



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM
MEDICAMENTOS

AYALA NARA PEREIRA GOMES

**Análise dos constituintes químicos dos polens apícolas monoflorais de dendê
(*Elaeis guineensis* Jacq.), piaçava (*Attalea funifera* Martius) e sensitiva
(*Mimosa pudica* Linn)**

RECIFE - PE

2021

AYALA NARA PEREIRA GOMES

**Análise dos constituintes químicos dos polens apícolas monoflorais de dendê
(*Elaeis guineensis* Jacq.), piaçava (*Attalea funifera* Martius) e sensitiva
(*Mimosa pudica* Linn)**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do título de Doutor (a) em
Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos

Orientador (a): Prof Dr (a) Tania Maria Sarmiento da Silva

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G633a Gomes, Ayala Nara Pereira
Análise dos constituintes químicos dos polens apícolas monoflorais de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.),
piaçava (*Attalea funifera* Martius) e sensitiva (*Mimosa pudica* Linn) / Ayala Nara Pereira Gomes. - 2021.
120 f. : il.
- Orientadora: Tania Maria Sarmiento da Silva.
Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Recife, 2022.
1. Pólen apícola. 2. Monofloral. 3. UPLC-DAD-qTOF-MS/MS. 4. Atividade leishmanicida. I. Silva, Tania
Maria Sarmiento da, orient. II. Título

AYALA NARA PEREIRA GOMES

**Análise dos constituintes químicos dos polens apícolas monoflorais de dendê
(*Elaeis guineensis* Jacq.), piaçava (*Attalea funifera* Martius) e sensitiva
(*Mimosa pudica* Linn)**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do título de Doutor (a) em
Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos

Comissão examinadora

Adriano Nunes da Cunha
(ITEP - Instituto de Tecnologia de Pernambuco)

Magna Suzana Alexandre Moreira
(UFAL – Universidade Federal de Alagoas)

Marcia Silva do Nascimento
(UFPE – Universidade Federal de Pernambuco)

Maria da Graça Campos
(Universidade de Coimbra – Faculdade de Farmácia)

Kristerson Reinaldo de Luna Freire
(UFPB – Universidade Federal da Paraíba)

Celso de Amorim Câmara
(UFRPE- Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Aprovada em _____ de _____ de 2021

*Às pessoas que mais amo na vida: Expedito Gomes,
Alvenir Pereira e Júlia Aparecida
pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional
que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.*

*Ao meu amigo Rogelio Moreno (in memoriam), que sua
alegria e resiliência sirvam sempre de exemplo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo;

À minha orientadora professora Dra. Tania Maria Sarmiento, pela confiança, desafios e dedicação, e pelo conhecimento ao longo desses anos no LaBiofito;

Aos professores Francisco de Assis, Pedro Rolim e seus alunos pelo auxílio na execução da identificação botânica e testes leishmanicida;

À professora Maria da Graça (Magui) por ter me recebido com tanto carinho na Universidade de Coimbra e pelos ensinamentos durante a minha estadia;

Ao Professor Artur Figueirinha da Universidade de Coimbra e suas alunas Patricia e Inês que foram companheiros diários de experimentos, almoços, cafés, e fizeram a rotina leve e produtiva;

Aos meus pais Expedito e Vene, que sempre me apoiaram e me deram força para enfrentar os desafios;

À minha irmã Júlia, meu porto-seguro, companheira de uma vida toda, a quem primeiro eu recorro em horas difíceis, sempre esteve ao meu lado, me incentivando e dando apoio;

À equipe do LaBiofito, que nunca mediu esforços para me ajudar dentro e fora do laboratório, mostrando que mais do que colegas de trabalho somos amigos de verdade;

Aos amigos que fiz no doutorado sanduiche, Larissa, Jonas e Raquel, que me fizeram sentir protegida e amparada longe de casa;

Às amigas da turma de doutorado, Anna, Maria Eduarda, Bárbara e Ingrid, pelo companheirismo nas aulas e nas viagens por deixa-las menos exaustivas;

Aos amigos que me incentivaram a fazer o doutorado e me fizeram ver que eu estava no caminho certo;

Aos técnicos de laboratório, Júlio e Patrícia pela ajuda com a determinação de minerais;

À CAPES pela bolsa de estudos e pela oportunidade de realizar um sonho de estudar fora do país;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“A abelha fazendo o mel
Vale o tempo que não voou”*

Beto Guedes/Ronaldo Bastos

A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.

Marie Curie

RESUMO

O pólen apícola é produzido através da coleta de centenas de grãos de pólen das flores das plantas somado a secreções salivares das abelhas *Apis mellifera*. O Nordeste brasileiro é a região que mais se destaca na produção do pólen apícola, principalmente o pólen apícola monofloral das palmeiras. Do ponto de vista econômico, nutricional e terapêutico o pólen apícola monofloral apresenta vantagem por apresentar características semelhantes. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar os constituintes químicos do pólen apícola monofloral coletados das espécies de dendê (*Elaeis guineensis*), piaçava (*Attalea funifera*) e sensitiva (*Mimosa pudica*) por Cromatografia a Líquido de Ultra-eficiência acoplada com detectores de Arranjo de Diodo e Espectrômetro de Massas quadrupolo e Tempo de Vôo (UPLC-DAD-qTOF-MS/MS), determinar o teor de fenólicos totais, teor de minerais e avaliar a atividade sequestradora dos radicais livres. A atividade leishmanicida foi avaliada para o biflavonoide rusflavona, isolado do pólen apícola de sensitiva. A análise palinológica das amostras mostrou a frequência polínica média de 62% de *A. funifera*, 90% de *M. pudica* e 62% de *E. guineensis*. Através da análise por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS foi possível identificar três principais classes de compostos: derivados de espermidinas, lipídeos e flavonoides. Do pólen apícola de *M. Pudica* foram isolados os biflavonoides rusflavona, amentoflavona e rusflavanona. A rusflavona apresentou atividade leishmanicida contra as formas promastigota e amastigota de *L. amazonenses*. Os polens apresentaram os minerais predominantes: magnésio seguido por potássio, sódio, cálcio e manganês, além de traços de zinco, ferro e selênio. As amostras ainda apresentaram atividade antirradicalar que pode estar relacionada aos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides. Os resultados mostram que os polens apícolas monoflorais das espécies *Elaeis guineensis*, *Attalea funifera* e *Mimosa pudica* são potenciais fontes de compostos bioativos.

ABSTRACT

Bee pollen is produced by collecting hundreds of pollen grains from plant flowers plus salivary secretions from *Apis mellifera* bees. The Northeast of Brazil is the region that most stands out in the production of bee pollen, mainly monofloral bee pollen from palm trees. From an economic, nutritional and therapeutic point of view, monofloral bee pollen has the advantage of always presenting the same characteristics. In this sense, the objective of this work was to analyze the chemical constituents of monofloral bee pollen collected from oil palm (*Elaeis guineensis*), piassava (*Attalea funifera*) and sensitive (*Mimosa pudica*) species by UPLC-DAD-qTOF-MS/MS, to determine the total phenolic content, mineral content and evaluate the scavenging activity of free radicals. The leishmanicidal activity was evaluated for the biflavonoid rhusflavone, isolated from sensitive bee pollen. The palynological analysis of the samples showed an average pollen frequency of 62% of *A. funifera*, 90% of *M. pudica* and 62% of *E. guineensis*. Through the analysis by UPLC-DAD-qTOF-MS/MS it was possible to identify three main classes of compounds: spermidine derivatives, lipids and flavonoids. From the bee pollen of *M. pudica*, the biflavonoids rhusflavone, amentoflavone and rhusflavanone were isolated. Rhusflavone showed leishmanicidal activity against the promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*. The pollens had the predominant minerals: magnesium followed by potassium, sodium, calcium and manganese, in addition to traces of zinc, iron and selenium. The samples also showed anti-radical activity that may be related to phenolic compounds, mainly flavonoids. The results show that the monofloral bee pollens of the species *Elaeis guineensis*, *Attalea funifera* and *Mimosa pudica* are potential sources of bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Pólen apícola e tipo de coletor utilizado pelos apicultores	16
Figura 2 <i>Attalea funifera</i> Mart. (Arecaceae). A-B: grãos de pólen (corado com lactofenol azul de anilina), C: Inflorescência	18
Figura 3 Espécies vegetais usadas no manejo de polens apícolas. (A) <i>Elaeis guineensis</i> (B) <i>Attalea funifera</i> (C) <i>Mimosa pudica</i>	20
Figura 4 Cromatogramas UPLC-DAD (319 nm) do extrato EtOH (A), fração AcOEt (B) e MeOH:H ₂ O (C) de pólen apícola monofloral de <i>M. pudica</i>	54
Figura 5 Cromatograma do íon pico base (BPI) do extrato EtOH (A), fração AcOEt (B) e MeOH:H ₂ O (C) de pólen apícola monofloral de <i>M. pudica</i> por UPLC-QTOF-MS em modo negativo.....	55
Figura 6 Cromatograma do íon pico base (BPI) da fração hexano de pólen apícola monofloral de <i>M. pudica</i> por UPLC-QTOF-MS em modo positivo.....	56
Figura 7 Cromatograma do íon pico base (BPI) obtido em modo negativo de quatro frações representativas de <i>M. pudica</i> obtidas por Sephadex LH-20 analisada por UPLC-DAD-qTOF-MS.	59
Figura 8 Proposta de formação de íons produto de Isoramnetina-3-neohesperosideo (9) em ESI negativo (A) Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados (B).....	60
Figura 9 Proposta de formação de íons produto de rusflavona (54) em ESI negativo (A) Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados (B).	61
Figura 10 Proposta de formação de íons produto de <i>N',N''</i> -dicafeoil, <i>N''</i> -coumaroil espermidina (25) em ESI negativo (A). Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados (B).....	62
Figura 11 Cromatograma do íon pico base obtido por MS ^E (UPLC-qTOF/MS ^E) em modo negativo (A), e cromatograma do íon pico base obtido por MS ^E (UPLC-qTOF/MS ^E) em modo negativo da fr Hex (B) obtidas por partição do pólen apícola de <i>A. funifera</i>	74
Figura 12 Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados a partir de LPC 18:3/0:0 (Isômeros 73 e 79) em ESI negativo	75
Figura 13 Cromatograma do íon pico base (BPI) obtido em modo negative de três frações representativas de <i>E. guineensis</i> obtidas por SPE analisada por UPLC-qTOF-MS.....	77

Figura 14 Espectro de RMN de ^1H de 54 (rusflavona) em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).....	84
Figura 15 Espectro de APT de 54 (rusflavona) em $\text{DMSO-}d_6$ (125 MHz) (C – para cima e CH – para baixo).	85
Figura 16 Expansão do espectro de HMBC de 54 (rusflavona) em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).....	86
Figura 17 Espectro de COSY (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para 54 (rusflavona)	87
Figura 18 Espectro de dicroísmo circular de 54 (rusflavona)	88
Figura 19 Espectro de íons produto de 54 (rusflavona)	88
Figura 20 Espectro de RMN de ^1H de 61 (rusflavanona) em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) com expansões.....	91
Figura 21 Espectro de APT de 61 (rusflavanona) em $\text{DMSO-}d_6$ (1250 MHz) (C – para cima e CH – para baixo).....	92
Figura 22 Expansão do espectro de HMBC de 61 (rusflavanona) em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) (A) Expansão entre δ_{H} 5,70 a 6,25 ppm e δ_{C} 96 a 109 ppm (B) Expansão entre δ_{H} 5,75 a 6,25 ppm e δ_{C} 154 a 171 ppm.....	93
Figura 23 Espectro de dicroísmo circular de 61 (rusflavanona)	94
Figura 24 Espectro de íons produto e UV de 61 (rusflavanona).....	94
Figura 25 Efeitos da rusflavona em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . (A) Promastigotas na fase estacionária (3×10^6) foram incubados com meio M199 ou M199 mais rusflavona em concentrações de 0,20 a 200 μM , e a viabilidade foi determinada por MTT após 48 h de incubação. (B) Cinética de crescimento de promastigotas tratado com rusflavona ou M199. Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubados com meio M199 (controle) ou M199 mais rusflavona a 5 μM a 26 °C e o crescimento determinado diariamente usando uma câmara de Neubauer.	101
Figura 26 Mecanismos de ação da rusflavona sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . (A) Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em <i>L. amazonensis</i> tratada com rusflavona. (B) Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) de <i>L. amazonensis</i> exposto a rusflavona. (C) Determinação da integridade da membrana de <i>L. amazonenses</i>	103
Figura 27 Citotoxicidade da rusflavona em hemácias e macrófagos <i>in vitro</i> . (A) Atividade hemolítica: As taxas hemolíticas foram estimadas medindo a absorbância dos sobrenadantes de glóbulos vermelhos a 540 nm. (B) Viabilidade do macrófago: ensaios de MTT. (C) Atividade anti-amastigota.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos principais tipos polínicos (%) encontrados nas amostras de pólen apícola consideradas monoflorais de <i>Attalea funifera</i> Mart. coletadas na municipalidade de Nilo Peçanha, Bahia, Brasil.	33
Tabela 2 – Frequência polínica das espécies de <i>A. funifera</i> , <i>M. pudica</i> e <i>E. guineensis</i> nas amostras de polens apícolas.....	34
Tabela 3 - Comparação entre os compostos encontrados nas espécies <i>M. pudica</i> , <i>A. funifera</i> e <i>E. guineensis</i>	36
Tabela 4 - Caracterização de compostos de extratos de EtOH de pólen de abelha de <i>M. pudica</i> , EtOAc e frações MeOH:H ₂ O analisadas por UPLC-DAD-qTOF-MS ^E em modo negativo.....	48
Tabela 5 - Caracterização de compostos de frações hexano de pólen de abelha <i>M. pudica</i> por UPLC-qTOF-MS ^E em modo positivo.....	52
Tabela 6 - Caracterização de compostos em frações obtidas por Sephadex LH-20 (1–7) de pólen apícola de <i>M. pudica</i> por UPLC-DAD-qTOF-MS ^E	57
Tabela 7 - Compostos tentativamente identificados em pólen apícola monofloral de <i>A. funifera</i> por UPLC-DAD-qTOF-MS ^E	69
Tabela 8 - Compostos tentativamente identificados em pólen apícola monofloral de <i>E. guineensis</i> por UPLC-DAD-qTOF-MS ^E	78
Tabela 9 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 54 (rusflavona) obtida do pólen apícola de <i>M. pudica</i>	83
Tabela 10 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 61 (rusflavanona) obtida do pólen apícola de <i>M. pudica</i>	90
Tabela 11 - Teor de minerais nas amostras do pólen apícola de piaçava, dendê e sensitiva (mg/100g ± DP) e a dose diária recomendada para adultos (IDR).	97
Tabela 12 - Fenólicos totais e atividade antirradicalar do extrato e frações do pólen apícola de <i>A. funifera</i> e <i>M. pudica</i>	100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	22
2.1. Geral	22
2.2. Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Equipamentos, reagentes e padrões.....	23
3.2. Coleta das amostras e análises palinológicas.....	24
3.3. Extração e fracionamento dos polens apícolas	24
3.4. Isolamento dos compostos do pólen apícola de <i>M. pudica</i>	25
3.5. Determinação do teor fenólicos totais	26
3.6. Atividade sequestradora dos radicais DPPH [*] e ABTS ^{**}	26
3.7. Determinação do teor de minerais	27
3.8. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS	28
3.9. Atividade leishmanicida de rusflavona	28
3.9.1. Cultura de células e ensaio de viabilidade celular.	28
3.9.2. Espécies reativas de oxigênio e potencial de membrana mitocondrial..	29
3.9.3. Integridade da membrana celular, ensaio hemolítico e citotóxico	29
3.9.4. Atividade anti-amastigota	30
3.9.5. Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Análises palinológicas	32
4.2. Caracterização química por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS	35
4.2.1. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS do pólen apícola de <i>M. pudica</i> . 44	
4.2.2. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS do pólen apícola de <i>A. funifera</i> 63	
4.2.3. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS do pólen apícola de <i>E.</i> <i>guineensis</i>	76
4.3. Identificação dos compostos isolados do pólen apícola de <i>M. pudica</i>	82
4.4. Determinação do teor de minerais	95
4.5. Determinação do teor fenólicos totais e atividade antirradicalar	98
4.6. Atividade leishmanicida do biflavonoide rusflavona	101
5. CONCLUSÃO	105

6. REFERÊNCIAS	106
-----------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO

Os produtos apícolas como mel, própolis, cera e pólen, vêm sendo estudados devido suas propriedades nutricionais e aplicações terapêuticas, as quais são atribuídas à composição química e físico-química (ARES et al., 2018). O pólen apícola é produzido pela abelha *Apis mellifera L.* como resultado da coleta de grãos de pólen juntamente com secreções salivares. Estas cargas polínicas são transportadas para a colmeia, onde funcionam como fonte de proteínas e outros nutrientes para a colônia (BRIDI et al., 2018).

Os grãos de pólen são os gametófitos masculinos das plantas que possuem semente (espermatófitas), os quais formam uma unidade de dispersão envolvida na fertilização (PRIEU et al., 2017). Essas estruturas que variam de 15 a 200 μm , são produzidas na estrutura reprodutiva masculina chamada antera e levadas ao estigma, estrutura reprodutiva feminina (PACINI, 2008).

As plantas são classificadas como autógamos ou alógamos. As plantas autógamas usam para polinização o pólen da mesma flor ou de uma flor diferente da mesma planta, enquanto as plantas alógamos usam o pólen de outra planta. A polinização com o pólen de outra flor resulta em melhores sementes e rendimentos. No caso de plantas alógamos, para a polinização elas precisam de um fator externo, como vento, água ou animais. Entre os animais, os insetos desempenham um papel dominante nesse sentido (ECKERT; HERLIHY, 2004).

A polinização é considerada um importante serviço ecossistêmico, sendo oferecido pela natureza com função de perpetuar o bioma, e através desse processo biológico de interação mutualista entre plantas e animais, a natureza os fornece alimento e conseqüentemente aos seres humanos (POPAK; MARKWITH, 2019). Adicionalmente, a polinização biótica é considerada o principal fator na diversificação de alguns grandes grupos de plantas e animais. A estimativa de espécies polinizadas por animais varia de 78% na zona temperada para 94% nas localidades tropicais (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011). Outro dado relevante é que cerca de 70% das culturas tropicais parecem ter pelo menos uma variedade cuja produção é melhorada pela polinização animal (KLEIN et al., 2007).

O valor econômico dos serviços globais de ecossistemas é enorme e crescente. Cerca de 22,6% da produção agrícola nos países em desenvolvimento e 14,7% nos

países desenvolvidos dependem da polinização por insetos. No mundo, cerca de 35% da produção de alimentos também são dependentes desse tipo de polinização. O valor da polinização de plantas cultivadas no mundo foi estimado em US \$ 153 bilhões (MAJEWSKI, 2018). Estudos têm demonstrado uma redução em todo o mundo de polinizadores, sendo as causas associadas a patógenos, redução e perda de habitat, competição por recursos com espécies invasoras, práticas agrícolas agressivas (como uso inadequado de pesticidas) e mudança climática. Por conta disso, estão sendo criados programas de monitoramento em todo o mundo com o intuito de examinar esse declínio (GIANNINI et al., 2015).

No Brasil, um estudo recente utilizou abordagem monetária para avaliar os serviços de polinização fornecidos por duas áreas protegidas nas regiões Norte e Sudeste nos biomas da floresta Amazônica e da Mata Atlântica, respectivamente. Foi observado que na região Norte, o valor monetário total anual dos serviços de polinização realizados por insetos foi estimado em aproximadamente 564.000 dólares e no Sudeste 246.000 dólares, ambos para 2016 (HIPÓLITO et al., 2019).

Vários estudos demonstram a importância econômica global da polinização realizada por abelhas, as *Apis mellifera* são as espécies manejadas mais comuns, pois possuem quatro principais características que justificam o uso nessa atividade: são polinizadores generalistas fisicamente capazes de polinizar muitas espécies vegetais diferentes, existem em grandes colônias perenes com até 30.000 indivíduos disponíveis para polinização das culturas durante o ano todo, são capazes de procurar em grandes distâncias, de modo que sua colocação em grandes campos de monocultura lhes permita prestar serviços de polinização em uma ampla área e elas se comunicam com outros membros da colmeia em relação à localização das fontes de alimento (ALEBACHEW, 2018).

Essa espécie vive em colônias altamente sociais e organizadas, geralmente exibem tamanhos populacionais superiores a 40.000 indivíduos, dependendo da estação há um volume maior de trabalhadores designados para captar recursos, como pólen e néctar, para sustentá-los durante os meses de inverno, quando o tamanho da população é reduzido. As colônias são compostas por uma única rainha, algumas centenas de zangões machos e milhares de abelhas operárias, além de desenvolver ovos, larvas e pupas (coletivamente conhecidas como ninhada) dentro do favo de mel (WINSTON, 1988).

Os grãos de pólen passam a ser chamados de pólen apícola após a coleta nas flores pelas abelhas, uma vez que as mesmas depositam secreções salivares sobre os grãos que leva à modificação química na composição (BRASIL, 2001). Os grãos de pólen coletados são transportados até a colmeia nas corbículas, que são cavidades nas patas posteriores das operárias, nas quais são depositadas as cargas de pólen ou resinas para alimentar as larvas e adultos, que contribui para o desenvolvimento desses insetos (RAMOS; CARVALHO, 2007).

A coleta desse material pelo apicultor é realizada em uma grade de retenção (coletor), localizado próximo a entrada da colmeia, onde as bolotas caem num recipiente coletor durante a passagem das abelhas. Ao final da coleta, observam-se bolotas de coloração variável, mostrando as diferentes espécies botânicas coletadas pelas abelhas, essa mistura é conhecida por “mix” polínico, e este material é removido pelo apicultor para comercialização e consumo humano e/ou animal (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005). A Figura 1 mostra a coleta de pólen apícola pelos apicultores utilizando esse tipo de recipientes.

Figura 1 Pólen apícola e tipo de coletor utilizado pelos apicultores



Fonte: Francisco Santos

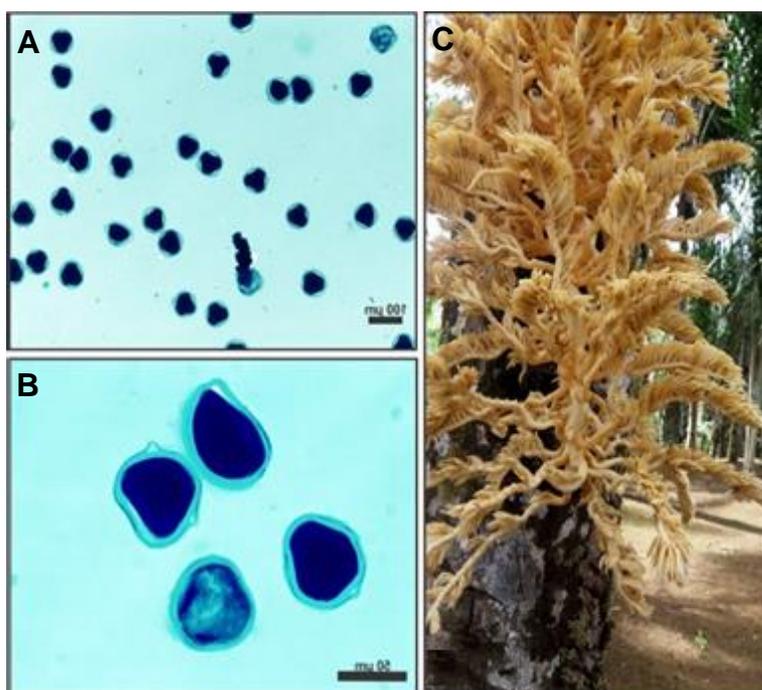
A composição do pólen apícola apresenta uma grande variedade que inclui carboidratos (60-80%) (KOSTIC et al., 2015), proteínas (15-30%) (TAHA, 2015), fibras (0,3-15%) (REBELO; FERREIRA; CARVALHO-ZILSE, 2016) e lipídeos (1-5%) (CARPES et al., 2009), além de vitaminas (incluindo ácido fólico, tocoferol, β -caroteno e complexo B) (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015), minerais (K, P, Ca e Mg) e oligoelementos (Zn, Fe, Cu e Cr) (SILVA et al., 2014). Dentre os principais metabólitos secundários relatados estão os carotenoides, compostos fenólicos (principalmente flavonoides), poliaminas conjugadas a derivados do ácido cinâmico, como o ácido p-cumárico, ácido caféico e ácido ferúlico e terpenos (CONTE et al., 2018, CALDAS et al., 2019).

Devido à variedade de metabólitos primários e secundários que possuem, os pólenes apícolas apresentam propriedades terapêuticas potenciais, com antioxidante (FREIRE et al., 2012), antimicrobiana (CALDAS et al., 2019), antiviral (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015), anti-inflamatória (LI et al., 2017), antimutagênica (DIAS et al., 2016), hepatoprotetora (AL-DAIHAN; BHATA, 2019) e antialérgica (JANNESAR et al., 2017), as quais têm sido atribuídas à composição química. Compostos como biflavonoides, já relatados anteriormente em pólen apícola (CALDAS et al., 2019), mostraram potencial atividade leishmanicida (RIZK et al., 2021, GERVAZONI et al., 2020). A leishmaniose é considerada um importante problema de saúde pública em todo o mundo, e os medicamentos disponíveis para quimioterapia apresentam várias limitações, como alta toxicidade, emergência de resistência, falha no tratamento e alto custo (SANTOS et al., 2020; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Portanto, novas alternativas terapêuticas são urgentemente necessárias e, nesse contexto, os biflavonoides e seus derivados têm sido relatados como fontes de compostos potenciais para uso contra as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis* (GONTIJO et al., 2012).

Cada pólen tem características específicas com base nas espécies de flores visitadas pelas abelhas, com isso a composição química difere com base em uma variedade de fatores, incluindo origens botânicas e geográficas, espécies de abelhas, bem como condições ambientais, época de coleta e tipo de solo (ALIMOGLU et al., 2021, LI et al., 2018). Quando há uma única origem botânica predominante o pólen apícola é chamado monofloral e mantém a composição química e propriedades organolépticas e bioquímicas da espécie vegetal coletada. Enquanto o pólen

heterofloral possui grande variabilidade dos tipos de pólen, mostrando composição variada (SARAIVA et al., 2018). A análise palinológica é o método mais representativo para identificar as origens botânicas do pólen apícola, e a determinação é feita através da frequência polínica. A Figura 2A mostra grãos de polens da espécie *A. funifera* corados com azul de anilina e na Figura 2B é possível observar a imagem expandida. A inflorescência da espécie é mostrada na Figura 2C. Louveaux, Maurizio e Vorwohl (1978) estabeleceram uma faixa para determinação da frequência em quatro tipos: pólen predominante (> 45% do total de grãos de pólen), pólen secundário (16-45%), pólen menor importante (3-15%) e pólen menor (<3%). No entanto, trabalhos recentes mostram a importância de análises volumétricas em adição às análises quantitativas e de frequência para definição de pólen apícola monofloral (ALVES; SANTOS, 2018b).

Figura 2 *Attalea funifera* Mart. (Arecaceae). A-B: grãos de pólen (corado com lactofenol azul de anilina), C: Inflorescência



O Nordeste brasileiro é a região que mais se destaca na produção do pólen apícola, apontada como uma das áreas de maior potencial para a apicultura no país, principalmente os estados do Piauí, Ceará e Bahia, tendo este último, grande potencial para o desenvolvimento dessa atividade, sobretudo para o tipo monofloral, devido amplas plantações de palmeira, em particular de dendê (*Elaeis guineensis* L.) e piaçava (*Attalea funifera* Mart.) (ALVES; SANTOS, 2018b).
GOMES, A. N. P.

A família Arecaceae, conhecida genericamente como palmeira, possui origem nativa e cerca de 40 gêneros e mais de 290 espécies aceitos atualmente no Brasil (FLORA DO BRASIL 2020). Apresentam grande relevância na subsistência de muitas comunidades tradicionais, uma vez que todas as partes apresentam potencial de uso, destacam-se quanto ao potencial ecológico econômico, pois além do uso do fruto e palmito na alimentação *in natura* ou processados como doces, bebidas, óleos e no artesanato (ARRUDA; SILVA; SANDER, 2014).

Attalea funifera (piaçava) (Figura 3A) é uma espécie nativa e endêmica do sul do estado da Bahia e tem importância econômica principalmente no Nordeste brasileiro devido à extração de suas fibras (MIRANDA et al., 2015). *Elaeis guineensis* (dendezeiro) (Figura 3B) possui destaque econômico devido à extração de óleo, usado na indústria farmacêutica e alimentícia (CHAGAS et al., 2019). Ambas as espécies são muito utilizadas pelos apicultores locais para a produção de pólen monofloral, a ocorrência de espécies da família Arecaceae em pólen apícola é de grande relevância do ponto de vista comercial, pois a presença desse tipo de pólen na amostra cria uma textura distinta e sabor que os consumidores gostam e agrega valor nutricional (ALVES; SANTOS, 2018a). As abelhas estão entre os principais responsáveis pelo processo de polinização em palmeiras, sendo consideradas mais importantes e eficazes quando comparadas a outros polinizadores de insetos (SIREGAR; ATMOWIDI; KAHONO, 2016).

