Cartuchos de SPE. (Carga horária: 5h).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Nutrição e Estética. (Carga horária: 3h). Núcleo Atualização em Nutrição Científica, NÚCLEO, Brasil
- 2009 - 2009** Extensão universitária em I Curso de Extensão Jovem Pesquisador: A Formação Científica do Profissional. (Carga horária: 12h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em Boas Práticas para Serviços de Alimentação. (Carga horária: 16h). Centro Universitário Metodista, IPA-RS, Porto Alegre, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Iniciando um Pequeno Grande Negócio. (Carga horária: 30h). Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, SEBRAE, Brasília, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Nutrição Materno-Infantil. (Carga horária: 3h). Núcleo Atualização em Nutrição Científica, NÚCLEO, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Síndrome Metabólica: Estratégias Nutricionais. (Carga horária: 3h). Núcleo Atualização em Nutrição Científica, NÚCLEO, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Alimentos Funcionais na Prática Esportiva. (Carga horária: 3h). Núcleo Atualização em Nutrição Científica, NÚCLEO, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Bioquímica Nutricional. (Carga horária: 15h). Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Nutrição e Recursos Ergonômicos na Atividade Física. (Carga horária: 23h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Musculação e Nutrição. (Carga horária: 16h). Centro de Orientação Profissional, COP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Nutrição Esportiva na Prática Clínica. (Carga horária: 8h). Associação Gaúcha de Nutrição, AGAN, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Terapia Nutricional em Cardiologia. (Carga horária: 14h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** word 2000. (Carga horária: 36h). Senac-RS, SENAC, Brasil
- 2003 - 2003** Excel 2000. (Carga horária: 36h). Senac-RS, SENAC, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Curso Básico de Apicultura. (Carga horária: 32h). Associação Gaúcha de Apicultores, AGA, Brasil
- 2001 - 2001** Mini empresa. Junior Achievement-RS, JA, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2015 - 2015** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiário PAE , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto à disciplina FBA-0406/Fiscalização de Alimentos para o curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com supervisão da Professora Associada Lígia Bicudo de Almeida Muradian.
- 2014 - Atual** Vínculo: Doutorando , Enquadramento funcional: Aluno de pós-graduação, Regime: Dedicção exclusiva
- 2012 - 2012** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Estagiário PAE , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto à disciplina FBA-0406/Fiscalização de Alimentos para o curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com supervisão da Professora Associada Lígia Bicudo de Almeida Muradian.
- 2012 - 2012** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Estagiário PAE , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto à disciplina FBT-201/Tecnologia de Alimentos para o curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com supervisão da Professora Dr. Susana Marta Isay Saad.
- 2011 - 2013** Vínculo: Mestrando , Enquadramento funcional: Aluno de pós-graduação, Regime: Dedicção exclusiva

2. Departamento de Bioquímica da UFRGS - BIOQ

Vínculo institucional

- 2009 - 2010** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaborador de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Colaborador de iniciação científica no projeto de pesquisa nível doutorado "Efeito protetor do sulforafano no diabetes induzido em ratos via estreptozotocina".

3. Apis Sattler Comercio de Proutos da Colméia e Derivados LTDA. - MELARIA

Vínculo institucional

- 2010 - 2011** Vínculo: Funcionário , Enquadramento funcional: Nutricionista , Carga horária: 20, Regime: Parcial

4. Petiskeira Alimentos LTDA. - PETISKEIRA

Vínculo institucional

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata

Página 2 de 9

2008 - 2009 Vínculo: Nutricionista , Enquadramento funcional: Nutricionista , Carga horária: 50, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Nutricionista responsável pela unidade Iguatemi e temporário pela unidade Moinhos. Responsável pelo controle de qualidade dos produtos, treinamentos, organização pelos sistemas PAS e 5's, supervisionando 80 funcionários. Premio Coordenador de Produção Destaque do mês de outubro 2008.

5. Burger King - BK

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Coordenador Trainee , Enquadramento funcional: Coordenador Trainee , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Coordenador de Produção, atuando no controle dos processos de manipulação e preparação dos produtos, controle de qualidade, boas práticas de manipulação e treinamentos.

6. Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Estágio Extracurricular , Enquadramento funcional: Nutrição Clínica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiário da Comissão de Suporte Nutricional do HCPA.

2005 - 2006 Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Estágio em Produção de Alimentos , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio na Unidade de Produção de Alimentos do HCPA.

7. Hospital São Lucas da PUCRS - HSL

Vínculo institucional

2005 - 2006 Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Nutrição Clínica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiário da Unidade de Internação do HSL-PUCRS.

8. Centro Universitário Sant'Anna - UNISANT'ANNA

Vínculo institucional

2017 - 2018 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 18, Regime: Parcial
Outras informações:
Responsável pelas disciplinas: Bromatologia Tecnologia de Alimentos Práticas profissionais Projeto integrado Ética e políticas de alimentação e nutrição Bioquímica da nutrição Cursos de nutrição e biomedicina

9. Universidade Municipal de São Caetano do Sul - USCS

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Responsável pela disciplinas: Ciência dos Alimentos II Projeto Integrado

10. Universidade Anhembi Morumbi - UAM

Vínculo institucional

2018 - Atual Vínculo: Professor convidado , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Professor visitante dos cursos de Especialização em Gastronomia Funcional, Especialização em Fisioterapia Dermo-funcional e Especialização em Fitoterapia da Universidade Anhembi Morumbi.

Revisor de periódico

1. AFRICAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY RESEARCH

Vínculo

2017 - Atual Regime: Parcial

2. AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Vínculo

2017 - Atual Regime: Parcial

3. FOOD CHEMISTRY

Vínculo

2017 - Atual Regime: Parcial

4. REVISTA DE NUTRIÇÃO DA PUCAMP

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

5. JOURNAL OF AGRICULTURE AND ALLIED SCIENCES

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

6. JOURNAL OF MEDICINAL PLANT RESEARCH

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

7. JOURNAL OF APICULTURAL RESEARCH

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

8. ASIAN RESEARCH JOURNAL OF AGRICULTURE

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

9. Journal of Food Science and Nutrition

Vínculo

2016 - Atual Regime: Parcial

10. Journal of Biochemistry Research & Review

Vínculo

2015 - Atual Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. [doi](#) NASCIMENTO, KELLY SOUZA DO; **GASPAROTTO SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO**; LAUER MACEDO, LUCIENE FAGUNDES; SERNA GONZÁLEZ, CAROL VIVIANA; PEREIRA DE MELO, ILLANA LOUISE; DA SILVA ARAÚJO, ELIAS; GRANATO, DANIEL; SATTTLER, ARONI; DE ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian Apis mellifera honeys. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. [LWT](#), v.91, p.85 - 94, 2018.
2. [doi](#) SOUZA, BIANCA RODRIGUES; **SATTTLER, J. A. G.**; DE-MELO, ADRIANE ALEXANDRE MACHADO; GRANATO, DANIEL; ARAÚJO, ELIAS; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; SATTTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Physicochemical parameters and content of B-complex vitamins: an exploratory study of bee pollen from southern Brazilian states. REVISTA CHILENA DE NUTRICION. , v.45, p.232 - 242, 2018.
3. [doi](#) YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; DE MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA; **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO**; DE CARVALHO, ELIANE BONIFÁCIO TEIXEIRA; MANCINI-FILHO, JORGE
Bitter gourd (Momordica charantia L.) seed oil as a naturally rich source of bioactive compounds for nutraceutical purposes. Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. , v.41, p.12 - , 2016.
4. [doi](#) MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; CARVALHO, ELIANE BONIFÁCIO TEIXEIRA DE; SILVA, ANA MARA DE OLIVEIRA E; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO**; PAVAN, ROSÂNGELA TORRES; MANCINI-FILHO, JORGE
Characterization of constituents, quality and stability of pomegranate seed oil (Punica granatum L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos (Online) [LWT](#), v.35, p.1 - 9, 2016.
5. [doi](#) DE-MELO, ADRIANE ALEXANDRE MACHADO; ESTEVINHO, MARIA LETICIA MIRANDA FERNANDES; **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO**; SOUZA, BIANCA RODRIGUES; FREITAS, ALEX DA SILVA; BARTH, ORTRUD MONIKA; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology. [LWT](#), v.65, p.808 - 815, 2016.
6. [doi](#) **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO**; DE-MELO, ADRIANE ALEXANDRE MACHADO; NASCIMENTO, KELLY SOUZA DO; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; MANCINI-FILHO, JORGE; SATTTLER, ARONI; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO DE
Essential minerals and inorganic contaminants (barium, cadmium, lithium, lead and vanadium) in dried bee

pollen produced in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (Online). **JCTA**, v.36, p.505 - 509, 2016.