Alguns fatores afetam a visita da abelha às flores, como temperatura, umidade relativa e velocidade do vento. As coletas das abelhas são variáveis no que se refere ao grau de especialização para a exploração de recursos alimentares, ou seja, abelhas como *Apis mellifera* apresentam comportamento generalista, sem especificidade por uma espécie vegetal, essa busca é chamada de forrageamento (ALVES; SANTOS, 2018a; MALERBO-SOUZA; SILVA, 2011). No entanto algumas espécies de plantas são consideradas mais importantes para o pasto regional das abelhas, como a espécie *Mimosa pudica* (Fabaceae) (Figura 3C), conhecida popularmente como, sensitiva, dorme-dorme ou dormideira (DOREA; NOVAIS; SANTOS, 2010). O pólen do gênero *Mimosa* é frequentemente encontrado em produtos apícolas e é conhecido por ser um recurso muito importante para as abelhas (NOVAIS; LIMA; SANTOS, 2009). Outra razão para esta preferência pode ser explicada pelo 'boom' de floração, característico da família Fabaceae, ou seja,

facilmente ocorre floração. Além disso, a acessibilidade das abelhas às flores, que são altamente poliníferas, facilita o aparecimento em larga escala nos produtos apícolas (ALVES; SANTOS, 2018b).

Figura 3 Espécies vegetais usadas no manejo de polens apícolas. (A) *Elaeis guineensis* (B) *Attalea funifera* (C) *Mimosa pudica*.



Fonte: Alexsandro dos Santos, Francisco Santos e Ayala Pereira

Além das propriedades nutricionais e aplicações terapêuticas dos produtos apícolas, a apicultura é uma das poucas atividades agrícolas que tem um impacto econômico, social e ambiental positivo, o que torna necessário o incentivo, agregando valor comercial aos produtos (DE-MELO et al., 2018). Para isso é preciso garantir a qualidade do produto quanto a presença dos principais componentes. Do ponto de vista econômico, nutricional e terapêutico o pólen apícola monofloral apresenta vantagem por apresentar sempre as mesmas características físico-químicas e químicas, o que confere sempre as mesmas propriedades do produto. Ademais, a determinação do perfil químico do pólen apícola por espectrometria de massas e todo o estudo fitoquímico continua sendo uma área pouco explorada, existindo novos compostos de alto potencial biológico ainda a ser descobertos, portanto, considera-se

GOMES, A. N. P.

importante a caracterização dos compostos químicos presentes no pólen apícola monofloral a fim de que se possam encontrar novas substâncias com atividades promissoras.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Analisar os constituintes químicos do pólen apícola monofloral das espécies: dendê (*Elaeis guineensis*), piaçava (*Attalea funifera*) e sensitiva (*Mimosa pudica*) e avaliar a atividade leishmanicida dos compostos isolados.

2.2. Específicos

- 2.2.1. Determinar a origem botânica dos polens apícolas;
- 2.2.2. Analisar os constituintes químicos dos polens apícolas monoflorais por Cromatografia a Líquido de Ultra-eficiência acoplada com detectores de Arranjo de Diodo e Espectrômetro de Massas quadrupolo e Tempo de Vôo (UPLC-DAD-qTOF-MS/MS)
- 2.2.3. Determinar o teor de minerais presentes nas amostras;
- 2.2.4. Determinar a atividade antirradicalar frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+};
- 2.2.5. Isolar e identificar os principais compostos dos polens apícolas de piaçava e sensitiva;
- 2.2.6. Testar atividade leishmanicida dos compostos isolados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos, reagentes e padrões

A análise dos minerais foi feita em espectrômetro de absorção atômica sequencial com atomização em chama (AA240FS – Fast Sequential, Varian, Mulgrave, Austrália), com correção da radiação de fundo feita por lâmpada de deutério. Lâmpadas de cátodo oco foram utilizadas como fontes de radiação primária para cada mineral e a chama ar/acetileno foi utilizada em todos os experimentos. Ainda nesta análise utilizou-se um acessório de geração de vapor (VGA-77, Varian, Mulgrave, Austrália), para geração de hidretos (HGAAS, do inglês Hydride Generation AAS). Soluções padrão a 1000 ppm dos minerais cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), sódio (Na), zinco (Zn) e selênio (Se) (Qhemis-Hexis, São Paulo, Brasil) foram utilizados para obtenção das curvas padrão. Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para digestão das amostras, realizada em micro-ondas (Mars Xpress, CEM, São Paulo, Brasil).

As análises cromatográficas em coluna (CC) foram realizadas tendo como suporte Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia). Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 60F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e como reveladores foram utilizados, o reagente NP (ácido difenilbórico etanolamina-MeOH) e detecção por irradiação ultravioleta 254 e 366 nm (LUB01, Boitton, Porto Alegre, Brasil). Para a extração em fase sólida foi utilizado cartuchos Strata C18-E (Phenomenex-Allcrom, São Paulo, Brasil). Foi utilizado o solvente etanol (EtOH), (Cinética, São Paulo, Brasil) e banho ultrassônico 3,5 L (Unic 1600A, Unique, São Paulo, Brasil) para extração do pólen.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros (DRX-500, Bruker), 500 e 155 MHz, respectivamente. As amostras foram preparadas com dimetil sulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$) e TMS foi usado como padrão interno de referência.

Para a identificação dos compostos químicos foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a um espectrômetro de massas XEVO-G2XSQTOF (Waters, Manchester, UK) com ionização por eletrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Acquity BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μm , Waters, EUA) a 40°C.

GOMES, A. N. P.

Todas as análises foram realizadas utilizando o lockspray para garantir a precisão e reprodutibilidade dos valores de massas. Leucina-encefalina (200 pg mL⁻¹) foi utilizado como padrão/referência para calibração. A aquisição e análise dos dados foi realizada utilizando o software Waters MassLynx.

A leitura de absorbância para determinação das atividades antirradicais foi realizada no aparelho (Asys HiTech UVM 340, Biochrom, EUA), utilizando placa de 96 poços. Foram utilizados os seguintes reagentes: folin-ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), trans- β -caroteno, trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico 97%), ABTS [2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) sal de diamônio 98%], ácido gálico, ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha), carbonato de sódio, persulfato de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

3.2. Coleta das amostras e análises palinológicas

10 amostras de polens apícolas monoflorais foram coletadas na municipalidade de Nilo Peçanha, Bahia, Nordeste do Brasil, com ajuda dos apicultores e professores envolvidos no projeto Pindorama, que visa o aproveitamento de resíduos e recursos das palmeiras do Nordeste. Destas 5 foram identificadas como monoflorais para *E. guineensis*, 4 para *M. pudica* e 1 para *A. funifera*.

As análises palinológicas foram realizadas pela equipe do professor doutor Francisco de Assis dos Santos seguindo o protocolo de Alvarado e Delgado (1985) com modificações propostas por Novais, Lima e Santos (2009). O tipo de pólen foi identificado por comparação com lâminas da palinoteca do Laboratório de Micromorfologia Vegetal da Universidade Estadual Feira de Santana, Brasil.

3.3. Extração e fracionamento dos polens apícolas

As amostras dos polens de *E. guineensis*, *M. pudica* e *A. funifera* (100,0 g) foram extraídas com etanol sob agitação com auxílio de banho de ultrassom por 30 minutos (processo repetido por 4 a 5 vezes). As soluções extrativas foram filtradas e concentradas usando um evaporador rotativo a 40 °C para fornecer o extrato etanólico. Uma porção do extrato etanólico (Ext EtOH) foi dissolvida com de metanol: água (1:1 v/v) e realizada uma partição (extração líquido-líquido) com hexano e

GOMES, A. N. P.

acetato de etila fornecendo as frações denominadas Fr Hex, Fr AcOEt e Fr MeOH/H₂O.

Os extratos etanólicos (100,0 mg) foram dissolvidos com 2 mL de metanol:água:HCl (1,5:0,5 v/v, pH 2,0) e agitada com um agitador magnético à temperatura ambiente por 10 min. O cartucho C18 foi sequencialmente condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de água deionizada sem permitir que o cartucho seque. O filtrado foi eluído através do cartucho e lavado com 10 mL de água e as amostras foram então eluídas com 50 mL de metanol grau HPLC. As amostras denominadas Fr MeOH SPE e Fr AcOEt SPE foram secas sob pressão reduzida em um evaporador rotativo a 40 °C e dissolvidas em metanol, filtradas através de um filtro de nylon de 0,45 µm e injetadas em UPLC-DAD-qTOF-MS/MS.

3.4. Isolamento dos compostos do pólen apícola de *M. pudica*

A fração AcOEt obtida por partição do pólen apícola de *M. pudica* (20,0 g), foi submetida a cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20, eluída com metanol sucessivamente para obtenção das frações mais puras. Dez frações foram coletadas, analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reveladas em câmara de UV (254 e 366 nm) e reagente NP e reunidas de acordo com o fator de retenção. Três compostos apresentaram-se puros, sendo um deles comparado com padrão através do tempo de retenção, UV e dados de espectrometria de massas de alta resolução, sendo identificado como amentoflavona (**55**), um biflavonoide já identificado por LC/MS em pólen apícola de *M. pudica* (CALDAS et al., 2019). As substâncias isoladas apresentaram propriedades físicas (amarela e amorfa) e tempo de retenção semelhantes. As frações que não estavam puras foram analisadas por LC/MS para identificação de todos os constituintes. A identificação dos outros dois principais biflavonoides foram identificados através dos dados de massas obtidos por LC/MS e técnicas espectroscópicas de UV, RMN de ¹H e ¹³C, incluindo técnicas bidimensionais (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura.

Dados do biflavonoide amentoflavona identificado através da comparação com padrão autêntico:

Amentoflavona (**55**): Pó amarelo amorfo, UV (MeOH) λ_{máx}: 335 nm; ESI-MS (negativo) *m/z* 537,0813 ([M-H]⁻; Calculado para C₃₀H₁₇O₁₀; 537,0827).

3.5. Determinação do teor fenólicos totais

O teor de fenólicos totais das amostras foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com o método de Slinkard e Singleton (1977) modificado usando o ácido gálico como um composto fenólico padrão. Inicialmente as amostras foram solubilizadas em etanol nas concentrações de 1,0 mg/mL. Uma alíquota de 50 µL de cada solução foi transferida para um Eppendorff, 20 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 870 µL de água destilada foram adicionados e agitando por 1 min. Em seguida, 60 µL da solução de Na₂CO₃ (15%) foram adicionados à mistura e agitados por 30 segundos, resultando na concentração final de 50 µg/mL para as amostras. A absorbância foi medida a 760 nm em um espectrofotômetro. A quantidade total de compostos fenólicos foi determinada em microgramas equivalentes de ácido gálico, usando a equação obtida no gráfico padrão de ácido gálico.

3.6. Atividade sequestradora dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}

Os testes foram realizados seguindo a metodologia descrita por Silva et al. (2006). As soluções de extratos e frações foram preparadas inicialmente na concentração de 5,0 mg/mL. A partir dessas soluções, alíquotas foram transferidas para microtubos contendo um volume de 450 µL de solução DPPH[•] (23,6 µg/mL em EtOH), resultando em concentrações variando de 20 a 500 µg/mL. O teste foi realizado ao abrigo da luz e as concentrações foram testadas em triplicata. Após 30 min, a quantificação dos radicais DPPH[•] restantes foi registrada usando absorção a 517 nm. A porcentagem de inibição foi dada pela seguinte fórmula:

$$\%AS = \frac{\{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra})] \times 100\}}{Abs_{controle}}$$

Onde $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle negativo, contendo apenas a solução de DPPH[•], e $Abs_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença da amostra ou do controle positivo.

A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPadPrism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da CE_{50} (concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres) \pm D.P. (desvio padrão).

O cátion radical ABTS ($ABTS^{*\cdot}$) foi produzido reagindo uma solução-mãe ABTS com persulfato de potássio 2,45 mM (concentração final) a mistura permaneceu no escuro à temperatura ambiente por 12 a 16 h antes do uso. A solução $ABTS^{*\cdot}$ foi diluída com etanol para dar uma absorbância de $0,700 \pm 0,025$ a 734 nm antes de seu uso. Soluções estoque (1 mg/mL) das amostras foram preparadas em etanol, diluídas nas concentrações apropriadas e misturadas com a solução $ABTS^{*\cdot}$, produzindo concentrações finais de amostra que variaram de 10 a 150 μ g/mL. Após 10 minutos, a porcentagem de inibição de absorbância a 734 nm foi calculada para cada concentração relativa à absorbância em branco (etanol). A capacidade de eliminar o radical $ABTS^{*\cdot}$ foi calculada da mesma maneira que o ensaio DPPH $^{\cdot}$.

3.7. Determinação do teor de minerais

A digestão do pólen foi realizada em um sistema fechado de digestão com ácido em micro-ondas. As amostras (500,0 mg) foram diluídas em ácido nítrico concentrado (10 mL). O seguinte método foi utilizado para digestão: de 0-5 minutos a temperatura passou de ambiente a 120°C, com 800 W de potência; 5-10 minutos permaneceu à 120°C; 10-15 minutos a temperatura passou de 120 a 160°C, com 1600 W de potência; 15-23 minutos permaneceu constante à 160°C e de 23-30 minutos ocorreu o resfriamento das amostras (SILVA et al., 2014). Após o resfriamento, a solução foi filtrada para remover qualquer material sólido restante e diluída com água deionizada. A análise de metais (Cu, Fe, K, Mn, Zn, Na, Mg, Ca e Se) foi realizada com auxílio de um espectrômetro de absorção atômica sequencial com atomização em chama, com correção da radiação de fundo feita por lâmpada de deutério sob os parâmetros ótimos estabelecidos, curvas de calibração padrão para metais foram construídas através da plotagem da absorbância contra a concentração em uma faixa definida para cada metal e observada a linearidade. Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores obtidos para o teor de minerais nas amostras foram calculados como mg/kg de pólen.

3.8. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS

Para separação cromatográfica foi utilizada fase móvel binária que consistiu de água com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi mantido em 0,4 mL/min e o volume de injeção foi 5,0 µL. O gradiente de eluição utilizado para análises das amostras de *M. pudica* (extrato EtOH, e frações AcOEt e MeOH:H₂O) e *E. guineensis* foi: 0,0-8,0 min 10%-50% de B; 8,0-9,0 min, 50%-95% de B e em 9,1 min 10% de B, e para as de *M. pudica* (fração hexano) e *A. funifera* foi: 0,0-8,0 min 10%-50% de B; 8,0-20,0 min, 50%-95% de B; 20,0-24,0 min, 100% de B e em, 25 min 10% de B. Métodos diferentes foram utilizados na tentativa de obter melhores separações cromatográficas e consequentemente maior número de substâncias identificadas.

O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo e positivo de ionização (ESI⁻ e ESI⁺) no modo sensibilidade. O alcance da varredura foi de 50 a 1200 *m/z* para aquisição de dados. Além disso, experimentos MS^E foram realizadas, o que permitiu a aquisição de ambos os precursores e dados de íons de produto em uma injeção. As condições da fonte foram as seguintes: tensão capilar, 3,0 kV; temperatura da fonte, 120 ° C; temperatura de dessolvatação, 450 °C; taxa de fluxo de gás do cone, 100 L/h; e taxa de fluxo do gás de dessolvatação (N₂), 800 L/h. Todas as análises foram realizadas utilizando o Lock Spray, que garantiu precisão e reprodutibilidade. Leucina-encefalina (200 pg/mL) foi usada como padrão ou composto de referência para calibrar espectrômetro de massa durante análise e introduzida por um spray de bloqueio a 10 µL/min para precisão.

3.9. Atividade leishmanicida de rusflavona

Os ensaios leishmanicida foram realizados em colaboração com a equipe do professor doutor Pedro Roosevelt Torres Romão na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

3.9.1. Cultura de células e ensaio de viabilidade celular.

L. amazonensis (cepa MHOM/BR/73/2269) foi isolada pela drenagem dos linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados e mantida como

promastigota em meio M199, conforme descrito anteriormente (DAGNINO et al., 2018).

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (3×10^6 em fase estacionária) foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas em meio M199 com 10% de soro fetal bovino (SFB) na presença dos compostos isolados nas concentrações de 0 a 200 μM por 48 h. Anfotericina B (0,5 μM , Sigma, EUA) foi usada como medicamento anti-leishmania padrão. As células de controle foram incubadas com meio M199. A viabilidade de *Leishmania* foi medida usando o ensaio de brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MARTINS et al., 2018). Para avaliar o efeito da rusflavona no crescimento de *L. amazonensis in vitro* formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento foram incubadas em microplacas de 12 poços a uma densidade de $1 \times 10^5/\text{mL}$ em meio M199 (controle) ou M199 mais rusflavona a 5 μM (valor IC_{50} por 48 h de incubação). O número de parasitas foi determinado diariamente durante 7 dias usando uma câmara de Neubauer (ANTONELLO et al., 2018).

3.9.2. Espécies reativas de oxigênio e potencial de membrana mitocondrial

A produção de ROS em promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com meio M199, meio mais as substâncias isoladas (5 ou 10 μM) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 2 mM) foi quantificada usando o corante permeante celular 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) e análise de citometria de fluxo conforme descrito na literatura (MARTINS et al., 2018). O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) foi quantificado em parasitas incubados com meio M199 ou meio mais substâncias isoladas (5 ou 10 μM) ou H_2O_2 (2 mM) usando o corante fluorescente rodamina 123 e análise de citometria de fluxo (DAGNINO et al., 2018).

3.9.3. Integridade da membrana celular, ensaio hemolítico e citotóxico

A integridade da membrana celular de parasitas tratados com as substâncias isoladas (5 ou 10 μM) ou H_2O_2 (2 mM) foi determinada usando coloração com iodeto de propídio (PI) e análise de citometria de fluxo conforme descrito anteriormente (CEZAROTTO et al., 2019).

O ensaio hemolítico foi realizado conforme descrito anteriormente (GAUTHIER et al., 2009). O comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre aprovou esses procedimentos (CAAE 63282416.6.0000.5345). A concentração dos compostos que causam 50% da hemólise dos glóbulos vermelhos (RBC50) foi determinada por análise de regressão não linear. O índice de seletividade (SI) de cada produto foi determinado pela razão RBC50/IC50 contra promastigotas de *L. amazonenses*.

A citotoxicidade para linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 foi determinada com o ensaio MTT (ROMÃO et al., 1999). A concentração das substâncias isoladas que causaram 50% da citotoxicidade dos macrófagos (CC₅₀) foram determinadas por análise de regressão não linear. O índice de seletividade (SI) foi determinado pela equação: $SI = CC_{50} \text{ contra macrófagos} / IC_{50} \text{ contra amastigotas de } L. amazonensis$.

3.9.4. Atividade anti-amastigota

Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (10 parasitas/célula) e 4 h depois, as células foram lavadas e incubadas com DMEM (controle), lipopolissacarídeo (LPS, 10 ng/mL) e interferon- γ (IFN- γ , 1 ng/mL) como um controle positivo, ou com as substâncias isoladas a 2 mM por 48 h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com 100 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS, 0,01% p/v) em meio M199 sem soro a 37 °C por 20 min. Depois disso, cada poço foi suplementado com M199 FBS a 30% e cultivado a 26 °C por 10 dias para determinar o número de promastigotas recuperados. A atividade leishmanicida dos macrófagos foi avaliada pela determinação do número de parasitas viáveis usando uma câmara de Neubauer (MARTINS et al., 2018).

3.9.5. Análise estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e foram analisados usando o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e análise de variância unilateral seguida pelo teste de Bonferroni. Em todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$, e os testes foram

realizados com o GraphPad Prisma Software versão 5.03. Todos os experimentos foram realizados três vezes e em quadruplicado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises palinológicas

Inicialmente foram coletadas 5 amostras de pólen apícola em meses diferentes, sugestivas como monofloral para *A. funifera*, visto que o apiário se localizava bem próximo a uma vasta plantação desta espécie. Através da análise palinológica foi observado que das 5 amostras apenas uma (novembro) se apresentou como monofloral para *A. funifera*, com 62,7% de frequência polínica da espécie, na mesma amostra foi reportado ainda o gênero *Ilex* com 8,2%, seguido por *Alchornea* com 6,2% e da espécie *M. pudica* com 5,4%, sendo todos esses outros caracterizados com base na frequência como “pólen menor importante” (Tabela 1). As amostras coletadas nos meses de maio, junho, agosto e setembro apresentaram-se como monofloral para a espécie *M. pudica*, com frequências superiores a 80%. Outros tipos polínicos foram encontrados nas amostras na faixa de 0,2 a 7,2% sendo os principais o gênero *Mikania*, seguido por *Rynchospora* e *A. funifera*. Alves e Santos (2018b) explicam que a presença expressiva de *M. pudica* se deve a floração rápida característico da família, além da acessibilidade das abelhas as flores da espécie, que são muito poliníferas. A determinação da origem floral por meio da análise palinológica, bem como a análise da frequência e volume do pólen das espécies vegetais são capazes de definir a amostra como monofloral ou heterofloral.

As amostras coletadas inicialmente como monoflorais de *E. guineensis* foram estudadas por outro integrante do projeto em outra área do conhecimento, sendo conduzida por uma equipe de botânicos que estudaram não só a frequência polínica, mas também realizaram análises volumétricas através do uso de ferramentas matemáticas, a fim de que não houvesse uma sub ou superrepresentatividade de determinado tipo polínico (ALVES, 2017). Dentre as amostras analisadas foi observado que apesar da frequência em algumas amostras apontar para determinada origem botânica, o volume tinha elevado potencial na composição da amostra, indicando que apenas a frequência pode ser um dado insuficiente, inclusive para decidir se o pólen é mono ou heterofloral. Com isso, foram selecionadas 5 amostras, 4 que apresentaram frequência polínica de dendê maior que 45% e 1 com frequência menor que 45%, mas com considerável relação volumétrica em relação ao pólen com

GOMES, A. N. P.

maior frequência de pólen de outra origem botânica. Sendo assim, as 5 amostras foram consideradas monoflorais para *E. guineensis*, totalizando 10 amostras. A Tabela 2 mostra as amostras selecionadas para o trabalho com suas respectivas frequências polínicas.

Tabela 1 - Relação dos principais tipos polínicos (%) encontrados nas amostras de pólen apícola consideradas monoflorais de *Attalea funifera* Mart. coletadas na municipalidade de Nilo Peçanha, Bahia, Brasil.

Tipos polínicos	Mai	Jun	Ago	Set	Nov
Aquifoliaceae					
<i>Ilex</i>					8,2
Arecaceae					
<i>Attalea funifera</i>	1,6	0,2	4,6	2	62,7
Asteraceae					
<i>Mikania</i>	7,2		4,8	1,4	1,2
Celastraceae					
<i>Maytenus</i>		4,1			0,6
Cyperaceae					
<i>Rynchospora</i>	5	1	0,6	1,4	4,8
Euphorbiaceae					
<i>Alchornea</i>				0,2	6,2
Fabaceae					
<i>Mimosa Acutistipula</i>		0,4		1	
<i>M. pudica</i>	85,5	94,1	88,7	93,1	5,4
Urticaceae					
<i>Cecropia</i>					5,4
Indeterminados*				0,8	2,8
Total	100	100	100	100	100

Tabela 2 – Frequência polínica das espécies de *A. funifera*, *M. pudica* e *E. guineensis* nas amostras de polens apícolas

Amostras	Frequências de <i>A. funifera</i> (%)	Frequências de <i>M. pudica</i> (%)	Amostras	Frequências de <i>E. guineensis</i> (%)
Maio/14	1,6	85,5	Julho/13	46,7
Junho/14	0,2	94,1	Janeiro/14	82,0
Agosto/14	4,6	88,7	Fevereiro/14	90,5
Setembro/15	2,0	93,1	Abril/14	52,6
Novembro/14	62,7	5,4	Maio/14	38,5

4.2. Caracterização química por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS

Os compostos foram identificados experimentalmente por UPLC-DAD-ESI-qTOF-MS/MS nas quatro amostras de extratos de pólen apícola de *M. pudica* (Extrato EtOH, fr hex, fr AcOEt e fr MeOH:H₂O). Os extratos de EtOH, as frações AcOEt e MeOH:H₂O foram analisados no modo ESI negativo e as frações de hexano foram analisadas no modo ESI positivo. O uso em dois modos favoreceu a identificação de maior número de compostos. Nas amostras de pólen de *M. pudica* também foi realizada uma separação da fração AcOEt em Sephadex LH-20 a fim de identificar melhor as substâncias presentes.

Para o pólen apícola de *A. funifera* os compostos foram tentativamente identificados nas frações hexano e AcOEt obtidas por extração líquido-líquido e para o pólen apícola de *E. guineensis* nas frações metanólicas obtidas por extração em fase sólida (SPE) por UPLC-DAD-qTOF/MS/MS ambos em modo ESI negativo. A Tabela 3 mostra os compostos identificados nos polens monoflorais para as 3 espécies estudadas.

É importante observar que foi analisado o mix polínico obtido e classificado de acordo com a frequência que cada espécie representa na amostra. Sendo assim, é possível que alguns compostos não sejam da espécie com maior frequência polínica, ou seja, alguns compostos podem estar presentes no mix polínico não por que é proveniente das flores de determinada espécie, e sim pela contribuição do pólen de outra espécie.

Tabela 3 - Comparação entre os compostos encontrados nas espécies *M. pudica*, *A. funifera* e *E. guineensis*.