7. **DOI:** DE MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA; DE OLIVEIRA E SILVA, ANA MARA; DE CARVALHO, ELIANE BONIFÁCIO TEIXEIRA; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO**; MANCINI-FILHO, JORGE
Incorporation and effects of puniceic acid on muscle and adipose tissues of rats. *Lipids in Health and Disease*. **LIPID**, v.15, p.40 - , 2016.
8. **DOI:** DA SILVA DE FREITAS, ALEX; **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO**; DE SOUZA, BIANCA RODRIGUES; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO; SATTTLER, ARONI; BARTH, ORTRUD MONIKA
A meissopolynological analysis of *Apis mellifera* L. loads of dried bee pollen in the southern Brazilian macro-region. Grana (Stockholm). **JCR**, v.54, p.305 - 312, 2015.
9. **DOI:** **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO GASPAROTTO**; DE MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA; GRANATO, DANIEL; ARAÚJO, ELIAS; DA SILVA DE FREITAS, ALEX; BARTH, ORTRUD MONIKA; SATTTLER, ARONI; DE ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*. **JCR**, v.77, p.82 - 91, 2015.
10. **DOI:** DE SOUZA, CAROLINA GUERINI; **SATTTLER, JOSÉ AUGUSTO**; DE ASSIS, **ADRIANO MARTIMBIANO**; RECH, ANDERSON; PERRY, MARCOS LUIZ SANTOS; **SOUZA, DIOGO ONOFRE**
Metabolic Effects of Sulforaphane Oral Treatment in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Journal of Medicinal Food*. **JCR**, v.15, p.795 - 801, 2012.

Artigos aceitos para publicação

1. MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; DE OLIVEIRA E SILVA, ANA MARA; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; **SATTTLER, J. A. G.**; CARVALHO, ELIANE BONIFÁCIO TEIXEIRA DE; MANCINI-FILHO, JORGE
Punicic Acid is Metabolized and Incorporated in the Form of Conjugated Linoleic Acid in Different Tissues of Rats.. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCES AND NUTRITION* (ONLINE). **LIPID**, 2018.