	Rt	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z) Calculado	[M+H] ⁺ (m/z) Calculado	Composto proposto	<i>M.</i> <i>pudica</i>	<i>A.</i> <i>funifera</i>	<i>E.</i> <i>guineensis</i>
1	0,34	341,1097		341,1031		Dissacarideo	X	X	X
2	2,07	639,1536		639,1559		Isoramnetina dihexosídeo	X		X
3	2,18	639,1568		639,1567		Isoramnetin di- hexosídeo			X
4	2,32	609,1464		609,1461		Tetrahidroxiflavona ramnose-glicosídeo	X		
5	2,45	593,1512		593,1512		Isoramnetina pentosil desoxihexosídeo			X
6	2,58	436,2246		436,2241		<i>N',N''</i> -dicumaroil espermidina		X	
7	2,58	769,221		769,2127		Isoramnetina di- desoxihexose hexosídeo	X		X
8	2,66	463,0858		463,0882		Isoquercetina**	X		
9	2,68	623,1618		623,1618		Isoramnetina-3- neohesperidosídeo*/**	X	X	X
10	2,82	607,1348		607,1305		Tetrahidroflavone- hexose-cinamoil	X		
11	2,95	447,0932		447,0933		Quercitrina*	X		X

12	3,1	665,1729	665,1723	Isoramnetina-glicosil-acetil ramnosídeo	X		X
13	3,29	489,1036	489,1038	Quercetina acetil ramnosídeo	X		
14	3,29	477,1018	477,1039	Isoramnetina hexosídeo	X	X	
15	3,5	301,0343	301,0354	Pentahidroxi flavona	X	X	X
16	3,64	477,1018	477,1039	Isoramnetina hexosídeo	X		
17	3,66	519,1146	519,1144	Isoramnetina acetil hexosídeo	X		
18	3,68	639,3188	639,3188	<i>N',N'',N'''</i> -tricoumaroil espermina	X		
19	3,7	431,0976	431,0984	Canferol desoxihexosídeo	X		
20	3,73	379,1663	379,1663	Dicumaroil putrescina		X	
21	3,6	630,2446	630,2457	<i>N,N,N</i> -Tri-cafeoil espermidina	X	X	X
22	3,73	630,2454	630,2457	<i>N,N,N</i> -Tri-cafeoil espermidina		X	X
23	3,84	630,2438	630,2457	<i>N,N,N</i> -Tri-cafeoil espermidina			X
24	4,13	409,1767	409,1768	Cumaroil-feruloil-putrescina		X	

25	3,95	614,25	614,2507	Cumaroil-di-cafeoil-espermidina	X	X	X
26	4,03	614,2501	614,2507	Cumaroil-di-cafeoil-espermidina		X	X
27	4,1	614,2473	614,2507	Cumaroil-di-cafeoil-espermidina			X
28	4,2	614,2488	614,2507	Cumaroil-di-cafeoil-espermidina			X
29	4,33	593,13	593,1301	Tilirosídeo**	X		X
30	4,26	644,2618	644,2613	<i>N',N''</i> -di-cafeoil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina	X	X	X
31	4,34	644,2603	644,2613	<i>N',N''</i> -di-cafeoil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina		X	X
32	4,41	598,2551	598,255	Cafeoil-di-cumaroil-espermidina	X	X	X
33	4,52	598,255	598,255	Cafeoil-di-cumaroil-espermidina		X	X
34	4,58	598,2552	598,255	Cafeoil-di-cumaroil-espermidina			X
35	4,54	593,1283	593,1301	Trihidroxiflavona cumaroil hexosídeo			X
36	4,8	628,2662	628,2664	<i>N'</i> -Cafeoil, <i>N''</i> -feruloil, <i>N'''</i> -espermidina		X	X

37	4,85	628,2662	628,2664	<i>N'</i> -Cafeoil, <i>N''</i> -feruloil, <i>N'''</i> -cumaroil espermidina			X	
38	4,73	582,2602	582,2607	<i>N',N'',N'''</i> -tri-cumaroil espermidina	X		X	X
39	4,8	582,2602	582,2607	<i>N',N'',N'''</i> -tri-cumaroil espermidina	X		X	X
40	4,9	582,2582	582,2607	<i>N',N'',N'''</i> -tri-cumaroil espermidina				X
41	5	557,1071	557,1089	Naringenina-Eriodictiol	X			
42	5,04	555,0929	555,0932	Dihidro-hidroxi-amentoflavona	X			
43	5,18	612,2708	612,2715	<i>N',N''</i> -Dicumaroil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina			X	
44	5,05	672,2927	672,2924	<i>N',N'',N'''</i> -tri-feruloil espermidina	X		X	X
45	5,16	672,2927	672,2924	<i>N',N'',N'''</i> -tri-feruloil espermidina	X			X
46	5,31	672,2902	672,2924	<i>N',N'',N'''</i> -tri-feruloil espermidina				X
47	5,31	642,283	642,282	<i>N',N''</i> -Diferuloil, <i>N'''</i> -cumaroil espermidina			X	

48	5,35	672,2903	672,2924	<i>N',N'',N'''</i> -triferuloil espermidina				X
49	5,39	593,1276	593,1301	tetrahidroxiflavona cumaroil hexoside				X
50	5,5	593,1284	593,1301	tetrahidroxiflavona cumaroil hexoside				X
51	5,41	785,3551	785,3555	<i>N', N'', N''', N''''</i> -tetra-cumaroil espermina	X			X
52	5,49	785,3551	785,3555	<i>N', N'', N''', N''''</i> -tetra-cumaroil espermina	X			X
53	5,56	785,3551	785,3555	<i>N', N'', N''', N''''</i> -tetra-cumaroil espermina	X			X
54	5,64	539,0957	539,0983	Rusflavona*	X	X		X
55	5,69	537,0813	537,0827	Amentoflavona*/**	X	X		X
56	5,7	815,3633	815,3662	<i>N', N'', N'''</i> -tricumaroil, <i>N''''</i> -feruloyl espermina	X			
57	5,77	551,1188	551,0983	O-metil biapigenina	X	X		
58	5,84	577,1334	577,1352	Canferol cumaroil desoxihexosideo				X
59	5,91	577,1342	577,1352	Canferol cumaroil desoxihexosideo				X
60	6,07	539,0983	539,0983	Isômero de rusflavona			X	

61	6,08	541,1119	541,114	Rusflavanona*	X		
62	6,13	271,0977	271,0611	Naringenina**	X		
63	6,16	329,2322	329,2334	FA 18:1;O ₃	X		
64	6,4	539,0983	539,0983	Dihidro-biapigenina		X	X
65	6,64	271,0963	271,0611	Trihidroxiflavanona	X		
66	8,08	621,177	621,1402	Hidroximetilbutenil amentoflavona	X		
67	8,5	435,2737	435,2752	FA 25:5;O ₄	X		
68	9,2	419,2786	419,2802	Derivado de ácido cumárico	X		
69	9,2	419,2786	419,2802	Derivado de ácido cumárico	X		
70	9,35	474,2619	474,2626	LPE18:3	X	X	
71	9,49	502,293	502,2939	LPC17:3	X		
72	9,54	621,177	621,1402	Hidroximetilbutenil amentoflavona	X		
73	9,63	502,2932	502,2939	LPC18:3/0:0		X	
74	9,66	476,2766	476,2783	LPE 18:2	X	X	
75	9,74	504,3097	504,3096	LPC 17:2	X		
76	9,89	480,3085	480,3096	LPC 15:0	X		
77	9,82	520,4365	520,4365	Cer 32:4;O ₃	X		
78	9,9	518,3229	518,3229	LPC 18:3	X		
79	9,91	502,293	502,2939	LPC18:3/0:0		X	
80	10,16	517,3862	517,3862	FA 32:6;O ₃	X		
81	10,49	504,3099	504,3096	LPC18:2/0:0		X	
82	10,62	295,2267	295,2279	Ac Hidroxi octadecadienoico C18:2		X	
83	10,78	520,3392	520,3392	LPC 18:2	X		
84	10,79	504,3094	504,3096	LPC18:2/0:0		X	
85	11,07	480,3039	480,3096	LPE18:0		X	

86	11,18		520,4374		520,4374	Cer 32:4;O ₃	X	
87	11,36	452,2783		452,2783		LPE16:0		X
88	11,44	480,3085		480,3096		LPE18:0		X
89	11,44		496,3386		496,3386	LPC 16:0	X	
90	11,87	506,3248		506,3252		LPC18:1/0:0		X
91	12,98		520,4355		520,4355	Cer 32:4;O ₃	X	
92	13,14		501,3915		501,3915	FA 32:6;O ₂	X	
93	13,29	508,3401		508,3409		LPC18:0/0:0		X
94	13,88	277,2145	279,2319	277,2173	279,2319	FA 18:3	X	X
95	14,23		486,429		486,429	Cer 32:5;O	X	
96	15,06	279,2309		279,233		Acido linoleico		X
97	16,15	255,23		255,233		Ácido palmítico		X
98	16,38		483,38		483,3833	FA 32:7;O	X	
99	16,45		529,4233		529,4233	FA 34:6;O ₂	X	
100	16,49	281,2476		281,2486		Ácido oleico		X
101	16,8		483,3815		483,3833	FA 32:7;O	X	
102	16,9		601,5037		601,5037	DG 32:0;O ₂	X	
103	17,46		307,2635		307,2635	FA 20:3	X	
104	17,79		486,4305		486,4305	Cer 32:5;O	X	
105	17,89	327,2924		327,2904		Ácido hidroxí eicosanoico C20:0		X
106	18,02	283,2641		283,2643		Ac esteárico		X
107	18,34		629,5336		629,5336	DG 34:0;O ₂	X	
108	18,9		758,5697		758,5697	PC 34:2	X	
109	19,13	762,5065		762,5079		PE18:3/20:3		X
110	19,17		778,5363		778,5363	PC 36:6	X	
111	19,21		475,3778		475,3778	DG O-27:5	X	
112	19,24		486,4305		486,4305	Cer 32:5;O	X	

113	19,55	355,321	355,3217	Ácido hidroxi docosanoico C22:0	X
114	19,58	427,3929	427,3929	ST 30:2;O	X
115	20,02	764,52	764,5236	PE18:2/20:3	X
116	20,08	780,551	780,551	PC 36:5	X
117	20,18	712,5367	712,5369	GlicCer14:2/20:0	X
118	20,42	503,4088	503,4088	DG O-29:5	X
119	20,86	740,5239	740,5236	PE18:3/18:0	X
120	20,96	756,552	756,552	PC 34:5	X
121	21,29	740,5615	740,56	GlicCer14:1/22:1	X
122	21,35	531,442	531,442	DG O-31:5	X
123	21,42	740,5615	740,56	GlicCer14:1/22:1	X
124	21,67	427,3929	427,3929	ST 30:2;O	X
125	21,7	485,3983	485,3983	FA 32:6;O	X
126	22,08	768,5925	768,5995	GlicCer14:1/24:1	X
127	22,48	764,5708	764,5708	(HexCer 38:5;O ₃)	X
128	22,51	709,5765	709,5764	DG (21:0/22:6)	X
129	23,09	628,3735	628,3735	(ST 24:1;O ₆ ; HexNAc)	X
130	23,51	573,4885	573,4885	CE 10:0;O ₂	X
131	24,2	756,6331	756,6331	(HexCer 38:1;O ₂)	X

4.2.1. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS do pólen apícola de *M. pudica*.

Oitenta e um picos foram identificados com base nos espectros de UV e de massa, e os compostos **8**, **9**, **11**, **29**, **55** e **62** foram comparados com amostras padrão. As estruturas foram sugeridas após a análise dos íons produto (espectros MS^E) e dos espectros de UV comparados com a literatura. Os cromatogramas UPLC-DAD do extrato EtOH, fração AcOEt e MeOH:H₂O a 319 nm são exibidos na Figura 4, e o íon pico base (BPI) Figura 5 (modo ESI negativo). O BPI para a fração hexano no modo ESI positivo está na Figura 6. Os Cromatograma do íon pico base (BPI) de quatro frações representativas de *M. pudica* obtidas por Sephadex LH-20 são mostrados da Figura 7. A Tabela 4 mostra os compostos que foram identificados nos extratos EtOH e frações AcOEt e MeOH:H₂O. A Tabela 5 mostra os compostos caracterizados na fração hexano.

O composto **1** mostrou o pico da molécula desprotonada em m/z 341,1097 [M-H]⁻ e absorção máxima de UV em 210 nm, além de íon produto em m/z 179,0514 [M-H-hexose]⁻ formado a partir da perda de uma unidade de hexose de 162 Da. Por meio da análise dos dados e comparação com os da literatura foi possível sugerir o composto **1** como um dissacarídeo, já identificado pela mesma técnica em outra amostra de pólen apícola (QIAN et al., 2008).

Identificação de flavonoides (compostos 2, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 41, 42, 54, 57, 61, 65, 66 e 72).

Os flavonoides **8** (m/z 463,0858), **9** (m/z 623,1618), **11** (m/z 447,0932), **29** (m/z 593,1300), **55** (m/z 537,0813) e **62** (m/z 271,0977) foram identificados por comparação com amostras padrão como isoquercetina, isoramnetina-3-neoesperidosídeo, quercitrina, tilirosídeo, amentoflavona e naringenina respectivamente.

Os compostos **2**, **7**, **12**, **14**, **16** e **17** foram apresentados como derivados de isoramnetina com produto de íon comum em m/z 315. O composto **2** com íon desprotonado em m/z 639,1568 [M-H]⁻ produziu íons de produto em m/z 477,0970 [M-H-hexose]⁻ e m/z 315,0538 [M-H-2xhexose]⁻ devido à perda de uma e duas unidades

de hexose, respectivamente, sendo identificado como isoramnetina di-hexosídeo . O flavonoide **12**, m/z 665,1729 [M-H]⁻, além de duas unidades de açúcar (uma hexose e uma desoxihexose), mostrou a perda de um grupo acetil ligado à desoxihexose, produzindo íons produto em m/z 477,1221 [M-H-acetil ramnosídeo]⁻ e 315,0487 [M-H-glicose-acetil ramnosídeo]⁻, respectivamente. A análise desses dados permitiu identificar o flavonoide **12** como isoramnetina-glicosil-acetil ramnosídeo. Os compostos **7** (m/z 769,2210) e os isômeros **14** e **16** (m/z 477,1018) mostraram perdas de desoxihexose e hexose em m/z 623,2001 e m/z 315,0486, respectivamente. Com os dados de MS² foi possível identificar as substâncias tentativamente como isoramnetina di-desoxihexose hexosídeo e isoramnetina hexosídeo. O composto **17** (m/z 519,1146), mostrou a perda de um grupo acetil, produzindo íon produto em m/z 477,1002 a partir daí foi sugerido como isoramnetina acetil hexosídeo.

Composto **10**, m/z 607,1348 [M-H]⁻, mostrou íon desprotonado em m/z 463,0861 [M-H-cinamoil]⁻, devido à perda de um grupo cinamoil seguido por hexose em m/z 301,0355 [M-H-cinamoil-hexose]⁻, assim foi possível sugerir como tetrahidroflavona-hexose-cinamoil. O composto **13**, m/z 489,1036 [M-H]⁻, mostrou perda de acetil ramnose com íon produto a m/z 301,0645 [M-H-acetil ramnosídeo]⁻ sendo identificado como quercetina-acetil-ramnose. O composto **15** (m/z 301,0343) mostrou íons produto formados pela perda neutra de CO em m/z 273,0397 e perda sucessiva de CO seguida por H₂O em m/z 255,0585, além de fragmentação da ligação no anel B em m/z 193,0336. Com os dados de massas e UV, o composto foi sugerido como pentahidroxiflavona. O composto **19** com pico do íon molecular desprotonado em m/z 431,0976 mostrou perda de desoxihexose com íon produto MS² em m/z 285,0431 e de acordo com esses dados foi possível sugerir o composto como canferol-desoxihexosídeo.

O composto **65** (m/z 271,0963) apresentou-se como isômero de **62** e foi identificado como trihidroxiflavanona. Como exemplo, o perfil de formação de íons produto proposto para Isoramnetina-3-neohesperidosídeo (**9**) pode ser estendido aos outros flavonoides (Figura 8).

Os compostos identificados como biflavonoides mostraram absorção de UV em 267-336 nm. Os compostos **54** (m/z 539,0957), **55** (m/z 537,0813), e **61** (m/z 541,1119), foram isolados e identificados com base em várias técnicas espectroscópicas como rusflavona, amentoflavona e rusflavanona, respectivamente.

Como exemplo, o perfil de formação de íons produto proposto para rusflavona (**54**) pode ser estendido aos outros biflavonoides (Figura 9). Foi observado pico do íon desprotonado em m/z 537,0813 $[M-H]^-$ e íons produto em m/z 443,0422 $[M-H-C_6H_6O]^-$ formado a partir da perda do anel B e em m/z 417,0682 atribuído a fragmentação em 0,2IIA, enquanto m/z 375,0575 indicou que o íon produto sofreu uma fragmentação seguida de retrociclização envolvendo as ligações 0 e 4 na parte II do flavonoide. Os outros biflavonoides apresentaram o mesmo perfil de ionização da amentoflavona. O composto **41** (m/z 557,1071) mostrou perdas neutras de H_2O em m/z 539,0997 e CO_2 em m/z 513,1203, íon produto em m/z 495,1100 foi formado por perda sequencial de H_2O e CO_2 , sendo a partir desses dados, sugerido como naringenina-eriodictiol. O composto **42** (m/z 555,0929) mostrou uma hidroxila a mais quando comparada a amentoflavona (**55**) e juntamente com seus íons produto em m/z 527,0984 pela perda de CO e m/z 309,0393 pela perda de CO_2 seguida pela perda de $C_{11}H_{11}O$, sendo identificado como dihidro-hidroxi-amentoflavona. O composto **57** (m/z 551,1188), mostrou perdas características de biflavonoides (YAO et al., 2017) sendo sugerido como *O*-metil biapigenina. Os isômeros **66** e **72** mostraram um pico de íon desprotonado em m/z 621,1770, com íons do produto em m/z 577,1910 formados por perda neutra de CO_2 e m/z 509,3323 por perda neutra de CO seguida por C_5H_9O , que foi sugerido como sendo o grupo hidroximetilbutenil. O m/z em 391,1195 foi atribuído a fragmentação semelhante a amentoflavona. Com isso, o composto foi sugerido como hidroximetilbutenil amentoflavona, previamente isolado em espécies vegetais (AL-SHAGDARI et al., 2013).

Identificação dos derivados de espermidina (compostos 18, 21, 25, 30, 32, 38, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 68 e 69).

As amidas do ácido hidroxicinâmico mostraram um espectro de UV com máximos a 308-318 nm. Nos espectros de massa, esses compostos mostraram fragmentos de íons com perdas de massa de 120 Da (etenil-fenol), 136 Da (etenil-hidroxifenol) e 150 Da (etenil-*O*-metilfenol) em relação às perdas dos grupos coumaroil, cafeoil e feruloil, respectivamente (CALDAS et al, 2019; NEGRI et al., 2018).

O composto **18** (m/z 639,3188) apresentou perda de 120 Da em m/z 519,2633 e duas perdas consecuentes de 120 Da em m/z 399,2050, então foi possível sugerir o composto como N' , N'' , N''' -tricoumaroil espermina. Composto **21** (m/z 630,2446) mostrou íon produto em m/z 494,1947 devido à perda de dois etenil-hidroxifenol e outro a m/z 468,2159 formado pela perda de um grupo cafeoil foi identificado como N' , N'' , N''' -tricafeoil espermidina. O composto **25** (m/z 614,2500) apresentou perdas semelhantes a **21**, além de um fragmento em m/z 332,1558 formado pela perda de uma fração coumaroil mais o grupo cafeoil, com isso foi possível identificar como N' , N'' -dicafeoil, N''' - coumaroil espermidina. Como exemplo, o perfil de formação de íons produto proposto para N' , N'' -dicafeoil, N''' -coumaroil (**25**) pode ser estendido aos outros derivados de espermidina (Figura 10). O composto **30** (m/z 644,2618) mostrou perda de grupo metoxi em m/z 614,2571 e o fragmento em m/z 508,2098 e m/z 478,2019, então foi possível sugerir a estrutura como N' , N'' -dicafeoil, N''' - feruloil espermidina. O composto **32** (m/z 598,2551) produziu um fragmento de íon em m/z 462,2041 pela perda da fração cafeoil. O fragmento em m/z 452,2214 foi derivado de perdas da fração coumaroil neutra e um fragmento de íon em m/z 342,1457, correspondendo à perda de uma porção coumaroil. Com estes dados, o composto foi identificado como N' -cafeoil- N'' , N''' - dicoumaroil espermidina. Os isômeros **38** e **39** (m/z 582,2602) mostraram no MS² especula o íon produto em m/z 462,2039, que foi originado da perda de uma fração de coumaroil, seguido pelo íon do fragmento em m/z 342,1460 formado pela perda de duas porções coumaroil. Assim, os compostos foram identificados com N' , N'' , N''' - tricoumaroil espermidina. Os compostos **44** e **45** (m/z 672,2927), mostraram no espectro de MS/MS, o fragmento em m/z 582,8958 devido à perda de três grupos OCH₃. Os compostos foram identificados como N' , N'' , N''' - triferuloil espermidina. Compostos **51** **52** e **53** (m/z 785,3551) e fragmentação semelhante à dos compostos **38** e **39**. A diferença foi que em massa foi possível sugerir a presença de outra unidade de coumaroil, e a presença de outra poliamina na estrutura em vez de espermidina. Assim, foi possível sugerir os compostos como N' , N'' , N''' , N'''' - tetracoumaroil espermina. Composto **56** (m/z 815,3633), mostrou 30 Da a mais do que os isômeros **51**, **52** e **53**, então foi identificado provisoriamente como N' , N'' , N''' - tricoumaroil, N'''' - feruloil espermina

Os compostos **68** e **69**, m/z 419,2786 [M-H]⁻, mostraram UV em 309 nm e foram identificados provisoriamente como derivados do ácido cumárico.

Tabela 4 - Caracterização de compostos de extratos de EtOH de pólen de abelha de *M. pudica*, EtOAc e frações MeOH:H₂O analisadas por UPLC-DAD-qTOF-MS^E em modo negativo

	Rt	λ (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z) Calculado	MS/MS fragmentos (m/z)	Composto proposto	Extrato EtOH e fração AcOEt			
							(Mai)	(Jun)	(Ago)	(Set)
1	0.34	-	341,1097	341,1031	179,0514 [M-H-hexose], 161,0425 [M-H-hexose- H ₂ O] ⁻	Dissacarideo	x	x	x	x
2	2.18	251	639,1568	639,1567	477,0970 [M-H-hexose], 315,0538 [M-H-2xhexose] ⁻ , 162,8885 [M-H-aglicona- hexose] ⁻	Isoramnetin di- hexosideo	x	x	x	x
9	2.68	353	623,1618	623,1618	315,0495 [M-H-ramnose- glicose] ⁻ 314,0431 [M-2H- ramnose-glicose] ⁻	Isoramnetina-3- neohesperidosideo ^{*/**}	x	x	x	x
10	2.82	356	607,1348	607,1305	463,0861 [M-H-cinamoil] ⁻ , 301,0355 [M-H-cinamoil- hexose] ⁻	Tetrahidroflavone- hexose-cinamoil			x	x
11	2.95	346	447,0932	447,0933	285,0371 [M-H-glicose] ⁻ , 284,0326 [M-2H-glicose] ⁻ , 255,0298 [M-2H-glicose- CO] ⁻	Quercitrina*	x	x	x	x
12	3.10	358	665,1729	665,1723	477,1221 [M-H-acetil ramnosideo] ⁻ , 315,0487 [M-H-glicose-acetil ramnosideo] ⁻ 314,0435 [M-2H-glicose-acetil ramnosideo] ⁻	Isoramnetina-glicosil- acetil ramnosideo	x	x	x	x
13	3.29	346	489,1036	489,1038	301,0645 [M-H-acetil ramnosideo] ⁻	Quercetina acetil ramnosideo	x	x	x	x
18	3.68	312	639,3188	639,3188	519,2633 [M-H-etenil- fenol] ⁻ , 399,2050 [M-H- 2x(etenil-fenol)] ⁻	N',N'',N'''-tricoumaroil espermina			x	

21	3.88	319	630,2446	630,2457	494,1947 [M-H-etenil-hidroxyfenol] ⁻ , 468,2159 [M-H-cafeoil] ⁻ , 358,1427 [M-H-2x(etenil-hidroxyfenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -tricafeoil espermidina	x	x	x	x
25	4.19	312	614,25	614,2502	478,1886 [M-H-etenil-hidroxyfenol] ⁻ , 452,2070 [M-H-cafeoil] ⁻ , 332,1558 [M-H-cafeoil-(etenil-fenol)] ⁻ , 447,0955 [M-H-coumaroil] ⁻	<i>N,N'</i> -dicafeoil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina	x	x	x	x
29	4.33	312	593,13	593,1301	, 285,0390 [M-H-coumaroil-glicose] ⁻	Tilirosídeo*	x	x	x	x
30	4.39	319	644,2618	644,2613	614,2571 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 508,2098 [M-H-etenil-hidroxyfenol] ⁻ , 478,2019 [M-H-etenil-hidroxyfenol-OCH ₃] ⁻ , 346,1750 [M-H-etenil-hidroxyfenol-cafeoil] ⁻	<i>N,N'</i> -dicafeoil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina		x		
32	4.57	308	598,2551	598,255	462,2041 [M-H-etenil-hidroxyfenol] ⁻ , 452,2214 [M-H-coumaroil] ⁻ , 342,1457 [M-H-(etenil-hidroxyfenol)-(etenil-fenol)] ⁻	<i>N</i> -cafeoil- <i>N'',N'''</i> -dicoumaroil espermidina	x	x	x	x
38	4.85	308	582,2602	582,2607	462,2039 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 342,1460 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -tricoumaroil espermidina	x	x	x	x
39	4.95	308	582,2602	582,2607	462,2039 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 342,1460 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -tricoumaroil espermidina	x	x	x	x
44	5.20	293	672,2927	672,2924	582,8958 [M-H-3xOCH ₃] ⁻ , 522,2253 [M-H-etenil-O-metil fenol] ⁻ , 480,2065 [M-H-C ₁₀ H ₁₁ NO ₃] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -triferuloil espermidina	x	x	x	x
45	5.35	293	672,2927	672,2924	582,8958 [M-H-3xOCH ₃] ⁻ , 522,2253 [M-H-etenil-O-	<i>N,N'',N'''</i> -triferuloil espermidina	x	x	x	x

					metil fenol] ⁻ , 480,2065 [M-H-C ₁₀ H ₁₁ NO ₃] ⁻					
51	5.46	308	785,3551	785,3555	665,3008 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 639,3354 [M-H-coumaroil] ⁻ , 545,2308 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N, N', N'', N'''</i> -tetracoumaroil espermina	x	x	x	x
52	5.53	290	785,3551	785,3555	665,3008 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 639,3354 [M-H-coumaroil] ⁻ , 545,2308 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N, N', N'', N'''</i> -tetracoumaroil espermina	x	x	x	x
53	5.59	296	785,3551	785,3555	665,3008 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 639,3354 [M-H-coumaroil] ⁻ , 545,2308 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N, N', N'', N'''</i> -tetracoumaroil espermina			x	x
56	5.70	310	815,3633	815,3662	695,2883 [M-H-etenil-O-metil fenol] ⁻	<i>N, N'', N'''</i> -tricoumaroil, <i>N''''</i> -feruloyl espermina			x	x
63	6.16	-	329,2322	329,2334		FA 18:1;O ₃			x	x
67	8.50	-	435,2737	435,2752		FA 25:5;O ₄			x	
68	9.20	309	419,2786	419,2802	163,0300 [C ₁₆ H ₃₃ O ₂] ⁻	Derivado de ácido cumárico		x	x	x
69	9.20	309	419,2786	419,2802	163,0300 [C ₁₆ H ₃₃ O ₂] ⁻	Derivado de ácido cumárico		x		
70	9.35	-	474,2619	474,2626		LPE18:3			x	x
71	9.49	-	502,293	502,2939		LPC17:3			x	
74	9.66	-	476,2766	476,2783		LPE 18:2				x
75	9.74	-	504,3097	504,3096		LPC 17:2		x	x	x
76	9.89	-	480,3085	480,3096		LPC 15:0			x	x

* Comparado com o padrão autêntico.** Presente nas frações MeOH:H₂O.

Identificação de lipídios

A identificação dos lipídios foi realizada por meio de interpretação espectral MS/MS e comparação com espectros disponíveis nas bases de dados METLIN (<http://metlin.scripps.edu/index.php>) e LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>), além de comparação com dados da literatura e com erro de massa de <7 ppm. No modo ESI negativo os lipídios mostraram ionização $[M-H]^-$ e no modo positivo mostraram ionização $[M+H]^+$, $[M+H+Na]^+$ e $[M+H+ACN]^+$.

Três classes de lipídios, incluindo 3 espécies de monoacilglicerofosfocolinas (LPC), 2 monoacilglicerofosfoetanolaminas (LPE) e 2 ácidos graxos (FA), foram detectadas no modo de ionização negativo. Os compostos sugeridos como LPE (**70** e **74**) foram identificados no modo negativo com base na perda neutra de ácidos graxos conjugados (m/z 277,2169 e m/z 279,2322) sendo identificados provisoriamente como LPE 18:3 (**70**) e LPE 18:2 (**74**).

Sete classes de lipídios, incluindo 3 espécies de monoacilglicerofosfocolinas (LPC), 8 ceramidas (Cer e HexCer), 5 diacilgliceróis (DG), 8 ácidos graxos (FA), 4 diacilglicerofosfocolinas (PC), 3 esteróis (ST) e 1 éster de colesterol (CE) foram detectados no modo de ionização positiva (Tabela 5). Os compostos sugeridos como esteróis (**114**, **124** e **129**) e DGs (**102**, **107**, **111**, **118** e **122**) mostraram uma perda de 18 Da correspondendo à perda de H_2O , também foi identificado provisoriamente 1 éster de colesterol (**130**) de acordo com o erro entre o valor teórico e aquele observado para o pico do íon molecular. 8 ceramidas (**77**, **86**, **91**, **95**, **104**, **112**, **127** e **131**) foram provisoriamente identificadas, ceramidas e derivados foram relatados e isolados em outros estudos com pólen (PEI; LIU; DI, 2010).

4 PC (**108**, **110**, **116** e **120**) e 6 LPC (**71**, **75**, **76**, **78**, **83** e **89**) foram sugeridos como derivados de PC/LPC com base no íon produto m/z 184,0733 características do grupo fosfocolina. 10 ácidos graxos (**63**, **67**, **80**, **92**, **94**, **98**, **99**, **101**, **103** e **125**) foram identificados provisoriamente, entre eles FA 18:3 (**94**) conhecido como ácido linolênico, que é da classe ômega-3 com alto valor nutricional na dieta humana (LI et al., 2017).

Tabela 5 - Caracterização de compostos de frações hexano de pólen de abelha *M. pudica* por UPLC-qTOF-MS^E em modo positivo

Rt	[M+H] ⁺ (m/z)	[M+H+Na] ⁺ (m/z)	[M+H+ACN] ⁺ (m/z)	Calculada	Erro (ppm) [M+H] ⁺	Fórmula	Composto proposto	(Mai)	(Jun)	(Ago)	(Set)	
77	9.82	520.4365	-	-	520.4360	0.96	C ₃₂ H ₅₇ NO ₄	Cer 32:4;O ₃	x			
78	9.90	518.3229	-	-	518.3241	-2.31	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	LPC 18:3			x	x
80	10.16	517.3862	-	-	517.3887	-4.83	C ₃₂ H ₅₂ O ₅	FA 32:6;O ₃	x			
83	10.78	520.3392	-	-	520.3398	-1.15	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	LPC 18:2			x	x
86	11.18	520.4374	542.4196	-	520.4360	2.69	C ₃₂ H ₅₇ NO ₄	Cer 32:4;O ₃	x	x		
89	11.44	496.3386	-	-	496.3398	-2.41	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	LPC 16:0		x	x	x
91	12.98	520.4355	542.4187	-	520.4360	-0.96	C ₃₂ H ₅₇ NO ₄	Cer 32:4;O ₃	x	x		
92	13.14	501.3915	-	-	501.3938	-4.58	C ₃₂ H ₅₂ O ₄	FA 32:6;O ₂	x	x	x	x
94	13.88	279.2319	-	-	279.2319	0.00	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	FA 18:3			x	x
95	14.23	486.4290	-	-	486.4305	-3.08	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂	Cer 32:5;O	x	x		
99	16.45	529.4233	-	-	529.4251	-3.39	C ₃₄ H ₅₆ O ₄	FA 34:6;O ₂	x	x	x	x
98	16,38	483,3800			483.3833	-6,82	C ₃₂ H ₅₀ O ₃	FA 32:7;O		x		
101	16.38	483.3815	-	-	483.3833	-3,72	C ₃₂ H ₅₀ O ₃	FA 32:7;O	x			
102	16.90	601.5037	623.4844	-	601.5038	-0.16	C ₃₅ H ₆₈ O ₇	DG 32:0;O ₂			x	
103	17.46	307.2635	-	-	307.2632	0.97	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	FA 20:3				x
104	17.79	486.4305	508.4136	-	486.4305	0.00	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂	Cer 32:5;O	x	x		
107	18.34	629.5336	651.5155	-	629.5351	-2.38	C ₃₇ H ₇₂ O ₇	DG 34:0;O ₂			x	x
108	18.90	758.5697	-	-	758.5694	0.39	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	PC 34:2		x	x	x
110	19.17	778.5363	-	-	778.5381	-2.31	C ₄₄ H ₇₆ NO ₈ P	PC 36:6			x	
111	19.21	475.3778	497.3593	-	475.3782	-0.84	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	DG O-27:5			x	x
112	19.24	486.4305	508.4135	-	486.4305	0.00	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂	Cer 32:5;O	x	x		
114	19.58	427.3929	-	467.3850	427.3934	-1.16	C ₃₀ H ₅₀ O	ST 30:2;O	x	x	x	x

116	20.08	780.5510	-	-	780.5538	-3.58	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	PC 36:5			x	
118	20.42	503.4088	525.3914	-	503.4095	-1.39	C ₃₂ H ₅₄ O ₄	DG O-29:5	x		x	x
120	20.96	756.5520	-	-	756.5538	-2.37	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	PC 34:5	x		x	x
122	21.35	531.4420	553.4226	-	531.4408	2.25	C ₃₄ H ₅₈ O ₄	DG O-31:5			x	x
124	21.67	427.3929	-	467.3850	427.3934	-3.97	C ₃₀ H ₅₀ O	ST 30:2;O	x	x	x	x
125	21.70	485.3983	507.3814	-	485.3989	-1.23	C ₃₂ H ₅₂ O ₃	FA 32:6;O			x	
127	22.48	764.5708	-	-	764.5671	4.83	C ₄₄ H ₇₇ NO ₉	(HexCer 38:5;O ₃)	x	x		x
129	23.09	628.3735	-	-	628.3691	-7.00	C ₃₂ H ₅₃ NO ₁₁	(ST 24:1;O ₆ ; HexNAc)	x	x	x	x
130	23.51	573.4885	-	-	573.4877	1.39	C ₃₇ H ₆₄ O ₄	CE 10:0;O ₂			x	
131	24.20	756.6331	-	-	756.6348	-2.24	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈	(HexCer 38:1;O ₂)	x			

FA: ácido graxo; LPE: Monoacilglicerofosfoetanolaminas; LPC: Monoacilglicerofosfocolinas; Cer: Ceramidas; DG: Diacilgliceróis; PC: Diacilglicerofosfocolinas; ST: Esteróis; HexCer: Hexosil ceramidas; CE: Ésteres de colesterol; ST HexNAc: conjugados de esteroil N-acetil-hexosamina

Figura 4 Cromatogramas UPLC-DAD (319 nm) do extrato EtOH (A), fração AcOEt (B) e MeOH:H₂O (C) de pólen apícola monofloral de *M. pudica*

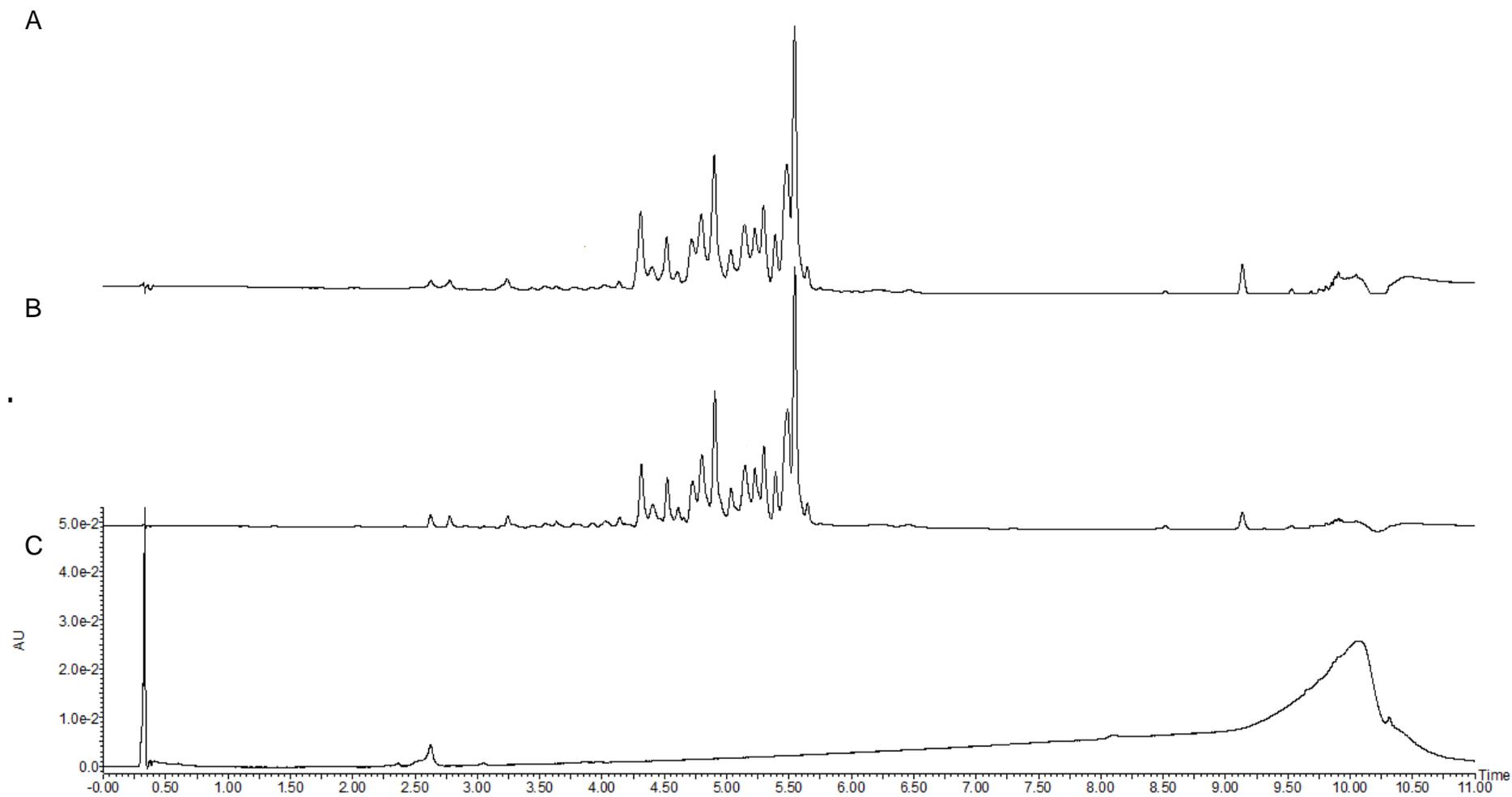


Figura 5 Cromatograma do íon pico base (BPI) do extrato EtOH (A), fração AcOEt (B) e MeOH:H₂O (C) de pólen apícola monofloral de *M. pudica* por UPLC-QTOF-MS em modo negativo

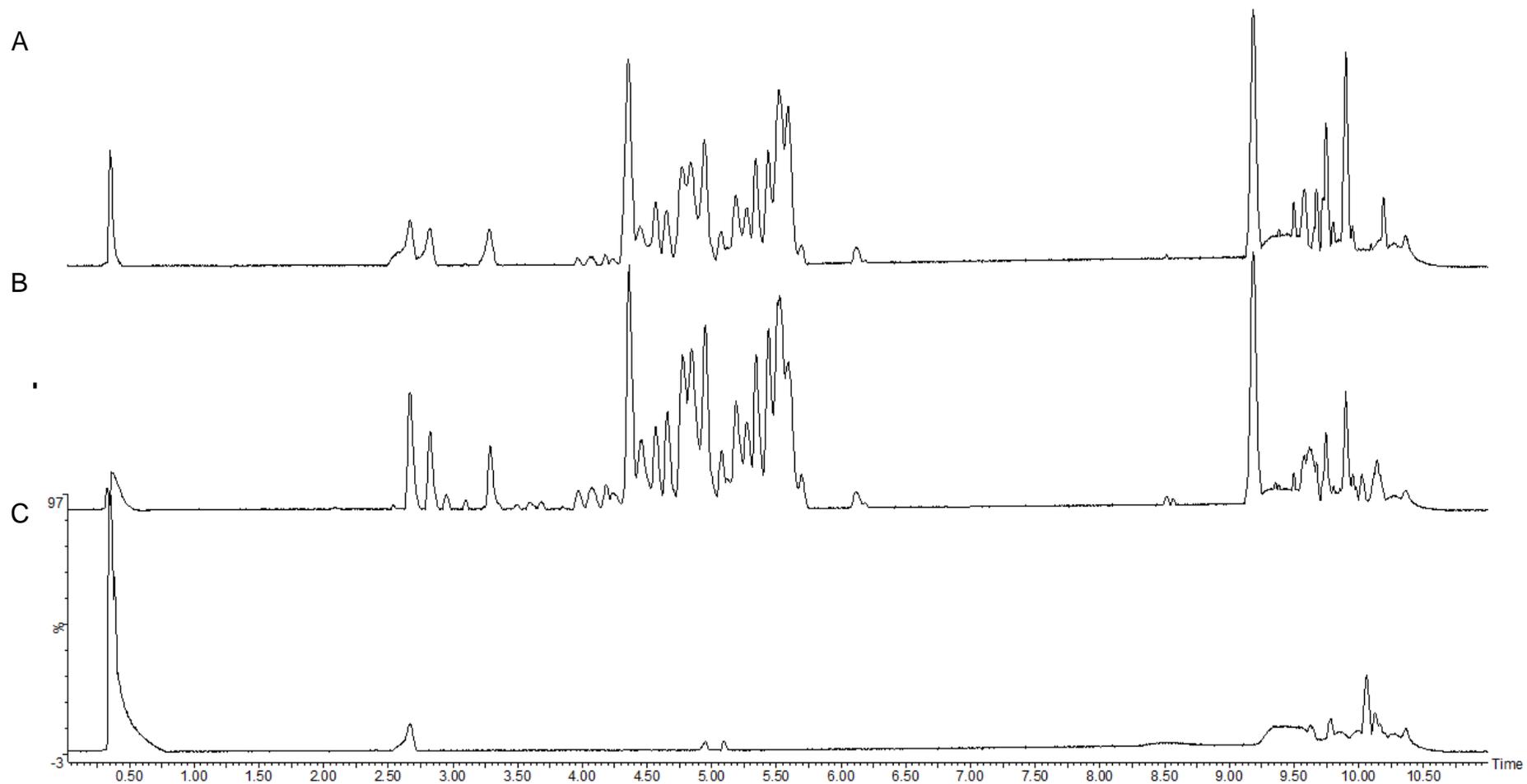


Figura 6 Cromatograma do íon pico base (BPI) da fração hexano de pólen apícola monofloral de *M. pudica* por UPLC-QTOF-MS em modo positivo

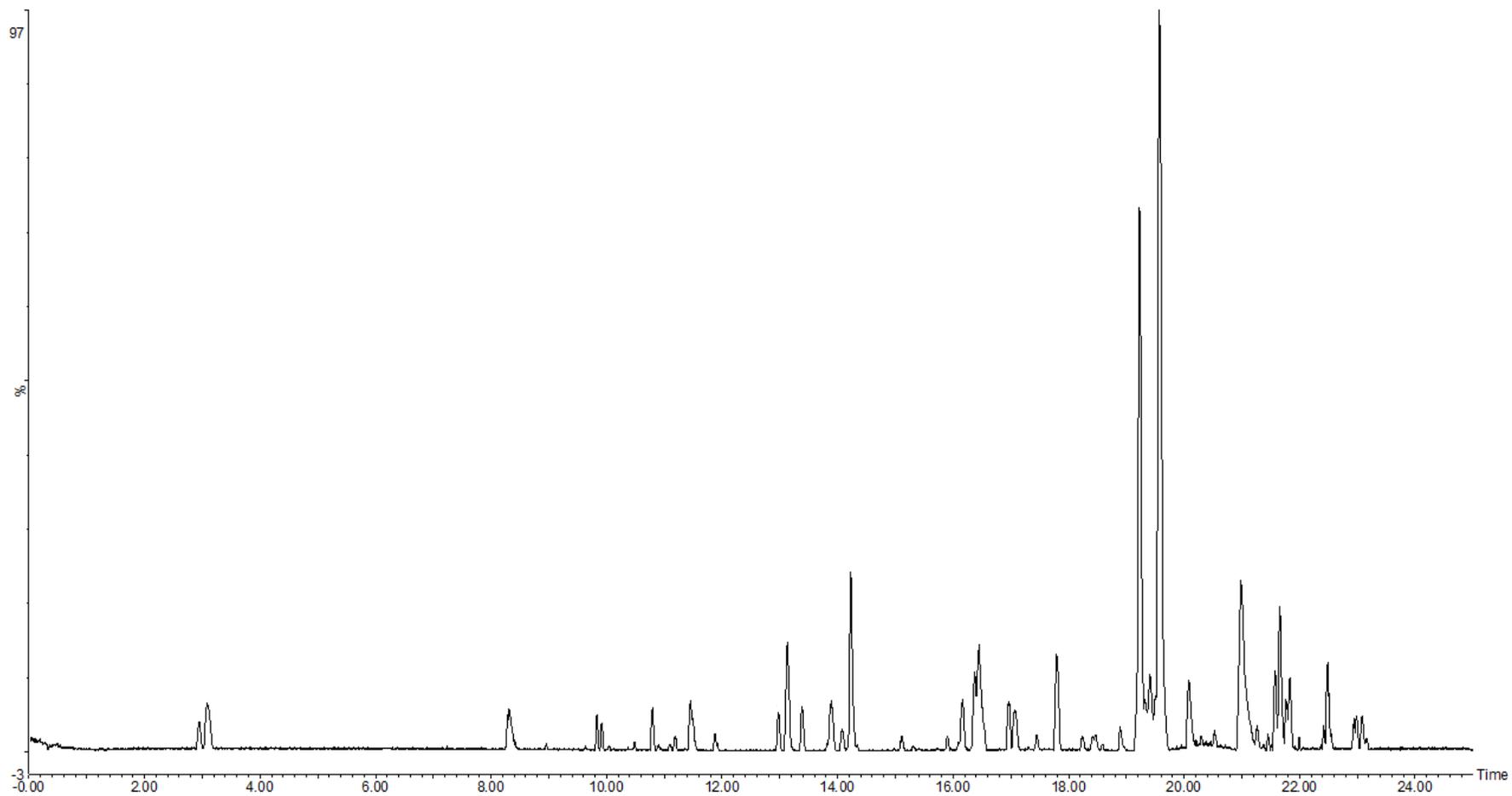


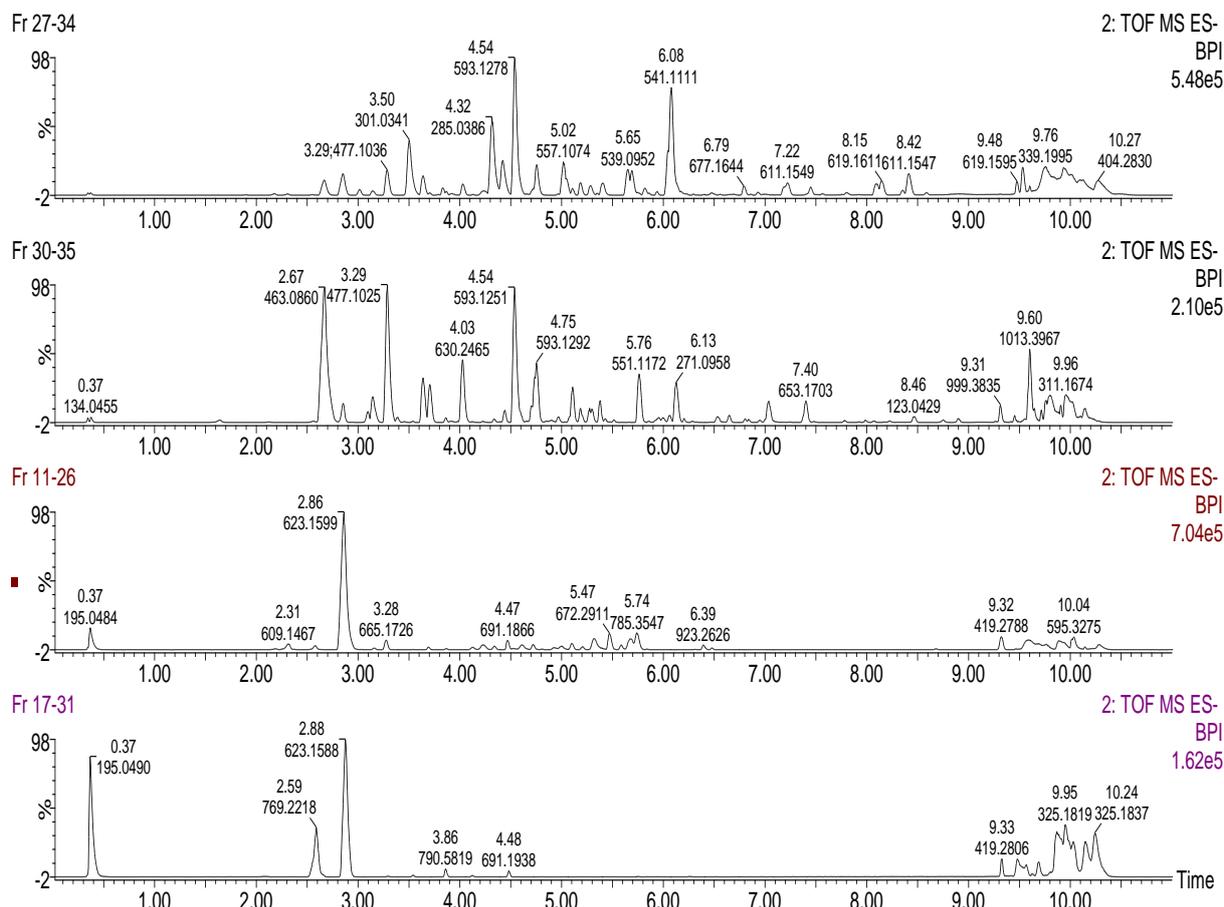
Tabela 6 - Caracterização de compostos em frações obtidas por Sephadex LH-20 (1–7) de pólen apícola de *M. pudica* por UPLC-DAD-qTOF-MS^E.

Tr	λ (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Calculado	Íons produto	Composto proposto	(Fr 1)	(Fr 2)	(Fr 3)	(Fr 4)	(Fr 5)	(Fr 6)	(Fr 7)	
4	2,32	353	609,1464	609,1461	463,0681 [M-H-desoxihexose] ⁻ , 300,0272 [M-2H-rutinosídeo] ⁻	Tetrahidroxiflavona ramnose-glicosídeo			X	X		X	X
7	2,58	354	769,2210	769,2127	623,2001 [M-H-desoxihexose] ⁻ , 315,0442 [M-H-2xdesoxihexose-hexose] ⁻	Isoramnetina di-desoxihexose hexosídeo	X	X	X	X			
8	2,66	354	463,0858	463,0882	301,0338 [M-H-hexose] ⁻ , 273,0639 [M-H-hexose-CO] ⁻ , 255,0280 [M-H-hexose-CO-H ₂ O] ⁻	Isoquercetina**					X	X	X
14	3,29	352	477,1018	477,1039	315,0486 [M-H-hexose] ⁻ , 285,0413 [M-H-hexose-CO] ⁻	Isoramnetina hexosídeo					X	X	X
15	3,50	372	301,0343	301,0354	273,0397 [M-H-CO] ⁻ , 255,0585 [M-H-CO-H ₂ O] ⁻ , 193,0336 [M-H-fragm anel B] ⁻	Pentahidroxiflavona							X
16	3,64	354	477,1018	477,1039	315,0486 [M-H-hexose] ⁻ , 285,0413 [M-H-hexose-CO] ⁻	Isoramnetina hexosídeo							X
17	3,66	352	519,1146	519,1144	477,1002 [M-H-acetil] ⁻ , 315,0564 [M-H-acetil-hexosídeo] ⁻	Isoramnetina acetil hexosídeo						X	
19	3,70	365	431,0976	431,0984	285,0431 [M-H-desoxihexose] ⁻ , 539,0997 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 513,1203 [M-H-CO ₂] ⁻	Canferol desoxihexosídeo				X	X		
41	5,00	295	557,1071	557,1089	495,1100 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻ , 311,0547 [M-H- H ₂ O-CO ₂ -2xC ₆ H ₅ O] ⁻	Naringenina-Eriodictiol							X

42	5,04	320	555,0929	555,0932	527,0984 [M-H-CO]-, 469,0954 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₂ O]-, 351,0522 [M-H-CO ₂ - 3C ₂₄ H ₂ O]- 309,0393 [M-H- CO ₂ -C ₁₁ H ₁₁ O]-, 495,1099 [M-H-CO ₂]-, 453,0980 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₂ O]-, 351,0402 [M-H-CO ₂ - 3x(C ₂₄ H ₂ O)]-	Dihidro-hidroxi- amentoflavona			X
54	5,64	293	539,0957	539,0983	443,0422 [M-H-C ₆ H ₆ O]-, 417,0682 [M-H-C ₇ H ₅ O ₂]-, 375,0575 [M-H-C ₁₀ H ₆ O ₅]-, 309,0503 [M-H-C ₇ H ₅ O ₂ - C ₆ H ₄ O ₂]- 429,0839 [M-H-C ₆ H ₆ O ₃]-, 285,0372 [M-H-O- metilflavona]- 497,1239 [M-H-CO ₂]-, 395,0751 [M-H-C ₉ H ₈ O ₃]-, 351,0851 [M-H-C ₉ H ₈ O ₃ -CO ₂]- , 311,0536 [M-H-2x(C ₆ H ₅ O)- CO ₂]-	Rusflavona*			X
55	5,69	335	537,0813	537,0827	429,0839 [M-H-C ₆ H ₆ O ₃]-, 285,0372 [M-H-O- metilflavona]- 497,1239 [M-H-CO ₂]-, 395,0751 [M-H-C ₉ H ₈ O ₃]-, 351,0851 [M-H-C ₉ H ₈ O ₃ -CO ₂]- , 311,0536 [M-H-2x(C ₆ H ₅ O)- CO ₂]-	Amentoflavona*/**			X
57	5,77	328	551,1188	551,0983	429,0839 [M-H-C ₆ H ₆ O ₃]-, 285,0372 [M-H-O- metilflavona]- 497,1239 [M-H-CO ₂]-, 395,0751 [M-H-C ₉ H ₈ O ₃]-, 351,0851 [M-H-C ₉ H ₈ O ₃ -CO ₂]- , 311,0536 [M-H-2x(C ₆ H ₅ O)- CO ₂]-	O-metil biapigenina	X	X	
61	6,08	290	541,1119	541,1140	135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 577,1910 [M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]- 577,1910-[M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]-	Rusflavanona*			X
62	6,13	287	271,0977	271,0611	135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 577,1910 [M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]- 577,1910-[M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]-	Naringenina**	X		
65	6,64	287	271,0963	271,0611	135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 577,1910 [M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]- 577,1910-[M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]-	Trihidroxiflavanona	X		
66	8,08	327	621,1770	621,1402	135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 577,1910 [M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]- 577,1910-[M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]-	Hidroximetilbutenil amentoflavona			X
72	9,54	327	621,1770	621,1402	135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 135,0431 [M-H-C ₈ H ₈ O ₂]-, 109,0273 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂]- 577,1910 [M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]- 577,1910-[M-H-CO ₂]-, 509,3323 [M-H-C ₅ H ₉ O-CO]-, 391,1195 [M-H-C ₈ H ₆ -C ₄ H ₇ O]-	Hidroximetilbutenil amentoflavona			X

*Substâncias isoladas **Comparado com o padrão autêntico

Figura 7 Cromatograma do íon pico base (BPI) obtido em modo negativo de quatro frações representativas de *M. pudica* obtidas por Sephadex LH-20 analisada por UPLC-DAD-qTOF-MS.



De forma geral foram encontradas 3 classes principais de substâncias que estão envolvidas em diferentes funções tanto para abelha como da espécie vegetal coletada. As Figuras 8, 9 e 10 mostram o perfil de formação de íons produtos para um composto que se apresenta como exemplo para cada uma delas.

Figura 8 Proposta de formação de íons produto de Isoramnetina-3-neohesperdosideo (9) em ESI negativo (A) Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados (B).

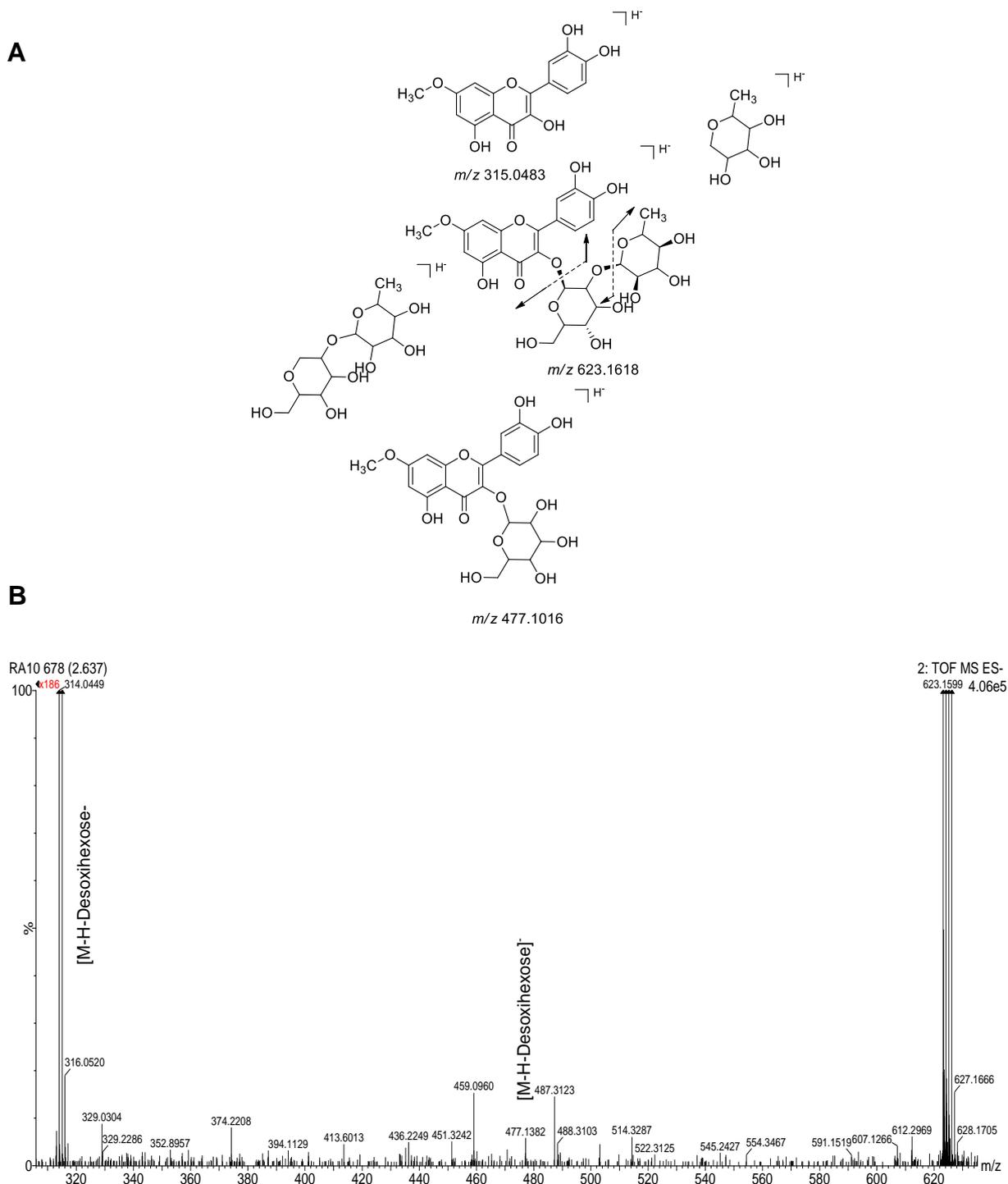


Figura 9 Proposta de formação de íons produto de rusflavona (**54**) em ESI negativo (A) Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados (B).