Capítulos de livros publicados

1. **SATTTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Análises de Qualidade de Pólen Apícola In: *Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas- 1a Edição*. 1 ed.São Paulo : Elsevier, 2016, v.1, p. 173-184.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. NASCIMENTO, K. S.; **SATTTLER, J. A. G.**; GRANATO, DANIEL; MACEDO, L. F. L.; CAROL, C. S.; SATTTLER, ARONI; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Classification of *Apis mellifera* honeys from Brazil according to the season and botanical origin using discriminant analysis (LDA) In: 8th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2017, Praga.
Book of abstracts - 8th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Praga: University of Chemistry and technology of Prague, 2017. v.1. p.250 - 250
2. **SATTTLER, J. A. G.**; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; CARVALHO, ELIANE BONIFÁCIO TEIXEIRA DE; MANCINI-FILHO, JORGE
Effects of conjugated alpha-linolenic acids (CLNAs) from pomegranate and bitter gourd seed oils on inflammatory parameters in RAW 264.7 cell cultures In: IUNS. 21st International Congress of Nutrition., 2017, Buenos Aires.
Logo Annals of Nutrition and Metabolism Free Access IUNS. 21st International Congress of Nutrition, Buenos Aires, Argentina, October 15-20, 2017: Abstracts. Basel: S. Karger AG, Basel, 2017. v.71. p.387 - 387
3. **SATTTLER, J. A. G.**; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; CORSI, G. C.; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; MANCINI-FILHO, JORGE; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Presence of phytosterols in bee pollen from eucalyptus sp.: identification and evaluation of the impact of the collection period and geolocation In: IUNS. 21st International Congress of Nutrition., 2017, Buenos Aires.
Logo Annals of Nutrition and Metabolism. IUNS. 21st International Congress of Nutrition. Buenos Aires, Argentina, October 15-20, 2017: Abstracts. Basel: S. Karger AG, Basel, 2017. v.71. p.413 - 413
4. MAFIOLETTI, M.; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; **SATTTLER, J. A. G.**; CORSI, G. C.; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; MANCINI-FILHO, J.
Trans fatty acids: after 14 years of Brazilian legislation are the labeling adequated? In: Logo Annals of Nutrition and Metabolism Free Access IUNS. 21st International Congress of Nutrition., 2017, Buenos Aires.
Logo Annals of Nutrition and Metabolism Free Access IUNS. 21st International Congress of Nutrition, Buenos Aires, Argentina, October 15-20, 2017: Abstracts. Basel: S. Karger AG, Basel, 2017. v.71. p.1305 - 1305
5. CORSI, G. C.; PEREIRA, S. S.; **SATTTLER, J. A. G.**; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MANCINI-FILHO, J.
Comparison of extraction methods for Phytosterols Identification in Bee Pollen In: XXI Pharmaceutical Sciences and Technology Meeting, 2016, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. v.52. p.16 - 16
6. MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; **SATTTLER, J. A. G.**; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; PAVAN, ROSÂNGELA TORRES; MANCINI-FILHO, J.
Conjugated alpha-linolenic acids are incorporated into phospholipids as conjugated linoleic acid enhance the production of eicosanoids in liver In: 3º Prof. Eric A. Newsholme Research Symposium - Metabolic Regulation, 2016, São Paulo.
Caderno de Resumos, 2016. p.83 -
7. MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; **SATTTLER, J. A. G.**; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; PAVAN, ROSÂNGELA TORRES; MANCINI-FILHO, JORGE
Conjugated and Alpha-Linolenic Acids Are Incorporated into Phospholipids as conjugated Linoleic Acid and Enhance the Production of Eicosanoids in Liver In: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2016, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences - Annals, 2016. v.52. p.34 - 34
8. PEREIRA, S. S.; NASCIMENTO, K. S.; **SATTTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Physicochemical Analysis of Eucalyptus Honey From the state of Rio Grande do Sul In: XXI Pharmaceutical Sciences and technology Meeting, 2016, São Paulo.
Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. v.52. p.43 - 43
9. YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; SANTANA, F. C.; OLIVEIRA, L. R.; **SATTTLER, J. A. G.**; CARVALHO, ELIANE BONIFÁCIO TEIXEIRA DE; MANCINI-FILHO, J.
Conjugated alpha-linolenic acids in vegetables: Chemical Composition and Oxidative Stability of Two Isomers In: Institute of Food Technologists Congress, 2015, Chicago.
Annals of Institute of Food Technologists 2015. Chicago: IFT, 2015. v.1. p.034 - 034
10. **SATTTLER, J. A. G.**; SANTANA, F. C.; SATTTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Composição de minerais de pólen apícola de Canola (brassica napus L.) produzido no estado do Rio Grande do Sul In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2014, Aracaju-SE.
Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2014.
11. **SATTTLER, J. A. G.**; NASCIMENTO, K. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Pólen Apícola: compostos bioativos e propriedades biológicas In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2014, Aracaju-SE.
Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), 2014.