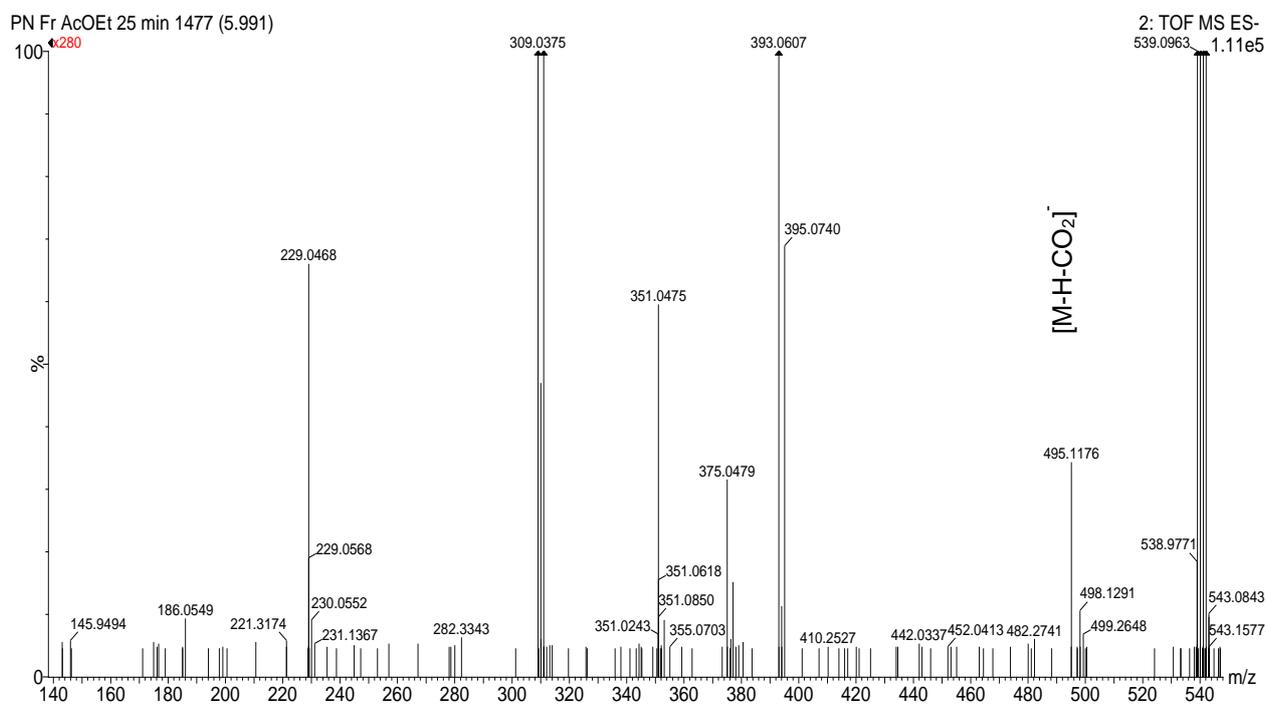
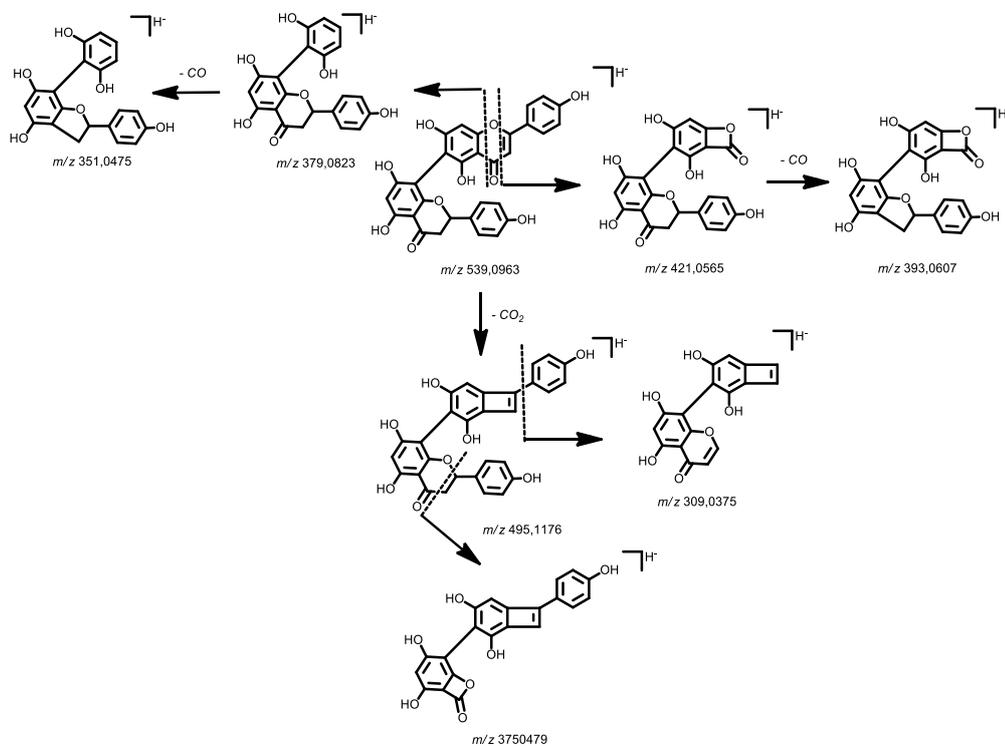
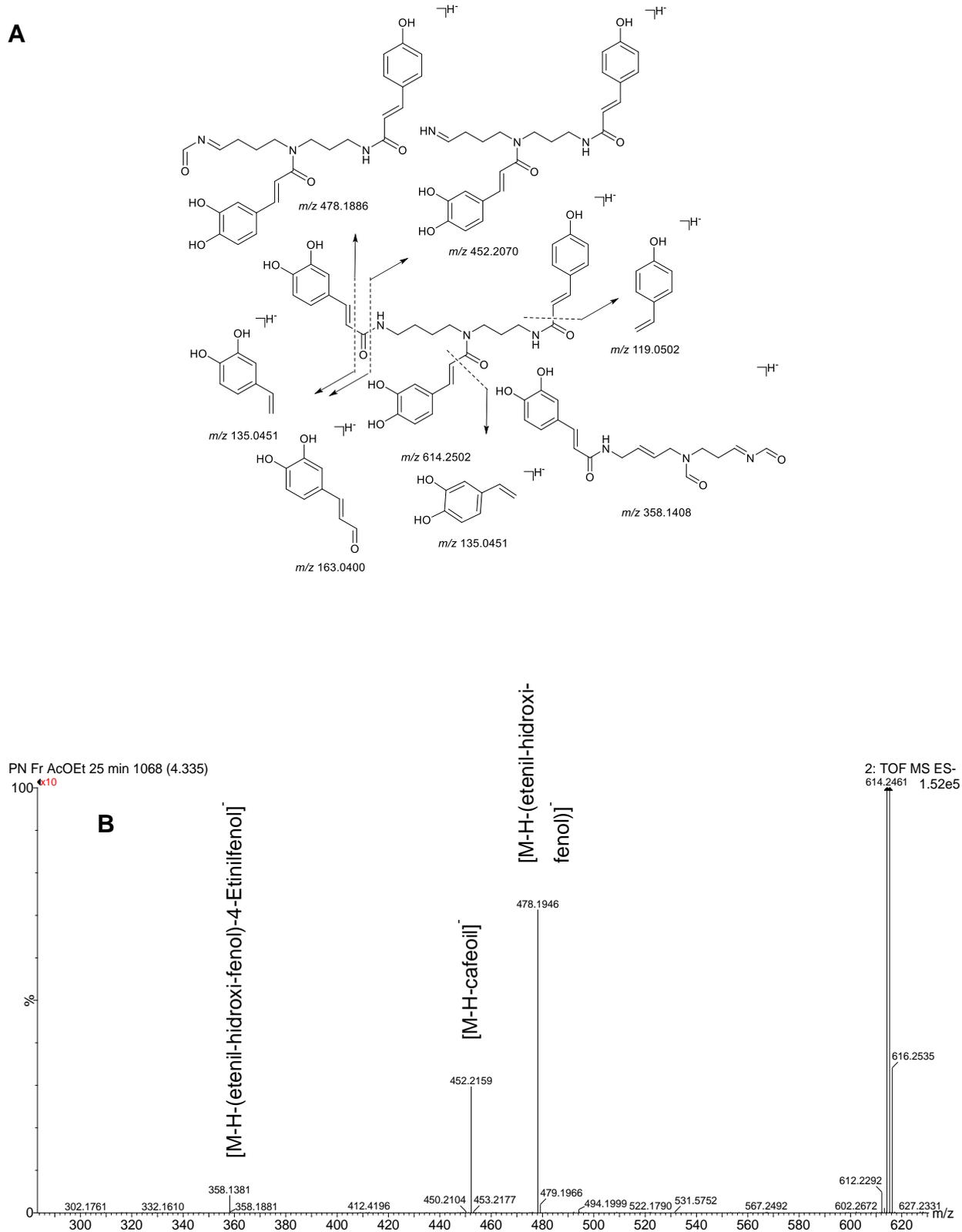


Figura 10 Proposta de formação de íons produto de *N',N''*-dicafeoil, *N''*-coumaroil espermidina (**25**) em ESI negativo (A). Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados (B).



4.2.2. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS do pólen apícola de *A. funifera*

Para o pólen apícola de piaçava os compostos foram tentativamente identificados por UPLC-DAD-qTOF/MS/MS nas frações acetato de etila e hexânica obtidas por extração líquido-líquido. A Tabela 7 mostra os dados obtidos pela análise dos espectros de íons produto de cada substância. Os compostos foram caracterizados por análise dos íons produto (espectros MS^E) e espectros de UV, além de comparação com a literatura. Dos compostos analisados na amostra 54 foram identificados, sendo um açúcar (**1**), oito flavonoides (**9, 14, 15, 54, 55, 57, 60 e 64**), dois derivados de putrescina (**20 e 24**), dezesseis derivados da espermidina/ácido cinâmico (**6, 21, 22, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 43, 44 e 47**) e 27 lipídeos (**70, 73, 74, 79, 81, 82, 84, 85, 87, 88, 90, 93, 94, 96, 97, 100, 105, 106, 109, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 126 e 128**). A extração líquido-líquido (partição) permitiu que os compostos fossem separados e concentrados de acordo com seu coeficiente de partição, sendo compostos de média polaridade concentrados na fração acetato de etila e os menos polares na fração de hexano. Os cromatogramas obtidos por UPLC-DAD e pico de íons base (UPLC-qTOF/MS^E) em modo negativo das frações de pólen apícola de piaçava são mostrados na Figura 11.

Identificação dos derivados de espermidina

O composto **6** mostrou picos de íons desprotonados em m/z 436,2246 com íons produto em m/z 316,1637 e m/z 196,2963 característicos de perda de uma e duas porções coumaroil, respectivamente. Assim, o composto foi sugerido como dicoumaroil espermidina. O composto **20** apresentou pico da molécula desprotonada em m/z 379,1663 [M-H]⁻ e absorção máxima de 295 nm no espectro de UV, além de íons produto em m/z 259,1355 [M-H-(etenil-fenol)]⁻ referente a perda de uma porção coumaroil, m/z 233,2124 [M-H-coumaroil]⁻ atribuída a perda neutra de um grupo coumaroil e em m/z 162,1490 [M-H-coumaroil-C₄H₇N]⁻ essas perdas são características de um derivado do ácido cinâmico. Com base nesses dados e comparação com a literatura, o composto foi sugerido como dicoumaroil-putrescina. O composto **24** mostrou pico da molécula desprotonada em m/z 409,1767 [M-H]⁻, UV máx em 315 nm e íons produtos em m/z 289,1142 [M-H-(etenil-fenol)]⁻ e m/z 259,1055

GOMES, A. N. P.

[M-H-(etenil-metoxi-fenol)], os quais correspondem a perda de uma porção feruloil, respectivamente. Quando comparado ao composto **20** (dicoumaroil putrescina) foi possível observar diferença de 30 Da a mais no composto **24**, o que sugere a presença do grupo metoxila, com esses dados foi possível identificar **24** como conjugado de coumaroil-feruloil-putrescina. Ambos os derivados da putrescina já foram identificados previamente em pólen apícola da família Fabaceae (CALDAS et al., 2019).

Os compostos **36**, **37**, **43** e **47** mostraram tanto perdas de 120 Da e 136 Da, como também perdas de 150 Da e 30 Da, sendo estas últimas características de porção feruloil. Os isômeros **36** e **37** (m/z 628,2662) mostraram íons produto em m/z 598,2581 referente a perda do grupo metoxila e em m/z 492,2100 pela perda da porção coumaroil, com esses dados e por comparação com a literatura os compostos foram identificados como *N'*-cafeoil, *N''*-feruloil, *N'''*- coumaroil espermidina. O composto **43** com pico de íon desprotonado em m/z 612,2708 mostrou em MS² íons produto formados pela perda da porção coumaroil em m/z 492,2128 e porção feruloil em m/z 462,2039, além da perda neutra do grupo feruloil em m/z 434,2104 através dos dados o composto foi sugerido como *N',N''*-dicoumaroil,*N'''*-feruloil espermidina. O composto **47** (m/z 642,2830) quando comparado com a substância **43** mostrou excedente de 30 Da, estes dados permitem atribuir ao composto **47** a presença de uma metoxila. Os íons produto característicos para **47** em m/z 522,2214 e m/z 492,2696 são atribuídos a perda de uma porção coumaroil e feruloil, respectivamente. O que permite identifica-lo como um conjugado *N', N''*-diferuloil, *N'''*-coumaroil espermidina, já identificado em amostras de pólen do sul do Brasil (NEGRI et al., 2011).

O composto **60** (m/z 539,0983) foi sugerido como isômero de **54**. O composto **64** (m/z 539,0983) apresentou-se como isômero de **60** e **54**, porém com um perfil de formação de íons produto diferente. Os íons observados para tal composto foi m/z 413,0624 e m/z 387,0760, os quais são resultados de um rearranjo por Retro-Diels-Alder (RDA), comum em compostos como flavonoides (CALDAS et al., 2019), esses dados permitem sugerir **64** como dihidro-biapigenina.

Identificação de Lipídeos

A identificação dos lipídeos foi realizada pela interpretação dos espectros MS/MS e a comparação dos dados adquiridos com os disponíveis nos seguintes GOMES, A. N. P.

bancos de dados: METLIN (<http://metlin.scripps.edu/index.php>) e LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>) além de comparação com a literatura.

Os dados mostraram que os lipídeos podem ionizar de diferentes maneiras $[M-H]^-$ e $[M-H+HCOO]^-$ para o modo ESI negativo (GODZIEN et al., 2015). Foi observada também a formação de $[M-H+CH_3COO]^-$ para glicerofosfolipídeos no modo de ionização negativa.

Foram tentativamente identificadas cinco classes lipídicas, incluindo 5 ácidos graxos, 14 glicerofosfolipídeos, 4 cerebrosídeos, 3 ácidos graxos hidroxilados e 1 diglicerídeo, no modo de ionização negativa (Tabela 7), esses compostos não mostram absorção no espectro de UV devido ausência de cromóforos.

Entre os principais ácidos graxos (RCOOH) encontrados no pólen apícola, os mais abundantes são o ácido linolênico, linoleico, palmítico e oleico (GARDANA et al., 2018). No pólen apícola de piaçava foram identificados 2 ácidos graxos saturados, 1 monoinsaturados e 2 poli-insaturados. O íon produto observado no espectro MS do modo negativo de ácidos graxos $[M-H-44]^-$ corresponde à perda neutra de CO_2 (MOK et al., 2016). O grau de saturação influencia o perfil de fragmentação, de modo que quanto menos ligações duplas mais limitada é a fragmentação, podendo haver ruptura da ligação C-C de acordo com a energia fornecida (KERWIN, WIENS & ERICSSON 1996).

Os compostos **97** (m/z 255,2300), **106** (m/z 283,2641) e **100** (m/z 281,2476), foram sugeridos como ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), os quais são ácidos graxos saturados e ácido oleico (C18:1), ácido graxo monoinsaturado (MOK et al., 2016), com base em dados comparados a literatura (NEGRI et al., 2018). Os compostos **94** (m/z 277,2145) e **96** (m/z 279,2309) mostraram perdas de CO_2 fornecendo íons produto em m/z 233,2238 e m/z 235,1266, respectivamente. Esses dados forneceram informações capazes de sugerir os compostos como ácido linolênico (C18:3) e linoleico (C18:2), respectivamente. Os ácidos palmítico, linoleico, esteárico e oleico também foram previamente identificados em amostras de pólen apícola coletadas no município de Canvierias, Bahia (NEGRI et al., 2018).

Os compostos **82**, **105** e **113** mostraram íons $[M-H]^-$ semelhantes aos ácidos graxos hidroxilados relatados no pólen de *Brassica campestris* (YANG; YANG; LI, 2012). O composto **82** apresentou íon desprotonado em m/z 295,2267 e íons produtos em m/z 277,2057 pela perda de uma molécula de água, indicativa da presença de

uma hidroxila livre, os íons m/z 269,7659 e m/z 255,2469 foram formados a partir da cisão do grupo alila e a fissão no carbono β ao grupo OH, respectivamente (ZHANG et al., 2011), portanto, foi tentativamente identificada como ácido hidroxiocetadecaenóico (C18:2). Plettner, Slessor e Winston, (1998) mostraram que esse composto trata-se de um ácido mandibular biossintetizado pelas abelhas *Apis mellifera* a partir do ácido octadecanóico, e que a hidroxilação pode ocorrer na penúltima ou na última posição. Os compostos **105** (m/z 327,2924) e **113** (m/z 355,3210) também foram sugeridos como ácidos graxos hidroxilados do tipo ácido hidroxi-eicosanoico (C20:0) e ácido hidroxi docosanoico (C22:0), respectivamente.

Os glicerofosfolípídeos são os lipídeos estruturais mais comumente encontrados na membrana celular, os quais possuem principalmente ácidos graxos poli-insaturados de carbono C16/C18 (Dahl 2018). De acordo com Li et al. (2017) em amostras de pólen de abelha mais de 65% das substâncias identificadas no modo de ionização negativa pertencem à classe dos glicerofosfolípídeos. Esses compostos constituem-se de duas partes, uma delas invariável que inclui um grupo principal, um grupo fosfato e um esqueleto de glicerol, e outra variável que inclui um grupo polar ligado ao fosfato e os ácidos graxos que estão ligados nas posições chamadas de sn-1 e/ou sn-2, sendo nessas ligações observadas as principais fragmentações (LI et al., 2017). Quase todos os glicerofosfolípídeos são ionizáveis por ESI, a formação dos íons produtos é favorecida pelos grupos polares que distinguem as classes (HSU & TURK 2009). Existem três padrões possíveis de íons característicos de fosfolípídeos no ESI das cadeias de ácidos graxos no modo negativo ($[RC=O]^+$, $[RCOOH]^-$ e íon neutro $R'CH=CO$) (PI; WU; FENG, 2016).

O composto **109** mostrou um íon desprotonado em m/z 762,5065 e íons produto em m/z 277,2133 referente ao ácido graxo $[RCOOH]^-$, em m/z 484,2882 $[M-H-RCOOH]^-$, formado pelo perda do ácido graxo e íons característicos em m/z 140,0503 $[C_2H_7O_4NP]^-$ e m/z 196,9383 $[C_5H_{11}O_5NP]^-$. Assim, por meio desses dados e comparação com a literatura foi sugerida como diacilglicerofosfoetanolamina ou PE (18:3/20:3). Os compostos **115** (m/z 764,5200) e **119** (m/z 740,5239) apresentaram perda de ácidos graxos (m/z 279,2304 e 277,2138, respectivamente), sendo foram sugeridos como PE (18:2/20:3) e PE (18:3/18:0).

Os glicerolípídeos (triacilgliceróis e diacilgliceróis) podem ser considerados pertencentes ao mesmo grupo que os glicerofosfolípídeos (fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina, etc.), pois compartilham um esqueleto de glicerol comum em suas estruturas. No entanto, esses dois tipos de lipídeos têm propriedades químicas e funções biológicas totalmente diferentes, onde os glicerolipídeos são neutros (ausência de carga aparente) responsáveis pelo armazenamento de energia, e os fosfolipídeos têm características polares (em parte da substância) e compõem a estrutura de bicamada de membrana (MURPHY; AXELSEN, 2011). O composto **128** mostrou pico do íon molecular desprotonado em m/z 709,5765 e íons produto em m/z 325,2973 e m/z 311,1616 que correspondem a grupos de cadeia longa nas posições sn-1 (C21:0) e sn-2 (C22:6) seguida pela perda de H₂O que são perdas do glicerol, essas perdas são encontradas em outros tipos de diglicerol, mostradas em um estudo de caracterização espectral de glicerolipídeos (HEIM et al., 2009). Assim, pode-se sugerir que o composto em questão pertence à classe de glicerolipídeos que são relatados como diacilglicerol (DG 21:0/22:6).

O lisofosfolipídeo ou monoacilglicerofosfolipídeo é um glicerofosfolipídeo que contém um fosfato e um grupo principal polar ligado (que pode ser etanolamina, colina ou inositol), o qual possui apenas uma única cadeia acil conectada ao glicerol e semelhante aos glicerofosfolipídeo que podem ser classificados em diferentes classes com base em seus grupos principais polares (WANG; WANG; HAN, 2015). Para as monoacilglicerofosfoetanolamina (LPE), o principal íon produto observado consiste na perda da cadeia dos ácidos graxos (FANG; YU; BADGER, 2003).

Os compostos **70**, **74** e **87** mostraram esse tipo de formação de íons produto, cada um com seu respectivo ácido graxo ligado à cadeia de glicerol. **70** (m/z 474,2623) e **74** (m/z 476,2682) mostraram um pico intenso em m/z 277,2231 e m/z 279,2294 devido à perda de C18:3 e C18:2, respectivamente, sendo assim identificados como LPE 18:3 e LPE 18:2. **87** mostrou pico do íon desprotonado em m/z 452,2783 e íon produto em m/z 255,2291 devido à perda de ácido graxo C16:0, por isso foi sugerido como LPE 16:0.

Quando operadas no modo negativo, espécies moleculares de monoacilglicerofosfocolina (LPC) produzem íons moléculas desmetiladas abundantes [M-CH₃]⁻ (pico base) e íons aduto [M+HCOOCH₃]⁻, fatos observados em outros estudos com lipídeos (BERDEAUX et al., 2010, FANG; YU; BADGER, 2003).

Os compostos **73**, **79**, **81**, **84**, **85**, **88**, **90** e **93** mostraram essas características. Os isômeros **73** e **79** (m/z 502,2932) apresentaram pico intenso em m/z 277,2130

devido à perda de C18:3, sendo assim identificado como LPC 18:3. **81** e **84** (m/z 504,3096) isômeros com íons produto formados pela perda de C18:2 em m/z 279,2308, portanto, foram identificados como LPC 18:2. **85** e **88** (m/z 480,3085) apresentaram-se como isômeros com íon produto formado pela perda de C16:0 em m/z 255,2300 e foram identificados como LPC 16:0. **90** (m/z 506,3248) e **93** (m/z 508,3401) mostraram íons do produto em m/z 281,2430 e 283,2605 respectivamente, pela perda de ácidos graxos C18:1 e C18:0, por isso foi sugerido como LPC 18:1 e 18:0. Além disso, todos os compostos mostraram de formação de adutos com acetato ($[M-CH_3+HCOOCH_3]$) característico dessas substâncias também foram observados.

Os esfingolipídeos e glicoesfingolipídeos são constituintes da maioria dos alimentos e também componentes estruturais essenciais das membranas celulares de mamíferos. O grupo amino da base esfingoide é geralmente substituído por um ácido graxo de cadeia longa para produzir ceramidas. Os esfingolipídeos complexos das plantas são principalmente cerebrosídeos (mono e oligohexosilceramidas) com glicose (a hexose mais comum), galactose, manose e inositol (VESPER et al., 1999; WENNEKES et al., 2009).

O composto **117** (m/z 712,5367) mostrou íons produto formados pela perda da cadeia de ácidos graxos em m/z 402,1381 $[M-H-RCOOH]^-$ e fragmentação na porção -NH da ceramida juntamente com o ácido graxo $[HNCOOHR]^-$ em m/z 325,1727. Com esses dados, foi possível sugerir, de acordo com a massa e os íons produto, que o composto em questão é uma ceramida ligada a uma hexose (cerebrosídeo ou HexCer) do tipo HexCer d14:2/20:0. Os compostos **121** e **123** (m/z 740,5615) e **126** (m/z 768,5994) apresentaram perda de 162 Da, devido à perda de uma hexose, comum de cerebrosídeos (HAN; CHENG, 2005). Embora não sejam observados fragmentos de ceramida, pode-se sugerir que sejam esse tipo de composto de acordo com a massa exata e a perda de açúcar, além disso, a literatura relata a presença desses compostos em pólen (PEI; LIU; DI, 2010). Assim, os isômeros **121** e **123** foram dados como GlcCer d14:1/22:1 ou um de seus isômeros e **126** como HexCer d14:1/24:1.

Tabela 7 - Compostos tentativamente identificados em pólen apícola monofloral de *A. funifera* por UPLC-DAD-qTOF-MS^E.

Composto	Tr	λ (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Calculado	Íons produtos	Composto proposto
1	0,37	210	341,1031	341,1031	179,0514 [M-H-hexose] ⁻ , 161,0425 [M-H-hexose-H ₂ O] ⁻	Dissacarídeo
6	2,58	310	436,2246	436,2241	316,1637 [M-H-(etenil-fenol)] ⁻ , 196,2963 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N''</i> -dicoumaroil espermidina
9	2,76	351	623,1615	623,1617	459,0792 [M-H-desoxihexose] ⁻ , 315,9079 [M-H-desoxihexose-hexose] ⁻	Isoramnetina-3-neohesperdosídeo*
14	3,20	346	477,1038	477,1039	315,0622 [M-H-hexose] ⁻ , 285,9301 [M-hexose-OCH ₃] ⁻	Isoramnetina hexosídeo
15	3,41	346	301,0352	301,0354	265,4117 [M-H-2xH ₂ O] 255,0615 [M-H-CO-H ₂ O]	Pentahidroxi-flavona
20	3,73	295	379,1663	379,1663	259,1355 [M-H-(etenil-fenol)] ⁻ , 233,2124 [M-H-coumaroil] ⁻ , 162,1490 [M-H-coumaroil-C ₄ H ₇ N] ⁻	Dicoumaroil putrescina
21	3,85	320	630,2454	630,2457	494,2041 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 468,2074 [M-H-cafeoil] ⁻ , 358,1208 [M-H-2x(etenilhidroxi-fenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -Tricafeoil espermidina
22	3,98	320	630,2454	630,2457	494,2041 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 468,2074 [M-H-cafeoil] ⁻ , 358,1208 [M-H-2x(etenilhidroxi-fenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -Tricafeoil espermidina
24	4,13	315	409,1767	409,1768	289,1142 [M-H-(etenil-fenol)] ⁻ , 259,1055 [M-H-(etenilmetoxi-fenol)] ⁻ , 162,8952[M-H-feruloil-C ₄ H ₇ N] ⁻	Coumaroil-feruloil-putrescina
25	4,28	318	614,2501	614,2507	478,1876 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 452,2147 [M-H-cafeoil] ⁻ , 332,0355 [M-H-cafeoil-(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina

26	4,34	318	614,2501	614,2507	478,1876 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 452,2147 [M-H-cafeoil] ⁻ , 332,0355 [M-H-cafeoil-(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina
30	4,40	318	644,2603	644,2613	614,2515 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 508,2072 [M-H-(5-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 478,2956 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)-OCH ₃] ⁻ , 346,1809 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)-cafeoil] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina
31	4,48	318	644,2603	644,2613	614,2515 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 508,2072 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 478,2956 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)-OCH ₃] ⁻ , 346,1809 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)-cafeoil] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina
32	4,67	316	598,2551	598,2550	464,2072 [M-H-(hidroxietenil-fenol)] ⁻ , 462,2142 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 304,9342 [M-H-dicoumaroil] ⁻	<i>N',N''</i> -dicoumaroil, <i>N'''</i> -cafeoil espermidina
33	4,78	316	598,2550	598,2550	464,2072 [M-H-(hidroxietenil-fenol)] ⁻ , 462,2142 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 304,9342 [M-H-dicoumaroil] ⁻	<i>N',N''</i> -dicoumaroil, <i>N'''</i> -cafeoil espermidina
36	4,80	315	628,2662	628,2664	598,2581 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 492,2100 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 465,2891 [M-H-C ₉ H ₉ NO ₂] ⁻	<i>N'</i> -Cafeoil, <i>N''</i> -feruloil, <i>N'''</i> -espermidina
37	4,85	315	628,2662	628,2664	598,2581 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 492,2100 [M-H-(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ , 465,2891 [M-H-C ₉ H ₉ NO ₂] ⁻	<i>N'</i> -Cafeoil, <i>N''</i> -feruloil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina
38	4,94	310	582,2607	582,2609	462,2187 [M-H-(etenil-fenol)] ⁻ , 342,1862 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -Tricoumaroil espermidina
39	5,06	310	582,2607	582,2609	462,2187 [M-H-(etenil-fenol)] ⁻ , 342,1862 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -Tricoumaroil espermidina
43	5,18	310	612,2708	612,2715	582,2562 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 492,2128 [M-H-(etenil-fenol)] ⁻ , 462,2039 [M-H-(etenilmetoxi-fenol)] ⁻ , 434,2104 [M-H-feruloil] ⁻ , 147,1798 [M-H-coumaroil-feruloil espermidina] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicoumaroil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina

47	5,31	320	642,2830	642,2820	522,2214 [M-H-(etenil-fenol)] ⁻ , 492,2096 [M-H-etenilmetoxi-fenol] ⁻	<i>N',N''</i> -Diferuloil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina
48	5,44	320	672,2923	672,2926	582,3352 [M-H-3xOCH ₃] ⁻ , 480,9842 [M-H-C ₁₀ H ₁₁ NO ₃] ⁻ , 522,2361 [M-H-(etenilmetoxi-fenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -Triferuloil espermidina
54	5,98	330	539,0983	539,0983	495,1117 [M-H-CO ₂] ⁻ , 453,1292 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻ , 375,0491[M-H-CO ₂ -C ₈ H ₈ O] ⁻ , 351,0537 [M-H-CO ₂ -C ₉ H ₄ O ₃] ⁻	Rusflavona
55	6,13	335	537,0827	537,0827	375,0457 [M-H-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 443,0248 [M-H-C ₆ H ₆ O ₁] ⁻ , 417,2223 [M-H-C ₇ H ₄ O ₂] ⁻ ,	Amentoflavona*
60	6,07	330	539,0983	539,0983	495,1117 [M-H-CO ₂] ⁻ , 453,1292 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻ , 375,0491[M-H-CO ₂ -C ₈ H ₈ O] ⁻ , 351,0537 [M-H-CO ₂ -C ₉ H ₄ O ₃] ⁻	Isômero de rusflavona
64	6,40	320	539,0983	539,0983	413,0624 (RDA), 387,0760 (RDA)	Dihidro-biapigenina
57	7,18	319	551,0984	551,0983	429,0839 [M-H-C ₆ H ₂ O ₃] ⁻ , 285,0372[M-H-C ₁₅ H ₁₀ O ₆] ⁻ ,	Bilobetin (monometilamentoflavona)
70	9,84	-	474,2623	474,2626	277,2231 [Ácido graxo] ⁻	LPE18:3
73	9,63	-	502,2932	502,2939	277,2130 [Ácido graxo] ⁻	LPC18:3/0:0
79	9,91	-	502,2930	502,2939	277,2130 [Ácido graxo] ⁻	LPC18:3/0:0
81	10,49	-	504,3099	504,3096	279,2308 [Ácido graxo] ⁻	LPC18:2/0:0
82	10,62	-	295,2267	295,2279	277,2057 [M-H-H ₂ O] ⁻	Ac Hidroxi octadecadienoico C18:2

74	10,72	-	476,2682	476,2783	279,2294 [Ácido graxo] ⁻	LPE18:2
84	10,79	-	504,3094	504,3096	279,2308 [Ácido graxo] ⁻	LPC18:2/0:0
85	11,07	-	480,3039	480,3096	255,2300 [Ácido graxo] ⁻	LPE18:0
87	11,36	-	452,2783	452,2783	255,2291 [Ácido graxo] ⁻	LPE16:0
88	11,44	-	480,3085	480,3096	255,2300 [Ácido graxo] ⁻	LPE18:0
90	11,87	-	506,3248	506,3252	281,2430 [Ácido graxo] ⁻	LPC18:1/0:0
93	13,29	-	508,3401	508,3409	283,2605 [Ácido graxo] ⁻	LPC18:0/0:0
94	13,85	-	277,2145	277,2173	233,2238 [M-H-CO ₂] ⁻	Ácido linolênico
96	15,06	-	279,2309	279,2330	235,1266 [M-H-CO ₂] ⁻	Acido linoleico
97	16,15	-	255,2300	255,2330	211,1454 [M-H-CO ₂] ⁻	Ácido palmítico
100	16,49	-	281,2476	281,2486	237,0178 [M-H-CO ₂] ⁻	Ácido oleico
105	17,89	-	327,2924	327,2904	-	Ácido hidroxi eicosanoico C20:0
106	18,02	-	283,2641	283,2643	265,7574[M-H-H ₂ O] ⁻	Ac esteárico
109	19,13	-	762,5065	762,5079	277,2133 [Ácido graxo] ⁻	PE18:3/20:3
113	19,55	-	355,3210	355,3217	-	Ácido hidroxi docosanoico C22:0
115	20,02	-	764,5200	764,5236	279,2304 [Ácido graxo] ⁻	PE18:2/20:3
117	20,18	-	712,5367	712,5369	402,1381 [M-H-RCOOH] ⁻ , 325,1727 [NHCOOHR] ⁻	HexCer14:2/20:0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

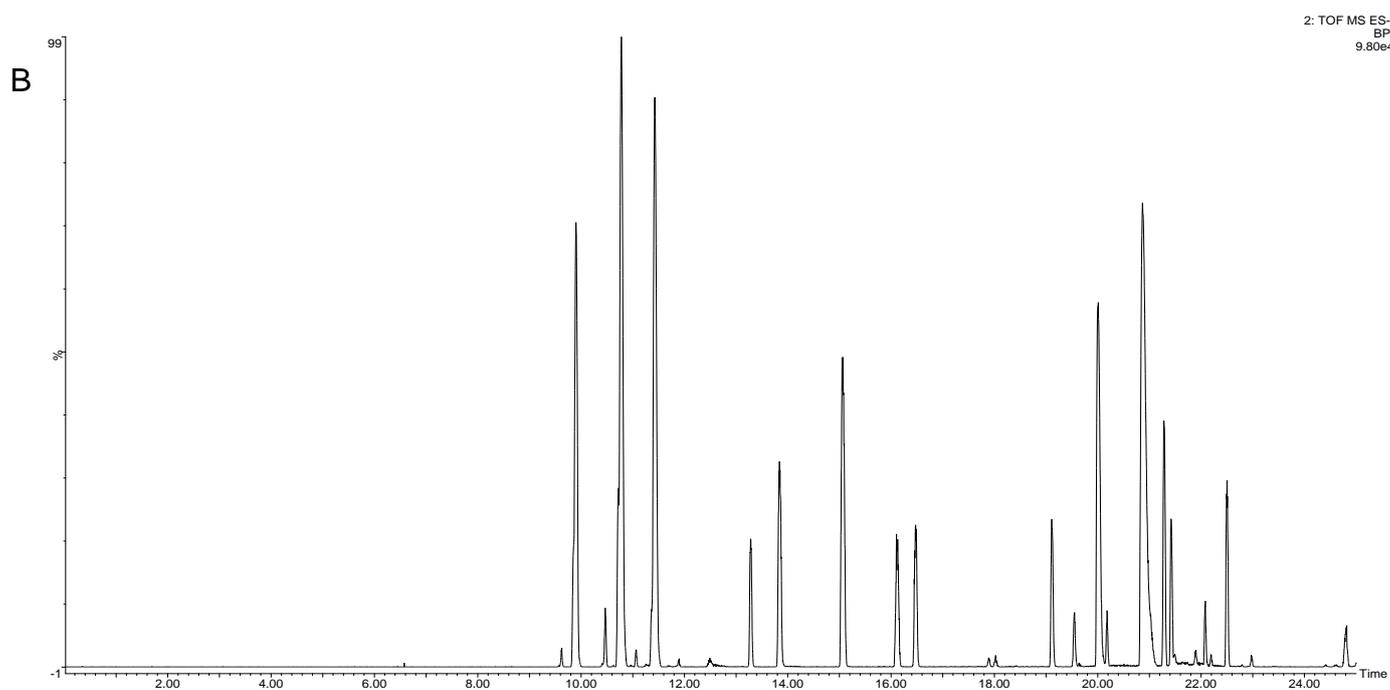
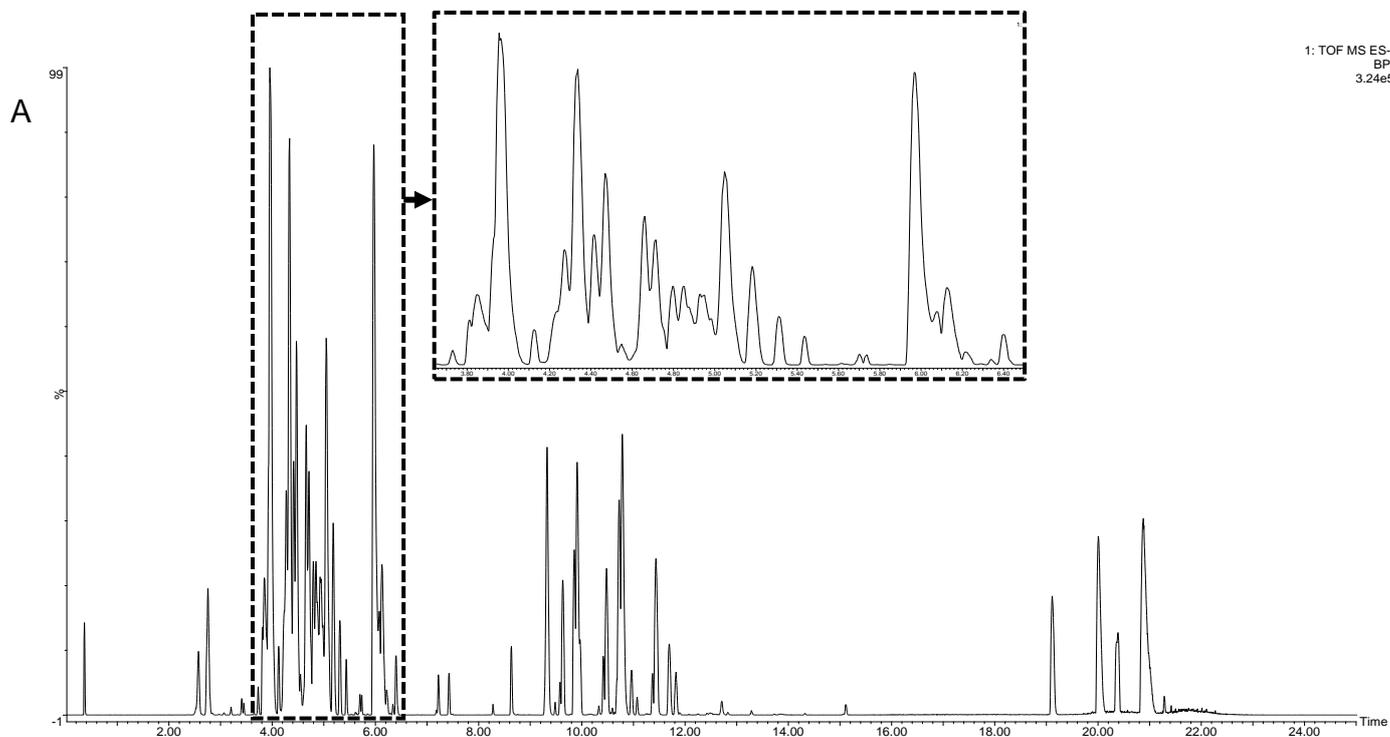
| 73

119	20,86	-	740,5239	740,5236	277,2138 [Ácido graxo] ⁻	PE18:3/18:0
121	21,29	-	740,5615	740,5600	578,4788 [M-H-hexose] ⁻	HexCer14:1/22:1
123	21,42	-	740,5615	740,5600	578,4788 [M-H-hexose] ⁻	HexCer14:1/22:1
126	22,08	-	768,5925	768,5995	606,5219 [M-H-hexose] ⁻	HexCer14:1/24:1
128	22,51	-	709,5765	709,5764	325,2973 [Ácido graxo] ⁻ , 311,1616 [Ácido graxo-H ₂ O] ⁻	DG (21:0/22:6)

*Substância identificada por comparação com padrão

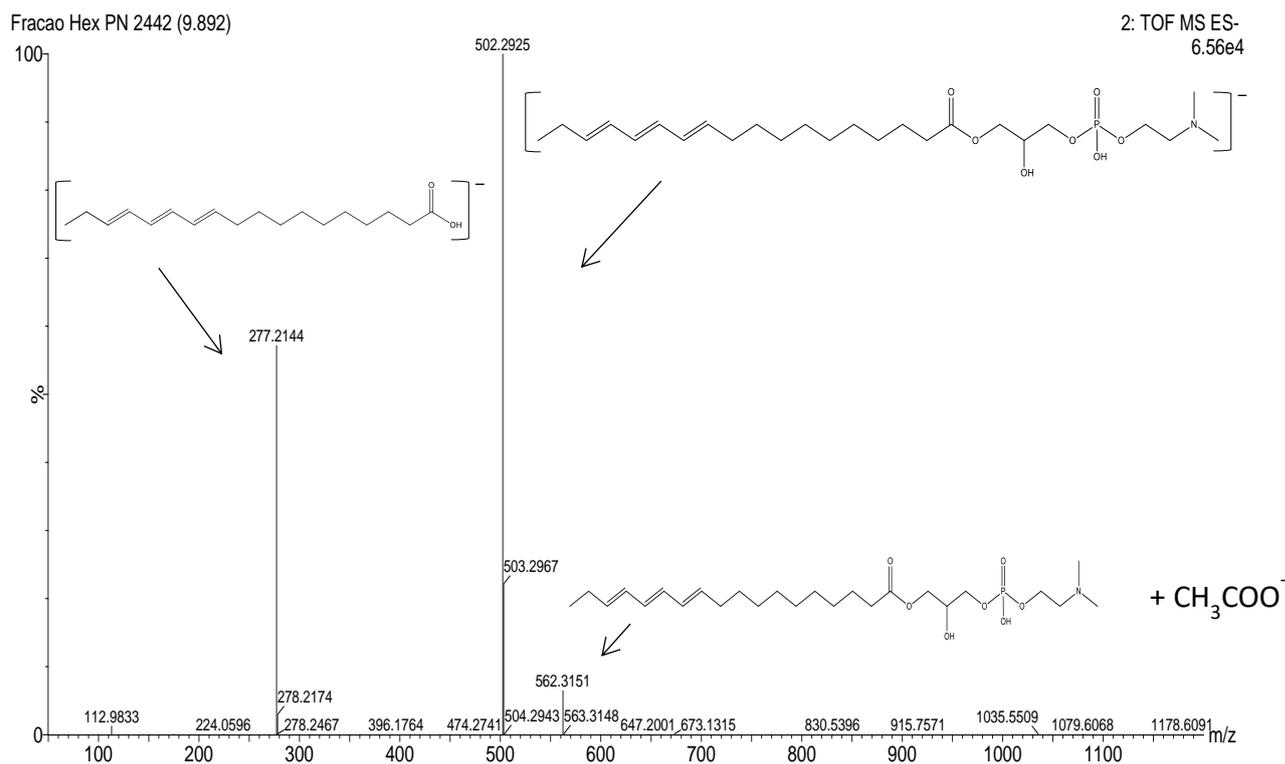
LPE: Monoacilglicerofosfoetanolaminas; LPC: Monoacilglicerofosfocolinas; DG: Diacilgliceróis; PE: Diacilglicerofosfoetanolamina;; HexCer: Hexosil ceramidas; CE: Ésteres de colesterol; ST HexNAc: conjugados de esterol N-acetil-hexosamina

Figura 11 Cromatograma do íon pico base obtido por MS^E (UPLC-qTOF/MS^E) em modo negativo (A), e cromatograma do íon pico base obtido por MS^E (UPLC-qTOF/MS^E) em modo negativo da fr Hex (B) obtidas por partição do pólen apícola de *A. funifera*.



A Figura 12 mostra o perfil de formação de íons produtos para um composto que se apresenta como exemplo para os lipídeos.

Figura 12 Espectro de massas mostrando os principais íons produto formados a partir de LPC 18:3/0:0 (Isômeros **73** e **79**) em ESI negativo



4.2.3. Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS do pólen apícola de *E. guineensis*.

Para o pólen apícola de dendê os compostos foram tentativamente identificados por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS nas frações metanólicas obtidas por extração em fase sólida (SPE) (Figura 13). A Tabela 8 mostra os dados obtidos pela análise dos espectros de íons do produto de cada substância. Os compostos foram caracterizados por análise dos íons do produto (espectros MS^E) e espectros de UV além de comparação com a literatura.

40 compostos foram identificados, sendo um açúcar (**1**), dezessete flavonoides (**2, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 15, 29, 35, 49, 50, 54, 55, 58, 59 e 64**), vinte e dois derivados da espermidina/ácido cinâmico (**21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 40, 44, 45, 46, 51, 52 e 53**). Com exceção de **5, 49, 50, 58 e 59**, todos os outros compostos ou seus isômeros foram previamente descritos nas amostras de *M. pudica* ou *A. funifera*. A Tabela 8 mostra os íons produto formados para todos os compostos na amostra de pólen apícola de dendê.

O composto **5** mostrou pico do íon molecular desprotonado em m/z 593,1512 e UV máx em 345 nm, com íons produto em m/z 477,1243 pela perda de uma desoxihexose e em m/z 314,7609 pela perda de uma pentose, com isso foi sugerido como isoramnetina pentosil desoxihexosídeo. Os isômeros **49 e 50** (m/z 593,1276) mostraram UV máx em 315 nm, além de íons produto em m/z 447,0935 pela perda de um grupo coumaroil, e em m/z 301,0352 pela perda de uma unidade de coumaroil seguida de uma desoxihexose, com esses dados foi possível sugerir que o composto em questão se trata de uma tetrahidroxiflavona coumaroil desoxihexosídeo. Os isômeros **58 e 59** apresentaram pico do íon desprotonado em m/z 577,1334 com Uv máx em 317 nm. O perfil de íons produto em MS² mostrou perda de uma unidade de coumaroil em m/z 431,0983 e de coumaroil juntamente com uma desoxihexose em m/z 285,0401, podendo ser sugerido como canferol coumaroil desoxihexosídeo.

A caracterização química das amostras de pólen apícola por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS demonstra a riqueza de compostos presentes, bem como certa prevalência de determinados compostos (flavonoides, acil espermidinas e biflavonoides), independente da espécie vegetal visitada. Isso pode ser indicativo de que as abelhas selecionam as espécies vegetais que possuem principalmente essas substâncias, as

quais possuem diferentes atividades biológicas já relatadas e que as abelhas podem se beneficiar dessas propriedades.

Figura 13 Cromatograma do íon pico base (BPI) obtido em modo negativo de três frações representativas de *E. guineensis* obtidas por SPE analisada por UPLC-qTOF-MS.

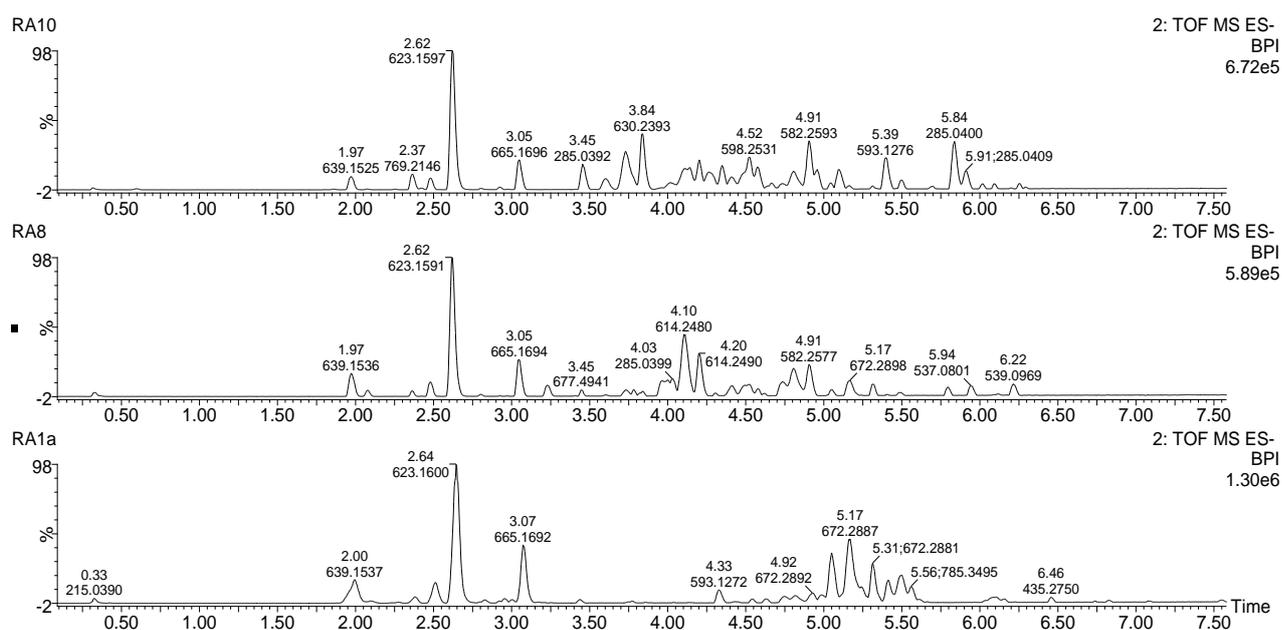


Tabela 8 - Compostos tentativamente identificados em pólen apícola monofloral de *E. guineensis* por UPLC-DAD-qTOF-MS^E.

Tr	λ (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	Calculado	Íons produto	Composto proposto	(Jul/13)	(Jan/14)	(Fev/14)	(Abr/14)	(Mai/14)	
1	0,32	210	341,1095	341,1089	179,0514 [M-H-Hexose] ⁻ , 161,0425 [M-H-Hexose-H ₂ O] ⁻	Dissacarídeo	X	x	x	x	X
2	1,97	345	639,1536	639,1567	477,1011 [M-H-hexose] ⁻ , 315,0523 [M-H-2xhexose] ⁻	Isoramnetina di- hexosídeo	X	X	X	X	X
3	2,07	272	639,1559	639,1567	609,1452 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 314,0461 [M-2H-2xhexose] ⁻	Isoramnetina di- hexosídeo	X	X	X		
5	2,45	264, 345	593,1512	593,1512	447,1243[M-H-desoxihexose] ⁻ , 314,7609[M-2H-pentose] ⁻	Isoramnetina pentosil desoxihexosídeo	X	X	X	X	X
7	2,36	354	769,2150	769,2127	623,7853[M-H-desoxihexose] ⁻ , 315,0442[M-H-2xdesoxihexose- hexose] ⁻	Isoramnetina didesoxihexose hexosídeo	X	X	X	X	X
9	2,57	252, 354	623,1583	623,1618	459,0916 [M-H-Desoxihexose- H ₂ O] ⁻ , 315,0499 [M-H- Desoxihexose-hexose-2xH ₂ O] ⁻	Isoramnetina-3- neohesperdosídeo*	X	X	X	X	X
11	2,93	345	447,0933	447,0933	301,0365 [M-H-desoxihexose] ⁻	Quecitrina*				X	X
12	3,05	252, 354	665,1698	665,1723	477,1021 [M-H-acetil- desoxihexose] ⁻ , 315,0508 [M-H- hexose-acetil-desoxihexosídeo] ⁻	Isoramnetina-hexose- acetil desoxihexosídeo	X	X	X	X	X
15	3,22	345	301,0352	301,0354	255,0315[M-H-CO-H ₂ O] ⁻ , 151,0047 [RDA]	Pentahidroxi- flavona		X	X		
21	3,60	219	630,2448	630,2457	494,1937 [M-H-(etenilhidroxi- fenol)] ⁻ , 468,2164 [M-H-cafeoil] ⁻ , 358,1410 [M-H-2x(etenilhidroxi- fenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -Tricafeoil espermidina	X	X	X	X	X
22	3,73	221	630,2440	630,2457	494,1940 [M-H-(etenilhidroxi- fenol)] ⁻ , 468,2139 [M-H-cafeoil] ⁻ , 358,1424 [M-H-2x(etenilhidroxi- fenol)] ⁻	<i>N',N'',N'''</i> -Tricafeoil espermidina	X	X	X	X	X
23	3,84	220	630,2438	630,2457	494,1935 [M-H-(etenilhidroxi- fenol)] ⁻ , 468,2128 [M-H-cafeoil] ⁻ ,	<i>N',N'',N'''</i> -Tricafeoil espermidina	X	X	X	X	X

25	3,95	300	614,2473	614,2507	358,1405 [M-H-2x(etenilhidroxi-fenol)] ⁻ 478,1969 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ ; 452,2183 [M-H-cafeoil] ⁻ ; 332,0355 [M-H-cafeoil-(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina	X	X	X	X	X
26	4,03	335	614,2488	614,2507	478,1978 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ ; 452,2195 [M-H-cafeoil] ⁻ ; 332,0355 [M-H-cafeoil-(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina	X	X	X	X	X
27	4,10	330	614,2480	614,2507	478,1970 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ ; 452,2179 [M-H-cafeoil] ⁻ ; 332,1624 [M-H-cafeoil-(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina	X	X	X	x	x
28	4,20	330	614,2484	614,2507	478,1978 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ ; 452,2183 [M-H-cafeoil] ⁻ ; 332,1631 [M-H-cafeoil-(etenil-fenol)] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -coumaroil espermidina	X	X	X	X	X
29	4,32	266,308	593,1272	593,1301	430,0074 [M-2H-hexose] ⁻ ; 285,0404 [M-H-coumaroil-hexose] ⁻	Tilirosídeo*	X				
30	4,26	318	644,2571	644,2613	508,2089 [M-H-etenil-hidroxifenol] ⁻ ; 478,1999 [M-H-etenil- hidroxifenol-OCH ₃] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina				X	X
31	4,34	318	644,2579	644,2613	508,2089 [M-H-etenil-hidroxifenol] ⁻ ; 478,1999 [M-H-etenil- hidroxifenol-OCH ₃] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicafeoil, <i>N'''</i> -feruloil espermidina				X	X
32	4,41	295	598,2536	598,2550	478,1974 [M-H-etenil-fenol] ⁻ ; 462,1021 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ ; 304,9342 [M-H-dicoumaroil] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicoumaroil, <i>N'''</i> -cafeoil espermidina	X	X	X	X	X
33	4,52	295	598,2535	598,2550	478,1980 [M-H- etenil-fenol] ⁻ ; 462,1021 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)] ⁻ ; 304,9342 [M-H-dicoumaroil] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicoumaroil, <i>N'''</i> -cafeoil espermidina		X	X	X	X

34	4,58	221	598,2552	598,2550	478,1988 [M-H-etenilfenol]-, 462,1021 [M-H-(4-etenilhidroxi-fenol)]-, 304,9342 [M-H-dicoumaroil] ⁻	<i>N',N''</i> -Dicoumaroil, <i>N'''</i> -cafeoil espermidina	X	X	X	X
35	4,54	307	593,1283	593,1301	430,2049 [M-2H-hexose] ⁻ , 285,0424 [M-H-coumaroil-hexose] ⁻	Trihidroxiflavona coumaroil hexosídeo	X			
36	4,66	295	628,2638	628,2664	598,2523 [M-H-OCH ₃] ⁻ , 492,2134 [M-H-(5-etenilhidroxi-fenol)] ⁻	<i>N'</i> -Cafeoil, <i>N''</i> -feruloil, <i>N'''</i> - coumaroil espermidina			X	X
38	4,73	295	582,2585	582,2607	462,2032 [M-H-etenilfenol)] ⁻ , 342,1469 [M-H-2x(etenilfenol)] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -Tricoumaroil espermidina	X	X	X	X
39	4,80	288	582,2584	582,2607	462,2022 [M-H-etenil-fenol)] ⁻ , 342,1462 [M-H-2x(etenilfenol)] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -Tricoumaroil espermidina	X	X	X	X
40	4,90	295	582,2582	582,2607	462,2027 [M-H-etenilfenol)] ⁻ , 342,1466 [M-H-2x(etenilfenol)] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -Tricoumaroil espermidina	X	X	X	X
44	5,05	222	672,2885	672,2924	582,8958 [M-H-3xOCH ₃] ⁻ , 522,2233 [M-H-etenil- O-metil fenol] ⁻ , 480,2065 [M-H-C ₁₀ H ₁₁ NO ₃] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -Triferuloil espermidina	X	X	X	X
45	5,16	317	672,2903	672,2924	582,8958 [M-H-3xOCH ₃] ⁻ , 522,2238 [M-H-etenil- O-metil fenol] ⁻ , 480,2065 [M-H-C ₁₀ H ₁₁ NO ₃] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -Triferuloil espermidina	X	X	X	X
46	5,31	318	672,2902	672,2924	582,8958 [M-H-3xOCH ₃] ⁻ , 522,2242 [M-H-etenil- O-metil fenol] ⁻ , 480,2065 [M-H-C ₁₀ H ₁₁ NO ₃] ⁻	<i>N,N'',N'''</i> -Triferuloil espermidina	X	X	X	X
49	5,39	315	593,1276	593,1301	447,0935 [M-H-coumaroil] ⁻ , 301,0352[M-H-coumaroil-hexose]	Tetrahidroxiflavona coumaroil desoxihexosídeo			X	X
50	5,50	315	593,1284	593,1301	447,0935 [M-H-coumaroil] ⁻ , 301,0352[M-H-coumaroil-hexose]	Tetrahidroxiflavona coumaroil desoxihexosídeo			X	X

51	5,41	295	785,3528	785,3555	665,2964 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 639,3354 [M-H-coumaroil] ⁻ , 545,2308 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N, N', N'', N'''</i> - Tetracoumaroil espermina	X	X	X
52	5,49	295	785,3501	785,3555	665,2964 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 639,3354 [M-H-coumaroil] ⁻ , 545,2308 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N, N', N'', N'''</i> - Tetracoumaroil espermina	X		
53	5,56	295	785,3495	785,3555	665,2964 [M-H-etenil-fenol] ⁻ , 639,3354 [M-H-coumaroil] ⁻ , 545,2308 [M-H-2x(etenil-fenol)] ⁻	<i>N, N', N'', N'''</i> - Tetracoumaroil espermina	X		
54	5,79	222	539,0963	539,0983	495,1066 [M-H-CO ₂] ⁻ , 453,1292 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻ , 351,0500 [M- H-CO ₂ -C ₉ H ₄ O ₃] ⁻	Rusflavona**		X	X
55	5,94	222	537,0811	537,0827	443,0633 [M-H-C ₆ H ₆ O] ⁻ , 417,0607 [M-H-C ₇ H ₅ O ₂] ⁻ , 375,0518 [M-H- C ₁₀ H ₆ O ₅] ⁻ , 309,0503 [M-H-C ₇ H ₅ O ₂ - C ₆ H ₄ O ₂] ⁻	Amentoflavona*		X	X
58	5,84	317	577,1334	577,1352	431,0983 [M-H-coumaroil] ⁻ , 285,0401 [M-H-coumaroil- desoxihexose] ⁻	Canferol coumaroil desoxihexosídeo			X X
59	5,91	317	577,1342	577,1352	431,0983 [M-H-coumaroil] ⁻ , 285,0401 [M-H-coumaroil- desoxihexose] ⁻	Canferol coumaroil desoxihexosídeo			X X
64	6,21	222	539,0969	539,0983	495,1021 [M-H-CO ₂] ⁻ ,	2,3-Dihidro- biapigenina**		X	X

4.3. Identificação dos compostos isolados do pólen apícola de *M. pudica*

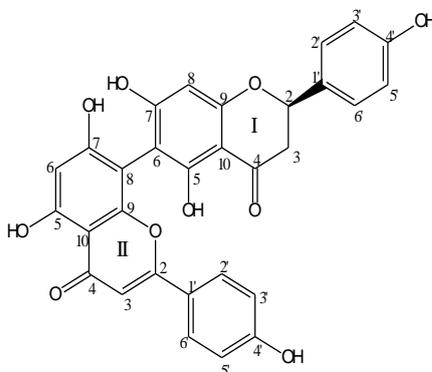
Para a substância codificada como **54** (50 mg), o espectro de RMN de ^1H (Figura 14) mostrou dois simpletos referentes aos hidrogênios dos grupos OH em δ_{H} 12,5 e 13,04 característicos de carbonila quelada OH-C (5I) e OH-C (5II). Os dupletos observados em δ_{H} 6,85, 6,81, 7,39 e 7,59 podem ser atribuídos ao sistema de spins do tipo AA'BB' correspondentes aos anéis B para-substituídos H-3'I/H-5'I, H-3'II/H-5'II, H-2'I/H-6'I de H-2'II/H-6'II, respectivamente, além de três duplos dupletos em δ_{H} 5,53, 3,39 e 2,78 atribuídos aos prótons alifáticos H-2, H-3IIa e H-3IIb, o que comprova a presença de um flavanona na estrutura.

O espectro de APT (Figura 15) exibiu sinais de campo baixo δ_{C} 196,5 e 182,1 atribuídos aos carbonos de carbonila C-4I e C-4II. Os sinais em δ_{C} 115,2, 115,9, 128,4 e 128,0 podem ser atribuídos ao carbono 3'I, 5'I, 3'II, 5'II, 2'I, 6'I, 2'II, 6'II do anel B do sistema AA'BB'. Os sinais em δ_{C} 41,9 e 78,6 referem-se aos carbonos alifáticos da flavanona. A conectividade dos átomos na molécula, particularmente a conexão C6I-C8II, foi confirmada por correlações observadas no espectro HMBC (Figura 16). A análise deste espectro mostrou uma correlação de δ_{H} 6,35 (H-6II) com os carbonos em δ_{C} 160,5 (C-5II), δ_{C} 162,6 (C-7II), δ_{C} 99,2 (C-8II) e 103,7 (C-10II). O espectro de COSY é mostrado na Figura 17. Com base nos dados obtidos e comparação com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C com os da literatura (Tabela 9), foi possível identificar **54** como sendo rusflavona (MBING et al., 2009), previamente isolada da espécie *Ouratea zenkeri*.

A determinação da configuração absoluta da rusflavona foi determinada pelo espectro de dicroísmo circular, revelando os efeitos Cotton das transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Efeitos Cotton com um sinal positivo (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) a 275 nm e um sinal negativo (transição $n \rightarrow \pi^*$) em 319 nm foram observados, o que indicou a configuração absoluta (R) no carbono dois (Figura 18).

Rusflavona (**54**): Pó amarelo amorfo, $[\alpha]_{\text{D}}^{-80^\circ}$ (c 0.1, MeOH), UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$: 293 nm; ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6); ESI-MS (negativo) m/z 539,0957 ($[\text{M}-\text{H}]^-$ Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$; 539,0987). O espectro de formação de íons produtos é mostrado na Figura 19.

Tabela 9 - Dados de RMN de ¹H e ¹³C (500 e 125 MHz, DMSO-*d*₆) de **54** (rusflavona) obtida do pólen apícola de *M. pudica*.



	APT δ _C	APT *δ _C	δ _H	*δ _H	HMBC
2-I	CH 78.6	78.7	5.53 (dd; 13.0, 3.0)	5,58	
			3.39 (dd; 17.0, 13.0)	3,3	
3-I	CH ₂ 41.9	42.2	2.78 (dd; 17.0, 3.0)	2,8	
4-I	C 196.5	196.5			2H-3I
5-I	C 161.7	161.8			OH-5
5-OH			12.5 (s)	12,68	
6-I	C 100.0				
7-I	C 165.0				H-8I
8-I	CH 94.5	94.8	6.15 (s)	6,28	
9-I	C 162.2	162.4			H-8I
10-I	C 101.7	101.9			
1'-I	C 128.9	129.1			3I, H-8I, OH-5
2', 6'-I	CH 128.4	128.2	7.39 (d; 8.5)	7,54	2H-3',5'I
3', 5'-I	CH 115.2	115.5	6.85 (d; 8.5)	6,98	2H, 2', 6'I, OH-4'I
4'-I	C 157.8	157.9			2H-3',5'I, OH-4'I
4'-OH			9.62 (s)	10,78	
2-II	C 163.5	163.8			H-3II
3-II	CH 102.6	102.8	6.77 (s)	6,9	
4-II	C 182.1	182.3			H-3II
5-II	C 160.5	160.7			H-6II
5-OH			13.04 (s)	13,27	
6-II	CH 98.5	98.8	6.35 (s)	6,5	
7-II	C 162.6	162.8			H-6II
8-II	C 99.2	99.5			
9-II	C 154.9	157.9			H-6II
10-II	C 103.7	103.9			
1'-II	C 121.5				OH-5II
2', 6'-II	CH 128.0		7.59 (d; 8.5)	7,73	H-3II, 2H-3',5'II
3', 5'-II	CH 115.9		6.81 (d; 8.5)	7,02	2H-3',5'II
4'-II	C 161.1				2H, 2', 6'II, OH-4'II
4'-OH			10.32 (s)	10,78	2H-3',5'II, OH-4'II

*(MBING et al., 2009) Deslocamentos químicos (δ) em ppm

Figura 15 Espectro de APT de **54** (rusflavona) em DMSO-*d*₆ (125 MHz) (C – para cima e CH – para baixo).

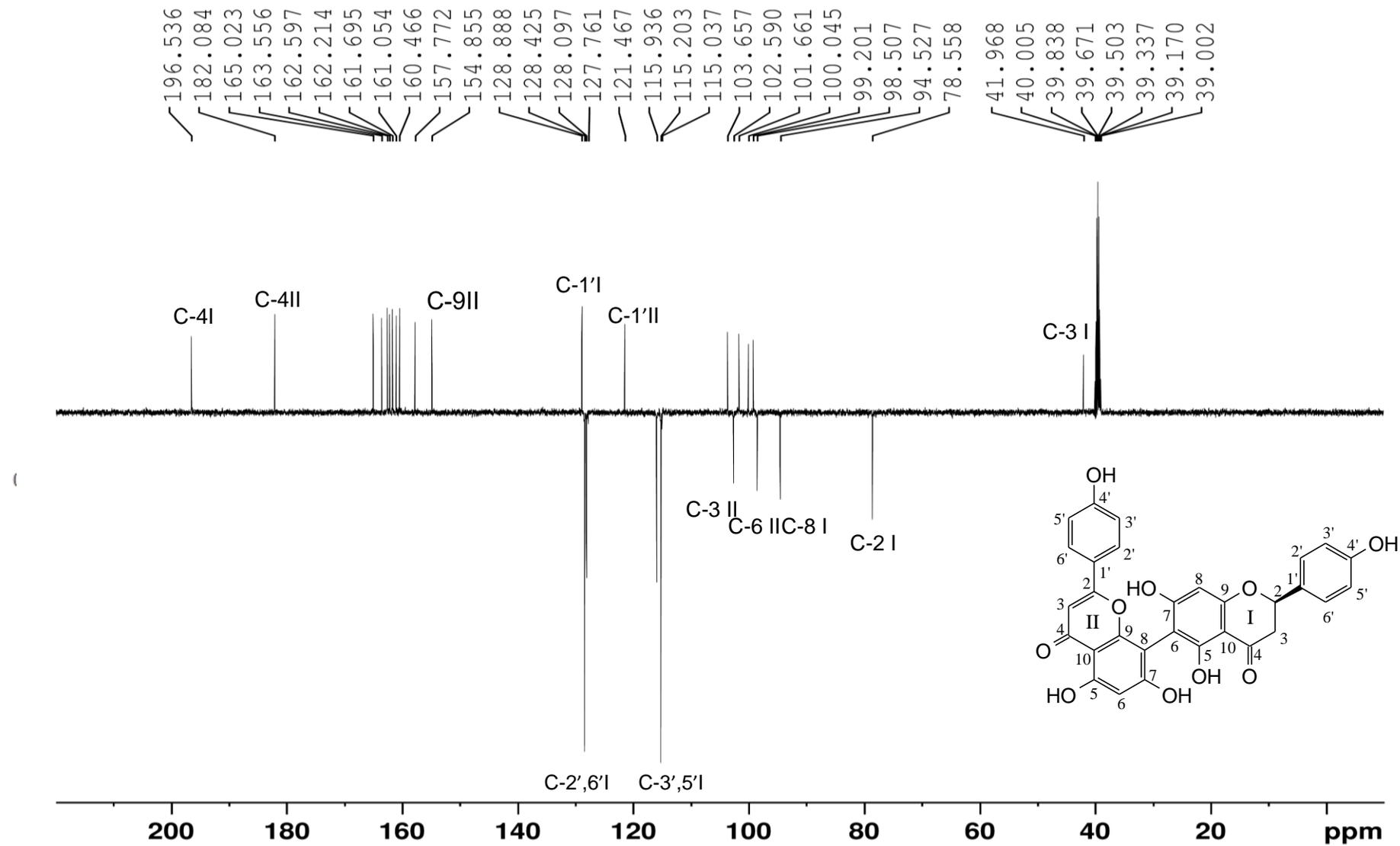


Figura 16 Expansão do espectro de HMBC de **54** (rusflavona) em DMSO-*d*₆ (500 MHz).

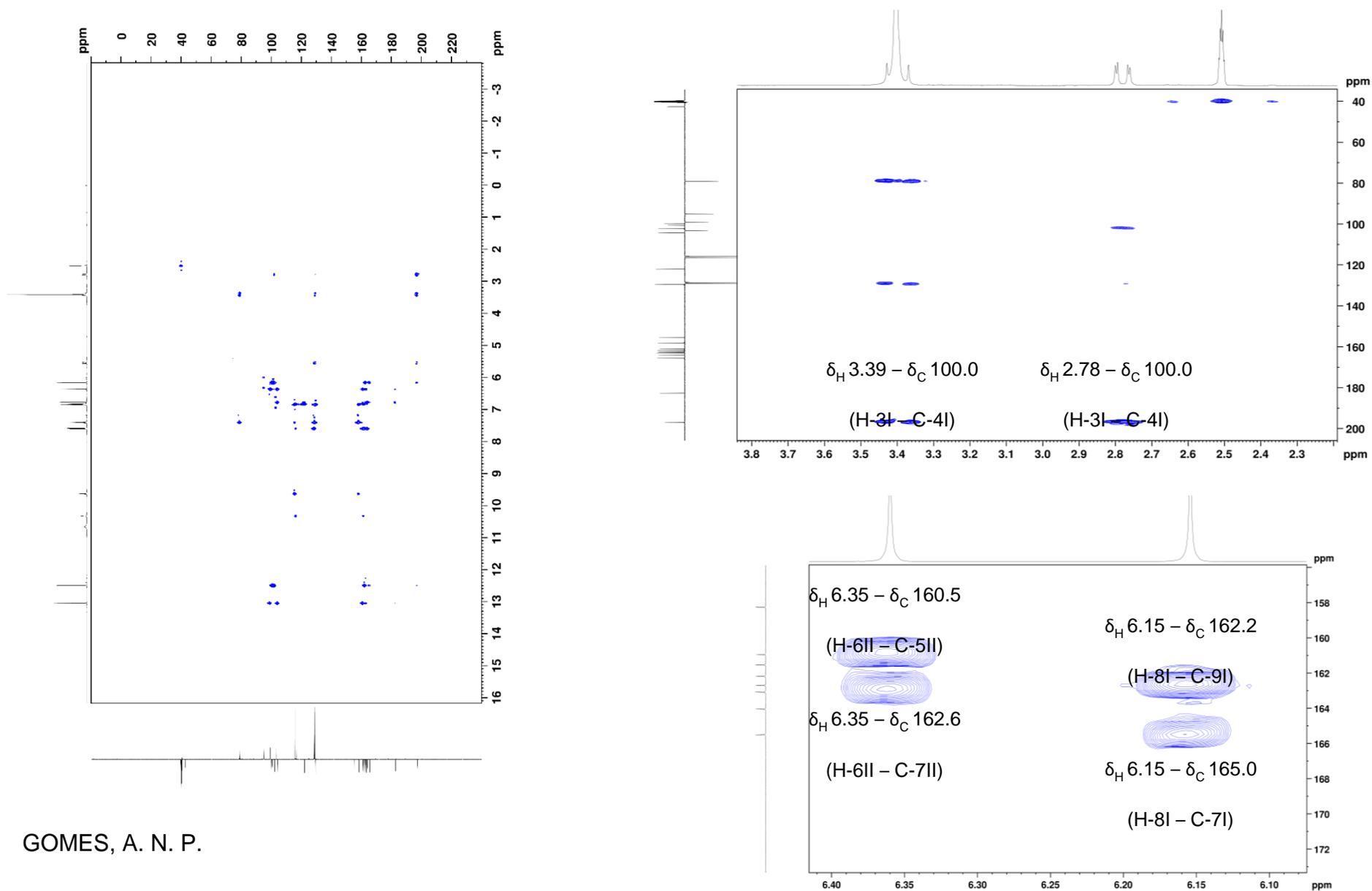


Figura 17 Espectro de COSY (500 MHz, DMSO-*d*₆) para **54** (rusflavona)

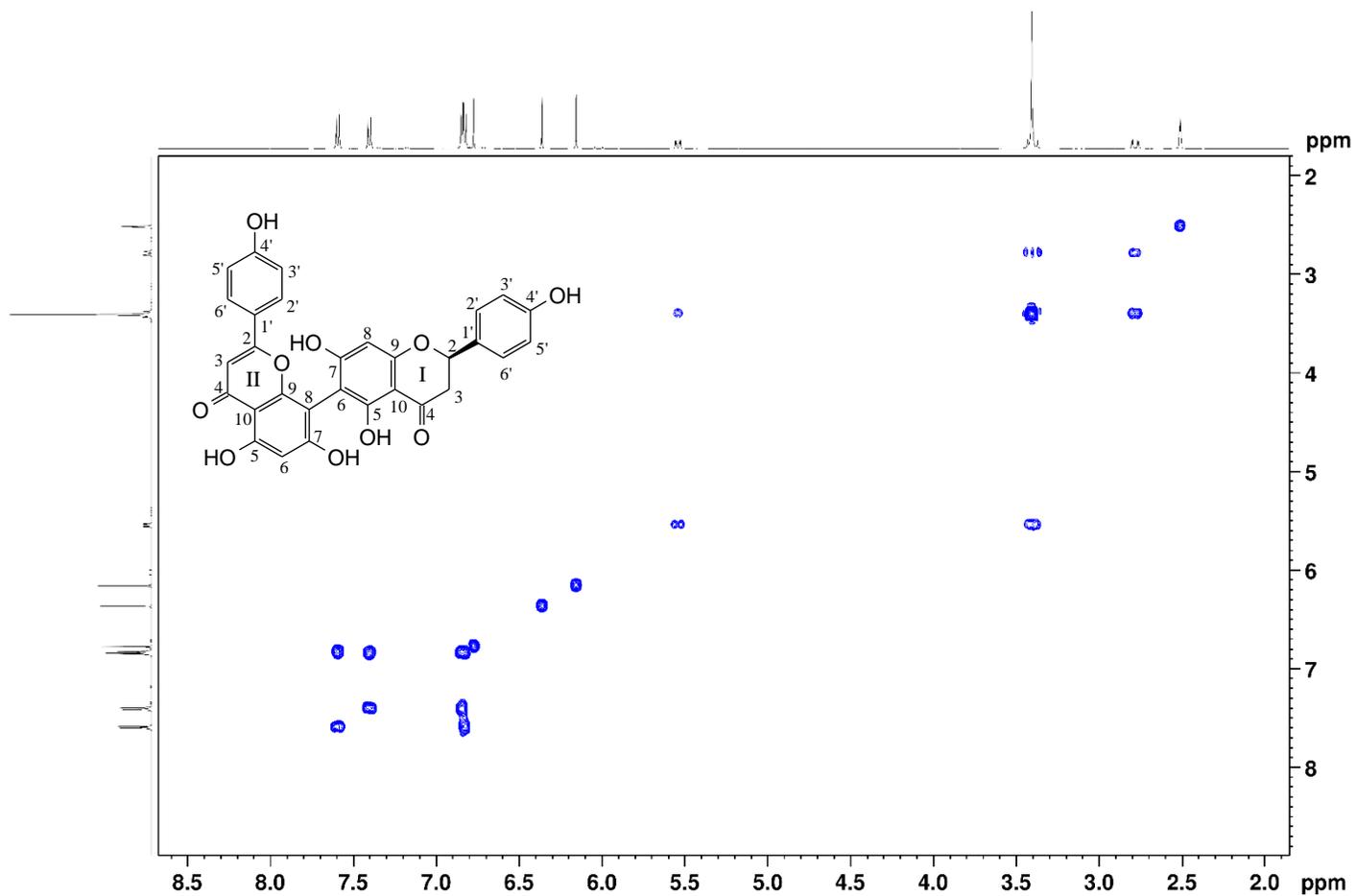


Figura 18 Espectro de dicroísmo circular de **54** (rusflavona)

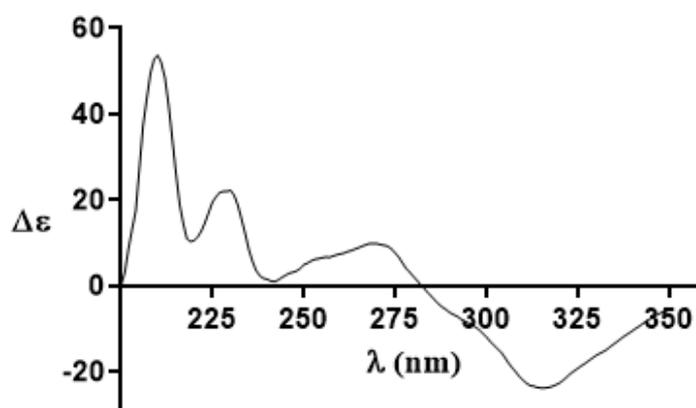
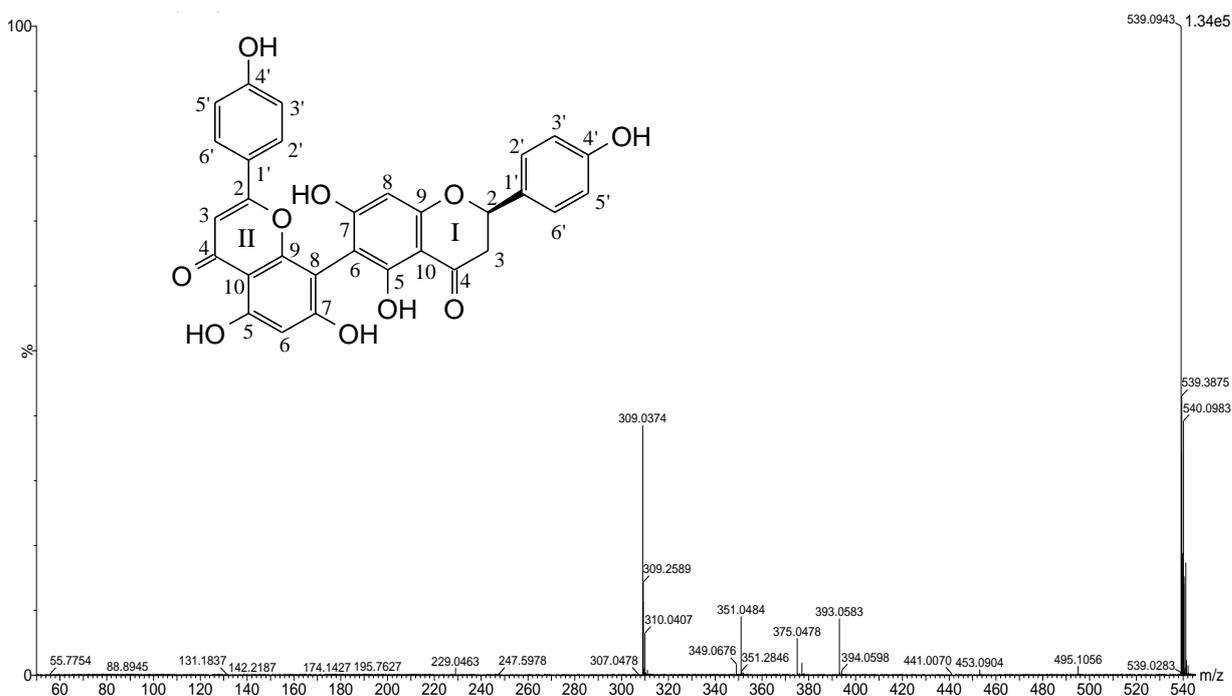


Figura 19 Espectro de íons produto de **54** (rusflavona)

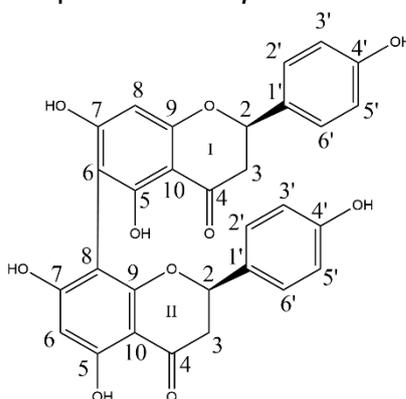


Para a substância codificada como **61** (7 mg), o espectro de RMN de ^1H (Figura 20) mostrou dois simpletos referentes aos hidrogênios dos grupos OH em δ_{H} 12,49 e 13,03 também característicos de carbonila quelada OH-C (5I) e OH-C (5II). Os dupletos observados em δ_{H} 7,16, 7,34, 6,80 e 6,70 podem ser atribuídos ao sistema de spins do tipo AA'BB' correspondentes aos anéis B para-substituídos H-3'I/H-5'I, H-3'II/H-5'II, H-2'I/H-6'I e H-2'II/H-6'II, respectivamente, além de dois duplos dupletos em δ_{H} 5,36 e 5,42 atribuídos aos prótons alifáticos H-2I, H-2II, e quatro duplos dupletos entre δ_{H} 2,63 e 3,26 atribuídos aos 4 prótons ligados aos carbonos C-3 I e II, o que demonstra a presença de duas flavanonas na estrutura.

O espectro APT (Figura 21) exibiu sinais em campo baixo δ_{C} 196,5 e 196,2 atribuídos aos carbonos de carbonila C-4I e C-4II. Os sinais em δ_{C} 115,0, 114,9, 127,6 e 128,3 podem ser atribuídos ao carbono 3'I, 5'I, 3'II, 5'II, 2'I, 6'I, 2'II, 6'II do anel B do sistema AA'BB'. Os sinais em δ_{C} 41,8 e 77,8 referem-se aos carbonos alifáticos da flavanona I (C-2I e C-3I), além de 42,0 e 78,4 referentes aos carbonos alifáticos da flavanona II (C-2II e C-3II). A ligação C6I-C8II, foi confirmada por correlações observadas no espectro HMBC (Figura 22). A análise do espectro HMBC mostrou uma correlação de δ_{H} 6,03 (H-8I) como sinal δ_{C} 100,1 (C-6I) e correlação de δ_{H} 5,98 (H-6II) como sinal δ_{C} 101,0 (C-8I). Como foram observados sinais que comprovam que se trata de duas flavanonas ligadas e ausência de uma ligação nas posições C-3I ou C-3II, essas correlações em HMBC e os dados obtidos por comparação com dados de RMN de ^1H e ^{13}C da literatura (Tabela 10), levou a identificação de **61** como sendo o biflavonoide rusflavanona (MYINT et al., 2019), previamente isolada dos estames da espécie *Mesua ferrea*. A determinação da configuração absoluta da rusflavanona foi determinada pelo espectro de dicroísmo circular, revelando os efeitos Cotton das transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Efeitos Cotton com um sinal positivo (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) a 275 nm e um sinal negativo (transição $n \rightarrow \pi^*$) em 300 nm foram observados, o que indicou a configuração absoluta (R) nos carbonos C-2I e C-2II (Figura 23).

Rusflavanona (**61**): Pó amarelo amorfo, $[\alpha]_{\text{D}} -120^\circ$ (c 0.1, MeOH), UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$: 290 nm; ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6); ESI-MS (negativo) m/z 541,1119 ([M-H] $^-$ Calculado para C₃₀H₂₁O₁₀; 541,1140). O espectro de íons produto e UV são mostrados na Figura 24.

Tabela 10 - Dados de RMN de ¹H e ¹³C (500 e 125 MHz, DMSO-d₆) de **61** (rusflavanona) obtida do pólen apícola de *M. pudica*.



	APT	$\bar{\delta}_C$	APT * $\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$	* $\bar{\delta}_H$	HMBC	
2I	CH	77,8	79,9	5,36 (dd; 12,0, 3,0)	5,3	H-3Ib	H-2',6'I
3Ia	CH ₂	41,8	43,8	3,11 (dd; 17,0, 13,0)	3,01		
3Ib				2,76 (dd; 17,0, 3,0)	2,73		
4I	C	196,5	198,3			H-3Ib, H3Ia	
5I	C	162,1	162,8				
5-OH				12,49 (s)			
6I	C	100,1	102,4				H-8I
7I	C	165,2	166,8			H-8I	
8I	CH	94,3	95,8	6,03 (s)	6,01		
9I	C	162,4	164,1			H-8I	
10I	C	101,8	103,7				H-8I
1'I	C	128,9	131,4				H-3',5'I
2',6'I	CH	127,6	128,6	6,8 (d; 8,5)	7,16	H-3',5'I	
3',5'I	CH	115	116,2	7,16 (d; 8,5)	6,70	H-2',6'I	
4'I	C	157,6	158,3			H-3',5'I	H-2',6'I
2II	CH	78,4	80,5	5,42 (s)	5,31	H-3IIb	H-2',6'II
3IIa	CH ₂	42,0	44,1	3,26 (dd; 17,0, 13,0)	3,26		
3IIb				2,63 (dd; 17,0, 3,0)	2,63		
4II	C	196,2	197,9			H-3IIb, H3IIa	
5II	C	161,4	163,3			H-6II	
5-OH				13,03 (s)			
6II	CH	95,3	96,8	5,98 (s)	6,03		
7II	C	165,1	166,8			H-6II	
8II	C	101	101,2				H-6II
9II	C	160,9	164,8				
10II	C	101,4	103,3				
1'II	C	129,2	131,2				H-3',5'II
2',6'II	CH	128,3	129,1	6,7 (d; 8,5)	6,8	H-3',5'II	
3',5'II	CH	114,9	116,3	7,34 (d; 8,5)	7,34	H-2',6'II	
4'II	C	157,2	158,9			H-3',5'II	H-2',6'II

*MYINT et al., 2019

Deslocamentos químicos (δ) em ppm

GOMES, A. N. P.

Figura 20 Espectro de RMN de ^1H de **61** (rusflavanona) em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) com expansões.