12. **SATTTLER, J. A. G.**; Souza B. R.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Presence of Pro-vitamin A (α - β -carotene) in Dehydrated Bee Pollen From Brazilian State of Paraná In: International Symposium on Bee Products 3rd Edition, 2014, Opatjia. *Annals from International Symposium on Bee Products 3rd Edition* . 2014. v.1. p.30 - 30
13. **SATTTLER, J. A. G.**; Souza B. R.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Presence of vitamin C in dehydrated bee pollen produced in georeferenced apiaries from southern Brazil In: 17th World Congress of Food Science and Technology & EXPO, 2014, Montreal. *Annals of 17th World Congress of Food Science and Technology & EXPO* . 2014.
14. ANDRADE, T. K.; **SATTTLER, J. A. G.**; Araujo E. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Avaliação do teor de vitamina C e composição centesimal do pólen apícola desidratado da região sul do Brasil. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica - SIICUSP, 2013, São Paulo. *Simpósio Internacional de Iniciação Científica - SIICUSP* . 2013.
15. ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; Souza B. R.; **SATTTLER, J. A. G.** Prídoxol, Pyridoxal And Pyridoxamine (Vitamin B6 Vitamers) content in brazilian dehydrated Bee Pollen In: XXXIII International Apicultural Congress, 2013, Kiev. *Annals of XXXIII International Apicultural Congress* . 2013. p.292 - 293
16. **SATTTLER, J. A. G.**; Souza B. R.; Araujo E. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Proximate composition of dehydrated bee pollen from Southern Brasil. In: 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2013, Campinas-SP. *10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos* . 2013.
17. **SATTTLER, J. A. G.**; Araujo E. S.; Souza B. R.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. QUANTIFICATION OF VITAMIN E IN DEHYDRATED BEE POLLEN OF SOUTHERN BRAZIL In: 20th International Congress of Nutrition, 2013, Granada. *Annals of Nutrition and Metabolism*. New York: Karger, 2013. v.63.
18. SOUZA, BIANCA RODRIGUES; Oliveira C. M.; Araujo E. S.; **SATTTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Teor de vitamina B2 em pólen apícola desidratado proveniente da região do sul do Brasil In: II Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen, 2013, Ilhéus. *Magistra - Suplemento (Anais do II Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen)*. Ilhéus: Magistra - UFRB, 2013. v.25. p.2 - 2
19. Souza B. R.; **SATTTLER, J. A. G.**; Araujo E. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. VITAMIN B1 CONTENT IN DEHYDRATED BEE POLLEN FROM DIFFERENT APIARIES INSTALLED IN RIO GRANDE DO SUL, SOUTHERN BRAZILIAN STATE In: 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2013, Campinas-SP. *10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos* . 2013.
20. Souza B. R.; **SATTTLER, J. A. G.**; Araujo E. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. VITAMIN B1 CONTENT IN DRIED BEE POLLEN COLLECTED IN DIFFERENT APIARIES FROM PARANÁ AND SANTA CATARINA STATES, SOUTHERN BRAZIL. In: XVIII SEMANA FARMACÉUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2013, São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, 2013. v.49. p.3 - 94
21. MELO, A.; MEIRA, D. F. S.; **SATTTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Antioxidant activity of bee pollen produced in two Brazilian states In: 5 EURBEE - 5 EUROPEAN CONFERENCE OF APIDOLOGY, 2012, Halle an der Saale. *5 Eurbee annals* . 2012.
22. MELO, A.; MEIRA, D. F. S.; **SATTTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DEHYDRATED BEE POLLEN IN RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL. In: II International Symposium o bee products. Annual meeting of the International Honey Commission, 2012, Bragança. *II International Symposium o bee products. Annual meeting of the International Honey Commission. Book of Abstracts. Bragança: Institut Politecnico de Bragança, 2012..* 2012. p.75 - 75
23. MELO, A.; MEIRA, D. F. S.; **SATTTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Atividade antioxidante do pólen apícola desidratado avaliada por diferentes métodos de extração In: 19º Congresso Brasileiro de Apicultura, 2012, Gramado. *Anais do 19º Congresso Brasileiro de Apicultura - MENSAGEM DOCE*. São Paulo: APACAME, 2012. v.1. p.59 - 59
24. **SATTTLER, J. A. G.**; MELO, A.; Soares, E. S.; SANTOS, L. B.; MEIRA, D. F. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Chemical composition of dehydrated bee pollen produced in brazilian states Parana and Santa Catarina. In: II International Symposium o bee products. Annual meeting of the International Honey Commission, 2012, Bragança. *II International Symposium o bee products. Annual meeting of the International Honey Commission. Book of Abstracts. Bragança: Institut Politecnico de Bragança, 2012..* 2012. p.46 - 46
25. **SATTTLER, J. A. G.**; MELO, A.; Soares, E. S.; SANTOS, L. B.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Chemical composition of dried bee pollen from state of Rio Grande do Sul, Brazil. In: 5 EURBEE - 5 EUROPEAN CONFERENCE OF APIDOLOGY, 2012, Halle an der Saale. *5 Eurbee annals* . 2012.
26. MELO, A.; MEIRA, D. F. S.; CHAN, J.; **SATTTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Comparação entre métodos de extração de compostos antioxidantes do pólen apícola desidratado. In: 11º Encontro de Química de Alimentos, 2012, Bragança. *11º Encontro de Química de Alimentos - Qualidade dos alimentos: novos desafios* . 2012. p.65 - 65
27. **SATTTLER, J. A. G.**; MELO, A.; Soares, E. S.; SANTOS, L. B.; MEIRA, D. F. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Quantificação de vitamina E em pólen apícola desidratado do Estado do Rio Grande do Sul In: 19º Congresso Brasileiro de Apicultura, 2012, Gramado. *Anais do 19º Congresso Brasileiro de Apicultura..* São Paulo: APACAME, 2012. v.1. p.57 - 47

Artigos em revistas (Magazine)

1. **SATTTLER, J. A. G.**; DOMINGUES, F.; MURTA, B.; ZARA FILHO, C. Mel Efeitos Comprovados. Revista Saúde E Vital - Editora Abril. São Paulo-SP. p.30 - 37, 2014.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SATTTLER, J. A. G.** Atividades bioativas de pólen apícola. 2018. (Conferência ou palestra.Apresentação de Trabalho)
2. **SATTTLER, J. A. G.**; CORSI, G. C.; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; SATTTLER, A.; MANCINI-FILHO, JORGE; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO Pólen apícola de *Eucalyptus* sp.: quantificação de compostos fenólicos e avaliação da potencial antioxidante in vitro., 2018. (Congresso.Apresentação de Trabalho)
3. **SATTTLER, J. A. G.**; CORSI, G. C.; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; SATTTLER, A.; MANCINI-FILHO, JORGE; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO Potencial anti-inflamatório do pólen apícola de *Eucalyptus* sp. em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica., 2018. (Congresso.Apresentação de Trabalho)
4. DE MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; SILVA, ANA MARA DE OLIVEIRA E; **SATTTLER, J. A. G.**; MANCINI-FILHO, J. Anti-inflammatory effects of pomegranate and bitter gourd seed oil in 3T3-L1 adipocytes, 2017.

(Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. CORSI, G. C.; **SATTLER, J. A. G.**; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MANCINI-FILHO, J.
Comparison of extraction methods for phytosterols identification in bee pollen, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
6. **SATTLER, J. A. G.**; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; CARVALHO, ELIANE BONIFÁCIO TEIXEIRA DE; MANCINI-FILHO, JORGE
Effects of conjugated alfa-linolenic acids (CLNAs) from pomegranate and bitter gourd seed oils on inflammatory parameters in RAW 264.7 cell cultures, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
7. **SATTLER, J. A. G.**; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; CORSI, G. C.; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; MANCINI-FILHO, JORGE; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Presence of phytosterols in bee pollen from eucalyptus sp.: identification and evaluation of the impact of the collection period and geolocation, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
8. MAFIOLETTI, M. C.; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; **SATTLER, J. A. G.**; CORSI, G. C.; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; MANCINI-FILHO, J.
Trans fatty acids: After 14 years of brazilian legislation are the labeling adequated?, 2017. (Outra,Apresentação de Trabalho)
9. MAFIOLETTI, M. C.; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; **SATTLER, J. A. G.**; CORSI, G. C.; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; MANCINI-FILHO, J.
Trans fatty acids: After 14 years of brazilian legislation are the labeling adequated?, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
10. NASCIMENTO, K. S.; **SATTLER, J. A. G.**; MACEDO, L.F.L.; SATTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Apis mellifera* honey from the south of Brazil, 2016. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
11. CORSI, G. C.; PEREIRA, S. S.; **SATTLER, J. A. G.**; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO; MANCINI-FILHO, J.
Comparison of extraction methods for phytosterols identification in bee pollen, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)
12. **SATTLER, J. A. G.**
Compostos fenólicos em alimentos, 2016. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
13. MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; **SATTLER, J. A. G.**; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; PAVAN, ROSÂNGELA TORRES; MANCINI-FILHO, J.
Conjugated alfa-linolenic acids are incorporated into phospholipids as conjugated linoleic acid and enhance the production of eicosanoids in liver, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)
14. MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; **SATTLER, J. A. G.**; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; PAVAN, ROSÂNGELA TORRES; MANCINI-FILHO, J.
Conjugated alfa-linolenic acids are incorporated into phospholipids as conjugated linoleic acid and enhance the production of eicosanoids in liver, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
15. **SATTLER, J. A. G.**; MELO, ILLANA LOUISE PEREIRA DE; YOSHIME, LUCIANA TEDESCO; MANCINI-FILHO, JORGE; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
O pólen apícola como uma fonte potencial de Beta-sitosterol: Um estudo piloto, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
16. NASCIMENTO, K. S.; **SATTLER, J. A. G.**; MACEDO, L.F.L.; SATTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Parâmetros de qualidade de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
17. PEREIRA, S. S.; NASCIMENTO, K. S.; **SATTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Physicochemical Analysis of Eucalyptus Honey from the State of Rio Grande do Sul, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)
18. **SATTLER, J. A. G.**
Compostos bioativos presentes no pólen apícola, 2015. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
19. **SATTLER, J. A. G.**; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; Souza B. R. ; SATTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Avaliação do Conhecimento de Apicultores da Região Sul do Brasil Sobre a Flora Apícola Explorada Pelas Abelhas do Gênero *Apis mellifera*, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
20. **SATTLER, J. A. G.**; SANTANA, F. C.; SATTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Composição de Minerais de Pólen Apícola de Canola (*brassica napus* L.) Produzido no Estado do Rio Grande do Sul, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
21. **SATTLER, J. A. G.**; NASCIMENTO, K. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Pólen Apícola: Compostos Bioativos e Propriedades Biológicas, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
22. **SATTLER, J. A. G.**; Souza B. R. ; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Presence of pro-vitamin A (alfa and beta-carotene) in dehydrated bee polen from brazilian state of Parana, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
23. **SATTLER, J. A. G.**; Souza B. R. ; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Presence of vitamin C in dehydrated bee pollen produced in georeferenced apiaries from southern Brazil., 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
24. **SATTLER, J. A. G.**; Souza B. R. ; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
PRO VITAMIN A (BETA-CAROTENE) VALUE OF DEHYDRATED BEE POLLEN IN SOUTHERN BRAZIL., 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
25. **SATTLER, J. A. G.**; Souza B. R. ; Araujo E. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
QUANTIFICATION OF VITAMIN E IN DEHYDRATED BEE POLLEN OF SOUTHERN BRAZIL., 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
26. SOUZA, BIANCA RODRIGUES; Oliveira C. M.; Araujo E. S.; **SATTLER, J. A. G.**; ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO
Teor de vitamina B2 em pólen apícola desidratado proveniente da região sul do Brasil, 2013. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
27. **SATTLER, J. A. G.**; MELO, A.; Soares, E. S.; SANTOS, L. B.; MEIRA, D. F. S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.
Quantificação de Vitamina E em Pólen Apícola Desidratado do Estado do Rio Grande do Sul, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Conferencista no(a) XXII Conbrapi - Congresso Brasileiro de Apicultura, 2018. (Congresso)
Atividades bioativas de pólen apícola.

2. Moderador no(a) **XXII Conbrapi - Congresso Brasileiro de Apicultura**, 2018. (Congresso)
Efeito do pólen transgênico sobre as abelhas e a exportação do mel.
3. **16º Evento da Série de Wokshops Internacionais sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde** -, 2017. (Outra)
.
4. Apresentação Oral no(a) **21th International Congress of Nutrition**, 2017. (Congresso)
Presence of phytosterols in bee pollen from eucalyptus sp.: identification and evaluation of the impact of the collection period and geolocation.
5. Simposista no(a) **21º Seminário Estadual de Apicultura - RS**, 2017. (Seminário)
Produtos da colmeia: identificação de bioativos e propriedades biológicas.
6. Avaliador no(a) **25º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP 2017 - SIICUSP**, 2017. (Simpósio)
Participação como avaliador do 25º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP 2017 - SIICUSP.
7. **Simpósio Atualidades em Suplementação Alimentar**, 2017. (Simpósio)
.
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **3º Prof. Eric A. Newsholme Research Symposium - Metabolic Regulation**, 2016. (Simpósio)
Conjugated alpha-linolenic acids are incorporated into phospholipids as conjugated linoleic acid enhance the production of eicosanoids in liver.
9. **Food Security a Multidisciplinary Challenge**, 2016. (Outra)
.
10. **XV Simpósio de Biossegurança e Segurança Química e Biológica em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2016. (Simpósio)
.
11. Simposista no(a) **XX Congresso Brasileiro de Nutrologia**, 2016. (Congresso)
Alimentos Funcionais.
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXI Congresso Brasileiro de Apicultura e VII Congresso Brasileiro de Meliponicultura**, 2016. (Congresso)
O pólen apícola como uma fonte potencial de Beta-sitosterol: Um estudo piloto.
13. **Algas marinhas como fonte de antioxidantes naturais: análise dos resultados de Halimeda spp e Bryothamnion sp.**, 2015. (Seminário)
.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **17th World Congress of Food Science and Technology & EXPO**, 2014. (Congresso)
Presence of vitamin C in dehydrated bee pollen produced in georeferenced apiaries from southern Brazil.
15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2014. (Congresso)
Pólen Apícola: Compostos Bioativos e Propriedades Biológicas.
16. **12º Evento da Série de Workshops Internacionais Sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde**, 2013. (Seminário)
.
17. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IUNS 20 Congress of Nutrition**, 2013. (Congresso)
QUANTIFICATION OF VITAMIN E IN DEHYDRATED BEE POLLEN OF SOUTHERN BRAZIL.
18. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXXIII International Apicultural Congress**, 2013. (Congresso)
PRO VITAMIN A (BETA-CAROTENE) VALUE OF DEHYDRATED BEE POLLEN IN SOUTHERN BRAZIL.
19. Apresentação de Poster / Painel no(a) **19º Congresso Brasileiro de Apicultura**, 2012. (Congresso)
Quantificação de Vitamina E em Pólen Apícola Desidratado do Estado do Rio Grande do Sul.
20. **VIII Symposium on Lipids and Health**, 2012. (Simpósio)
.
21. **10º Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade e Qualidade de Vida**, 2009. (Congresso)
.
22. **2º Simpósio Internacional da Nutrition Society (UK)**, 2009. (Simpósio)
.
23. **4º Simpósio Internacional da American Dietetic Association (USA)**, 2009. (Simpósio)
.
24. **5º Fórum Nacional de Nutrição**, 2009. (Outra)
.
25. **I Jornada dos Formandos de Nutrição**, 2008. (Outra)
.
26. **I Jornada Acadêmica de Nutrição da UFRGS**, 2007. (Outra)
.
27. **IV Jornada de Saúde e Nutrição - FFFCMPA**, 2007. (Outra)
.
28. **IX Encontro de Nutrição do HSL**, 2007. (Encontro)
.
29. **VI Jornada de Terapia Nutricional**, 2007. (Outra)
.
30. **61º Congresso de Cardiologia do RS**, 2006. (Congresso)
.
31. **60º Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2005. (Congresso)
.
32. **Há Interesse Social na Transgenia em Alimentos - CONSEA-RS**, 2005. (Seminário)
.
33. **I Jornada Científica de Enfermagem**, 2005. (Outra)
.
34. **II Jornada de Saúde e Nutrição**, 2005. (Outra)
.
35. **III Simpósio de Obesidade do Mercosul**, 2005. (Simpósio)
.
36. **VII Encontro de Nutrição do Hospital São Lucas da PUCRS**, 2005. (Encontro)
.
37. **Semana da Alimentação**, 2003. (Seminário)

Organização de evento

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impcv.trata

Página 8 de 9

1. SATTLER, J. A. G.
Jurado no 8º Concurso de Produtos da Agroindústria Familiar, 2016. (Concurso, Organização de evento)
2. SATTLER, J. A. G.
WORLD BEEKEEPING AWARDS (Função de Juiz), 2013. (Concurso, Organização de evento)
3. SATTLER, J. A. G.
Coordenador da atividade "Palavra livre do apicultor" durante o 19º Congresso Brasileiro de Apicultura, 2012. (Congresso, Organização de evento)
4. SATTLER, J. A. G.
Coordenador de Sessão de Poster do 19º Congresso Brasileiro de Apicultura, 2012. (Congresso, Organização de evento)
5. SATTLER, J. A. G.
Coordenador do Simpósio Apiterapia durante o 19º Congresso Brasileiro de Apicultura, 2012. (Congresso, Organização de evento)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	10
Artigos aceitos para publicação	1
Capítulos de livros publicados	1
Revistas (Magazines)	1
Trabalhos publicados em anais de eventos	27
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)	4
Apresentações de trabalhos (Congresso)	16
Apresentações de trabalhos (Seminário)	1
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	2
Apresentações de trabalhos (Outra)	4

Produção técnica

Programa de Rádio ou TV (entrevista)	1
Site	3

Eventos

Participações em eventos (congresso)	13
Participações em eventos (seminário)	5
Participações em eventos (simpósio)	8
Participações em eventos (encontro)	2
Participações em eventos (outra)	9
Organização de evento (concurso)	2
Organização de evento (congresso)	3

Outras informações relevantes

- 1 Ministrou as aulas práticas/teóricas sobre "Análise de carotenoides em alimentos por cromatografia em coluna aberta" no dia 18/08/2015 e "Análise de tocoferóis por CLAE em alimentos" no dia 15/09/2015 para os alunos matriculados na disciplina de pós-graduação "ANÁLISE DE VITAMINAS EM ALIMENTOS - ASPECTOS ATUAIS (FBA - 871)" na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Proeficiência em língua Inglesa:

Certificate of Completion of the Mastering English Course (average 66,75) no Centro de Cultura Anglo Americana

TOEFL - Internet Based Test Examinee (English) Total Score: 73.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 09/09/2018 às 11:19:15.