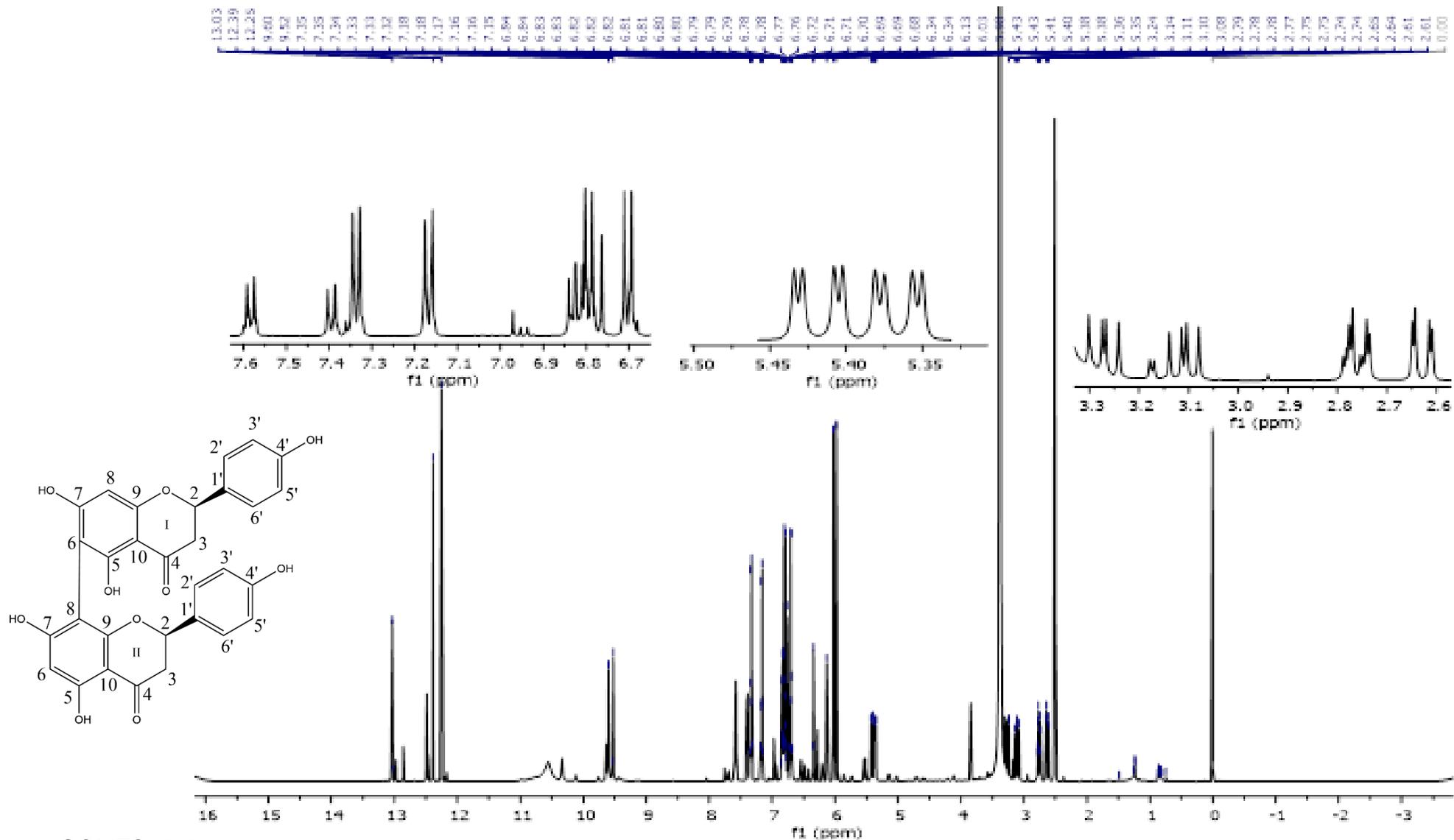


Figura 21 Espectro de APT de **61** (rusflavanona) em DMSO-*d*₆ (1250 MHz) (C – para cima e CH – para baixo)

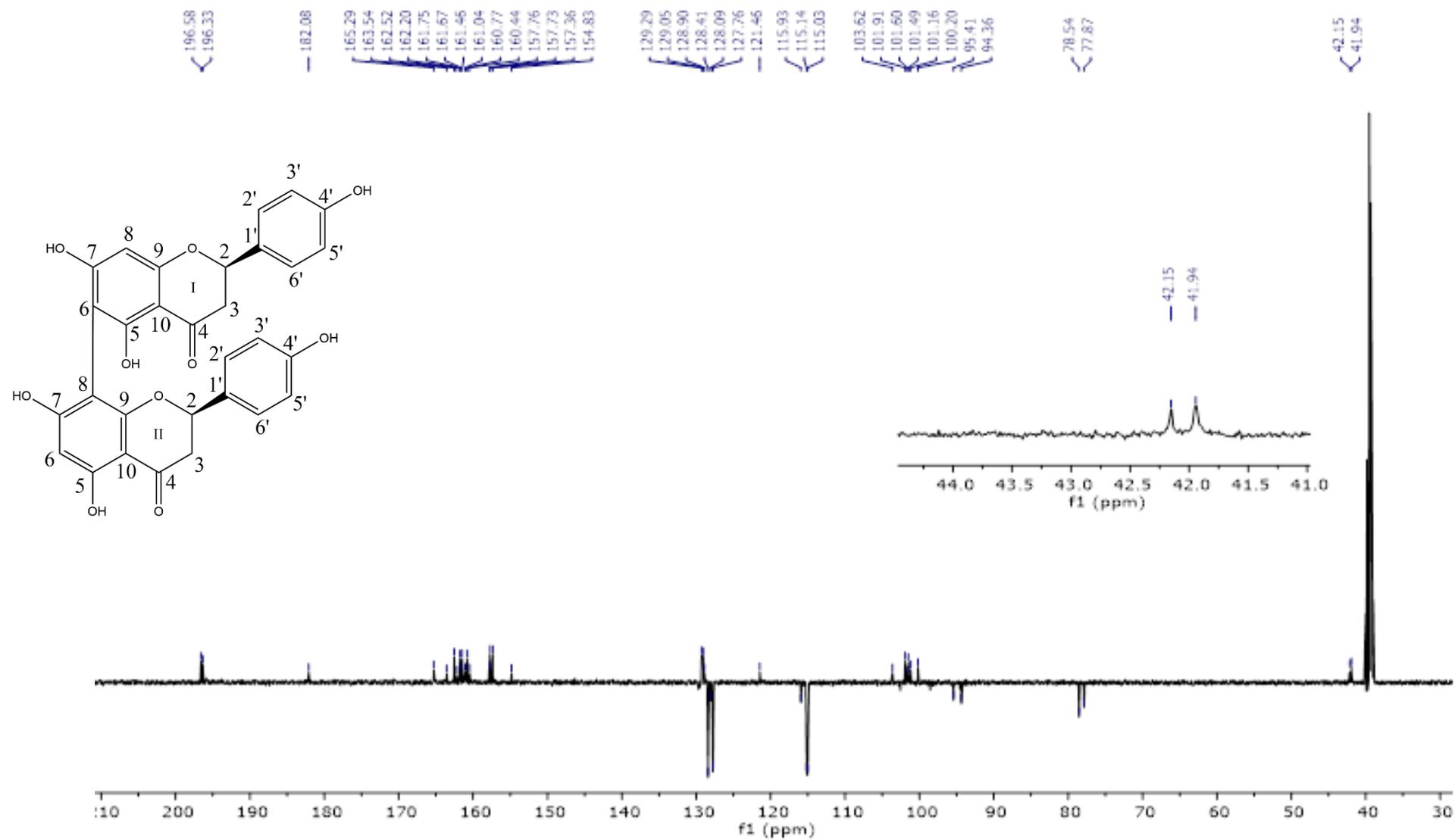


Figura 22 Expansão do espectro de HMBC de **61** (rusflavanona) em DMSO-*d*₆ (500 MHz) (A) Expansão entre δ_H 5,70 a 6,25 ppm e δ_C 96 a 109 ppm (B) Expansão entre δ_H 5,75 a 6,25 ppm e δ_C 154 a 171 ppm.

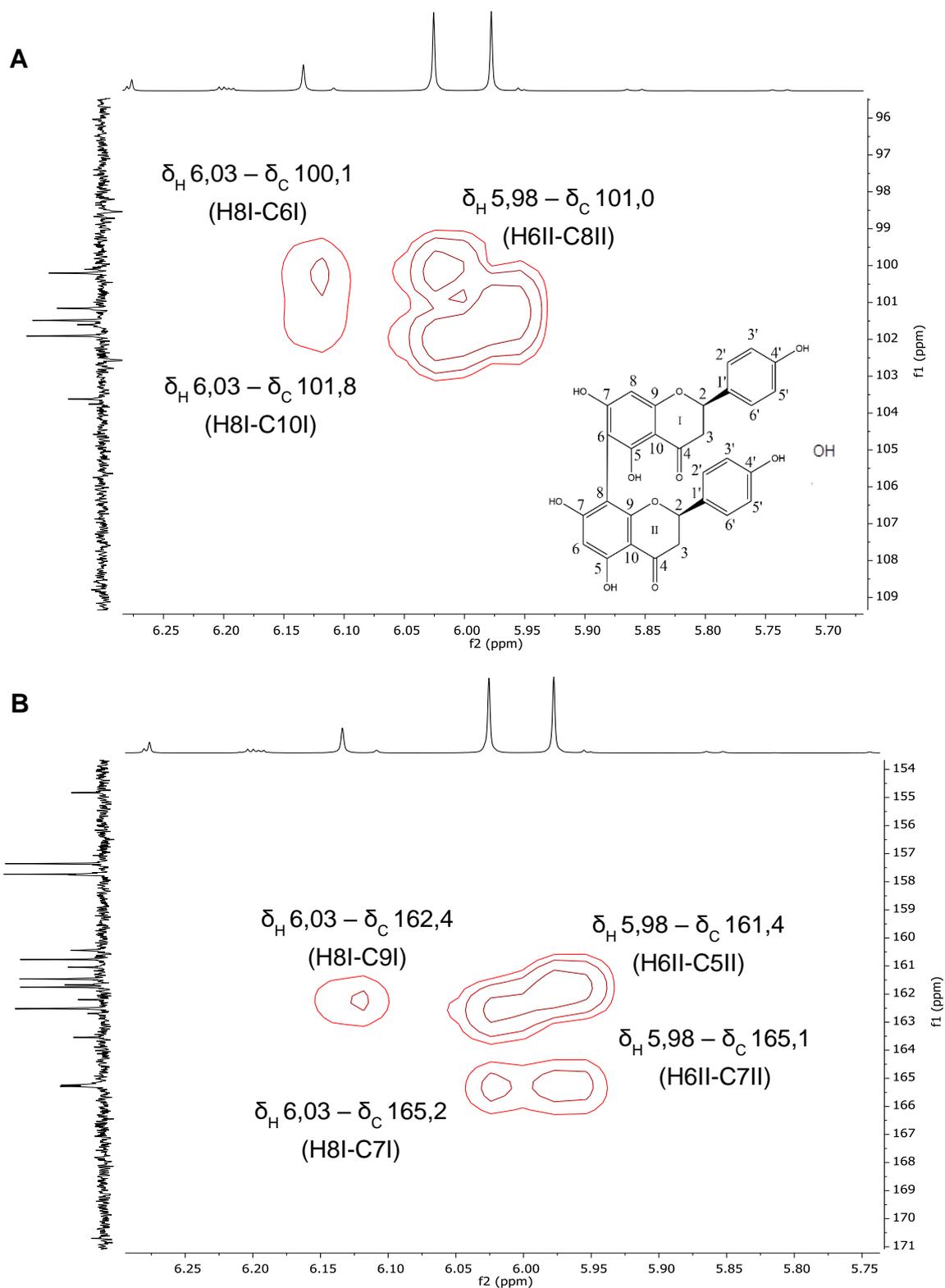


Figura 23 Espectro de dicroísmo circular de **61** (rusflavanona)

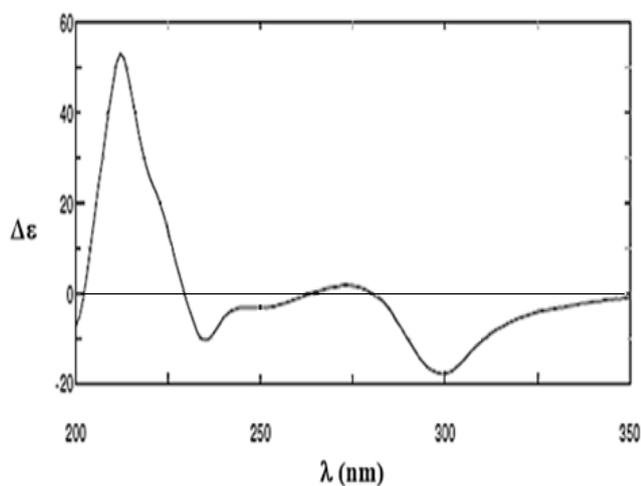
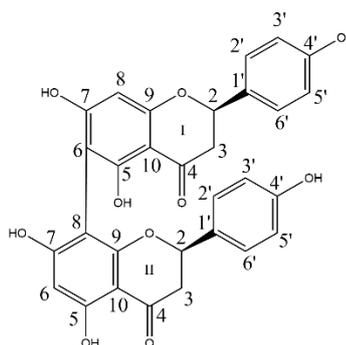
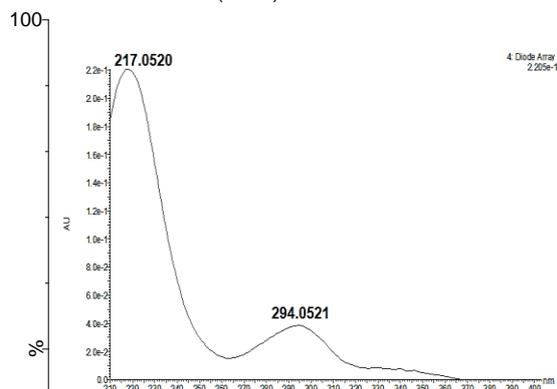
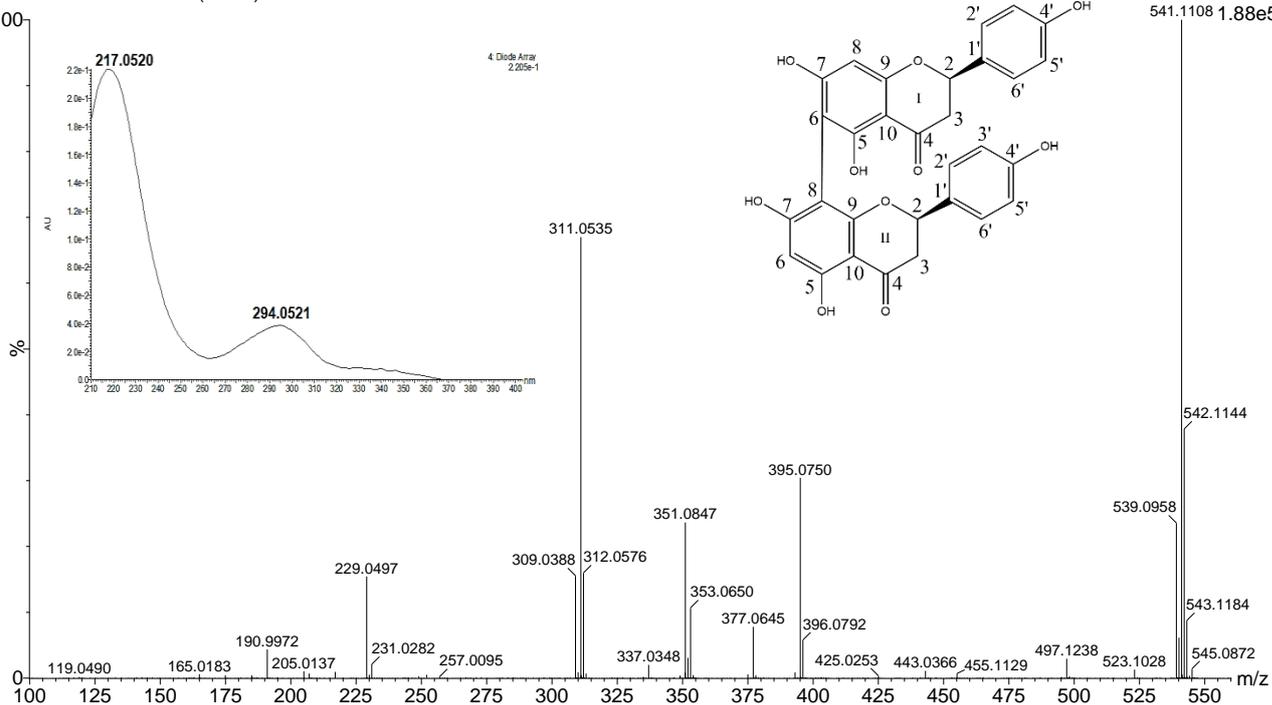


Figura 24 Espectro de íons produto e UV de **61** (rusflavanona)

Fr 27-34 mimosa 1581 (6.404)



2: TOF MS ES-
541.1108 1.88e5



4.4. Determinação do teor de minerais

O teor de minerais do pólen é frequentemente expresso em macro e microelementos (KOSTIC et al., 2017), e sua composição é dependente de condições intrínsecas (origem botânica) e extrínsecas (solo, origem geográfica, entre outros) (YANG et al., 2013). Esses bioelementos estão presentes em cerca de 2 % do pólen, estando entre os principais macronutrientes K, Ca, Mg e Na e micronutrientes Fe, Cu, Zn, Mn e Se (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015).

Devido ao seu alto teor de nutrientes, o pólen apícola é considerado um alimento natural e tem sido valorizado entre os produtos da apicultura. Estados do Nordeste brasileiro são promissores para a produção desse produto; amostras dessa região apresentaram valores significativamente maiores de minerais e produção constante ao longo do ano (MORGANO et al., 2012).

A Tabela 11 mostra os níveis de macro e microelementos em amostras de pólen de piaçava, dendê e sensitiva. O mineral predominante encontrado no pólen apícola de forma geral foi potássio (K), seguido de cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), manganês (Mn), zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu) e selênio (Se). Essas diferenças nos níveis de minerais estão relacionadas a fatores como; variedades de flores a partir das quais o pólen de abelha foi coletado, condições climáticas, geografia, condições ambientais, composição genética das espécies vegetais, procedimentos agrícolas (fertilização e pulverização agrícola) e processos apícolas (ALTUNATMAZ et al., 2017).

De acordo com Campos et al. (2008), o Mg destaca-se como um dos quatro bioelementos de maior teor em pólen apícola (200 – 3000 mg/Kg), estudos conduzidos com polens de diversas localidades geográficas como, Polônia (774 mg/Kg), Turquia (787 mg/Kg), Sérvia (940 mg/Kg), Romênia (958 mg/Kg), Colômbia (1029 mg/Kg), China (1449 mg/Kg), reportaram valores nessa faixa (GREMBEKA; SZEFER, 2013; KALAYCIOGLU et al., 2017; KOSTIC et al., 2017; STANCIU et al., 2012; FUENMAYOR et al., 2014; YANG et al., 2013).

De acordo com a regulamentação brasileira (Brasil 2012) para minerais, a contribuição de mais de 30% da IDR (Ingestão diária recomendada) de referência por 100 g de produto, classifica o alimento como “alto teor” e acima de 15% como “fonte”. Para as amostras o teor de magnésio e zinco foi tão significativo que uma porção de

100g supre 100% da necessidade diária de um indivíduo adulto. O Mg atua principalmente como um cofator de uma série de enzimas envolvidas na fixação e metabolismo fotossintético do carbono (GUO et al., 2016). A alta relação K/Na torna o pólen apícola potencialmente valioso para dietas com um equilíbrio eletrolítico definido (SILVA et al., 2014). O Fe é fundamental na oxigenação celular e Zn assim como Mn atuam como cofator em processos enzimáticos, enquanto que Se e Cu são considerados nutrientes antioxidantes porque são componentes estruturais das enzimas antioxidantes (SILVA et al., 2014).

Estudos feitos em outros países demonstram que condições climáticas e outros fatores, levam a uma variação no teor de minerais no pólen. Stanciu et al. (2012) estudando o teor de minerais em diferentes tipos de polens apícolas monoflorais na Romênia observou que os níveis de minerais nas amostras variaram consideravelmente devido às diferenças na origem floral do pólen. Isso foi verdade para K, Mg, Ca, Mn e Fe, enquanto o teor de Zn do pólen pareceu ser mais constante. Silva et al. (2014) estudando o pólen de abelha monofloral coletado na Paraíba, Brasil, observaram resultados semelhantes para alguns elementos, com K como o elemento de maior teor, seguido por Ca e Mg. As amostras estudadas apresentaram uma concentração de Ca menor que a relatada, porém a quantidade de Mg foi muito maior, essa relação Ca:Mg pode estar relacionada a propriedades químicas muito semelhantes, como grau de valência e mobilidade, causando concorrência para locais de adsorção do solo e captação de raízes (SALVADOR et al., 2011).

A nutrição das espécies vegetais impacta não só no crescimento das mesmas, mas também na maioria dos outros organismos vivos, uma vez que são a base de muitas cadeias alimentares. Animais e humanos necessitam de todos os minerais discutidos e sua abundância e distribuição nas plantas afetam os componentes da dieta.

Tabela 11 - Teor de minerais nas amostras do pólen apícola de piaçava, dendê e sensitiva (mg/100g \pm DP) e a dose diária recomendada para adultos (IDR).

Amostras/ Minerais	Resultados (mg/100g de pólen)								
	K	Mg	Mn	Na	Ca	Zn	Fe	Cu	Se**
Piaçava	566,6 \pm 63,20	817,6 \pm 21,85	8,58 \pm 0,22	18,66 \pm 0,75	10,38 \pm 1,13	3,30 \pm 0,04	2,14 \pm 0,22	-	3,30 \pm 0,04
Dendê									
Julho/13	412,3 \pm 27,0*	111,7 \pm 25,6*	15,53 \pm 0,9	5,1 \pm 0,1	10,7 \pm 1,2	4,1 \pm 0,1	2,0 \pm 0,4	0,46 \pm 0,08	44,4 \pm 7,6
Janeiro/14	447,8 \pm 11,9*	1261,2 \pm 3,9*	13,6 \pm 0,5	8,3 \pm 0,6	8,8 \pm 2,8*	4,1 \pm 0,02	1,8 \pm 0,1	0,38 \pm 0,05	4,4 \pm 0,4
Fevereiro/14	371,0 \pm 28,5*	1253,6 \pm 21,1*	13,7 \pm 0,4	9,3 \pm 0,1	9,1 \pm 0,2*	4,0 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	0,40 \pm 0,03	8,2 \pm 2,2
Abril/14	458,4 \pm 4,1*	1229,4 \pm 2,6	9,9 \pm 0,3	10,9 \pm 0,5	7,6 \pm 1,0	4,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	0,27 \pm 0,1	28,7 \pm 0,9
Mai/14	448,5 \pm 5,5*	1277,3 \pm 33,3	10,2 \pm 0,4	9,6 \pm 0,3	13,6 \pm 1,3*	4,5 \pm 0,2	2,7 \pm 0,5	0,39 \pm 0,05	20,2 \pm 0,6
Sensitiva									
Mai/14	460,3 \pm 19,1	1048,2 \pm 21,1	12,05 \pm 0,8	11,13 \pm 0,2	5,98 \pm 0,7	3,34 \pm 0,1	2,43 \pm 0,05	-	#
Junho/14	443,8 \pm 19,3	989,8 \pm 22,6	15,06 \pm 0,8	8,10 \pm 0,08	3,08 \pm 0,8	3,60 \pm 0,1	3,95 \pm 0,2	-	#
Agosto/14	457,50 \pm 32,1	572,47 \pm 22,3	8,9 \pm 0,6	12,12 \pm 0,2	8,06 \pm 0,8	3,94 \pm 0,08	3,50 \pm 0,2	-	#
Setembro/14	425,03 \pm 7,9	738,2 \pm 0,3	11,59 \pm 0,2	8,50 \pm 0,3	5,14 \pm 0,6	4,43 \pm 0,34	4,49 \pm 0,4	-	#
IDR para adultos (mg)	1000,0	0,9	14,0	-	260,0	2,3	-	7,0	34,0**

*N=2

**Concentração em micrograma (μ g)

Análise não realizada

4.5. Determinação do teor fenólicos totais e atividade antirradicalar

O teor de fenólicos totais foi analisado no Ext EtOH, Fr Hex e Fr AcOEt e expresso em mg equivalente a ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g). A Tabela 12 mostra uma variação de 20,0 – 38,3 mg EAG/g para os extratos, para extratos brutos, o teor de fenólicos totais pode variar de 7,1 - 43,4 mg de mg EAG/g de amostra (DE-MELO et al., 2016; KALAYCIOGLU et al., 2017; KARKAR et al., 2018). Nas Fr AcOEt são encontrados teores maiores, na faixa de 10,2 – 173,7 mg EAG/g, Freire et al. (2012) estudaram 25 amostras de pólen apícola coletado na Bahia durante um período de nove meses (fevereiro a novembro), e observaram uma variação de 41,5 a 213,2 mg EAG/g de amostra no teor de fenólicos totais usando o reagente de Folin-Ciocalteu nas fr AcOEt. Em geral, fr AcOEt é mais eficaz para recuperar compostos fenólicos de acordo com a literatura (NAKAMURA et al., 2017; ALIDADI et al., 2017; JUSTINO et al., 2018).

Alguns estudos mostraram uma forte correlação positiva entre o teor total de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do pólen de abelha, e comprovaram que a fr AcOEt exibe a maior atividade (KOCOT et al., 2018). O potencial antioxidante *in vitro* deve ser determinado por meio de mais de um método antirradicalar, devido à diversidade química, à complexidade da matriz e à quantidade de reação envolvendo os radicais livres nos processos oxidativos. Portanto, é necessário usar modelos diferentes e combinar os resultados obtidos. Neste trabalho, foi analisado o potencial antioxidante do extrato e frações do pólen de abelha por testes de eliminação de DPPH[•] e ABTS^{•+} (ROCCHETTI et al., 2019). O ensaio DPPH[•] é mais aplicável a sistemas hidrofílicos, já o teste de sequestro do radical ABTS^{•+} é aplicável tanto aos sistemas antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos (FLOEGEL et al., 2011), portanto, é provável que mais compostos estejam envolvidos no sequestro de radicais, proporcionando melhor atividade. A atividade sequestradora dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} foi expressa em termos de CE₅₀ (Concentração de antioxidante necessária para reduzir a quantidade original dos radicais em 50%), valores mais baixos indicam melhor potencial antioxidante do extrato e da fração do pólen de abelha (CARPES et al., 2009). Dentre as amostras analisadas, a fr AcOEt de piaçava apresentou melhor sequestro tanto do radical DPPH[•] (14,65 µg/mL) quanto ABTS^{•+} (14,20 µg/mL), seguido pela amostra de sensitiva agosto onde se observa CE₅₀ 71,48 µg/mL para DPPH[•] e 42,35 µg/mL para ABTS^{•+} Freire et al. (2012) encontraram uma diferença de

até 50% entre os dois testes nas amostras estudadas, com uma prevalência de CE_{50} menor para o método ABTS^{•+}. De acordo com estudos (NAKAMURA et al., 2017; ALIDADI et al., 2017; JUSTINO et al., 2018), a atividade antioxidante é resultado dos compostos fenólicos que possuem atividade sequestradora de radicais livres, embora outros constituintes também possam contribuir a essa propriedade (CARPES et al., 2009). Os compostos identificados pela análise HPLC-ESI-MS/MS são amplamente relatados como antioxidantes, como flavonoides glicosilados e acil espermidinas, essas moléculas são conhecidas por suas propriedades antioxidantes e estão associadas às capacidades dos agentes doadores de elétrons e formam um derivado antioxidante estável radical (JUSTINO et al., 2018; NEGRI et al., 2018). O alto teor de compostos fenólicos na fr AcOEt pode explicar sua maior capacidade antioxidante em comparação com o extrato. Estudos anteriores relataram a capacidade antioxidante do pólen de abelha, mostrando CE_{50} de 67,50 $\mu\text{g/mL}$ para a fr AcOEt e 144,86 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico pelo método DPPH[•] (DAOUD et al., 2015), o que corrobora nossos achados.

Por fazer parte de um projeto maior, as análises de fenólicos e sequestro de radicais para as amostras de dendê foram realizadas por outro integrante, sendo os achados semelhantes aos encontrados aqui para as amostras de piaçava e sensitiva. A fração AcOEt da amostra obtida em maio teve maior teor de compostos fenólicos quando comparado as outras amostras da mesma espécie (56,5 mg EAG/g), bem como menores concentrações da mesma fração são necessárias para reduzir tanto o radical DPPH (47,7 $\mu\text{g/mL}$) quanto ABTS (140,6 $\mu\text{g/mL}$). Para todas as amostras a fração AcOEt apresentou melhores resultados quando comparada ao extrato EtOH (ALVES, 2017).

Tabela 12 - Fenólicos totais e atividade antirradicalar do extrato e frações do pólen apícola de *A. funifera* e *M. pudica*.

Amostra	Fenólicos totais (mgEAG ^a /g)			DPPH [•] CE ₅₀ ±DP (µg/mL)			ABTS ^{•+} CE ₅₀ ±DP (µg/mL)		
	Ext EtOH	Fr Hex	Fr AcOEt	Ext EtOH	Fr Hex	Fr AcOEt	Ext EtOH	Fr Hex	Fr AcOEt
Piçava	21,9±2,20	17,22±1,94	173,72±3,52	≥ 500	≥500	14,64±0,27	234,74±8,99	≥500	14,20±0,30
Sensitiva									
Maio/14	25,5±1,08	5,1±0,76	41,0±2,76	>500	>500	428,56±12,57	>500	>500	409,35±5,99
Junho/14	31,1±0,85	6,1±0,76	31,6±1,77	379,21±12,20	>500	490,16±1,48	451,08±0,30	>500	439,60±4,40
Agosto/14	38,3±2,99	11,6±1,37	142,5±1,24	285,56±17,02	>500	71,482±8,43	388,93±3,39	>500	42,35±7,83
Setembro/14	20,0±1,02	11,9±1,40	10,2±0,81	424,64±6,85	>500	>500	344,73±6,67	>500	>500
Controle positivo	-	-	-	Ác ascórbico - 5,10±0,55			Trolox - 3,01±0,12		

^aEquivalente ácido gálico.

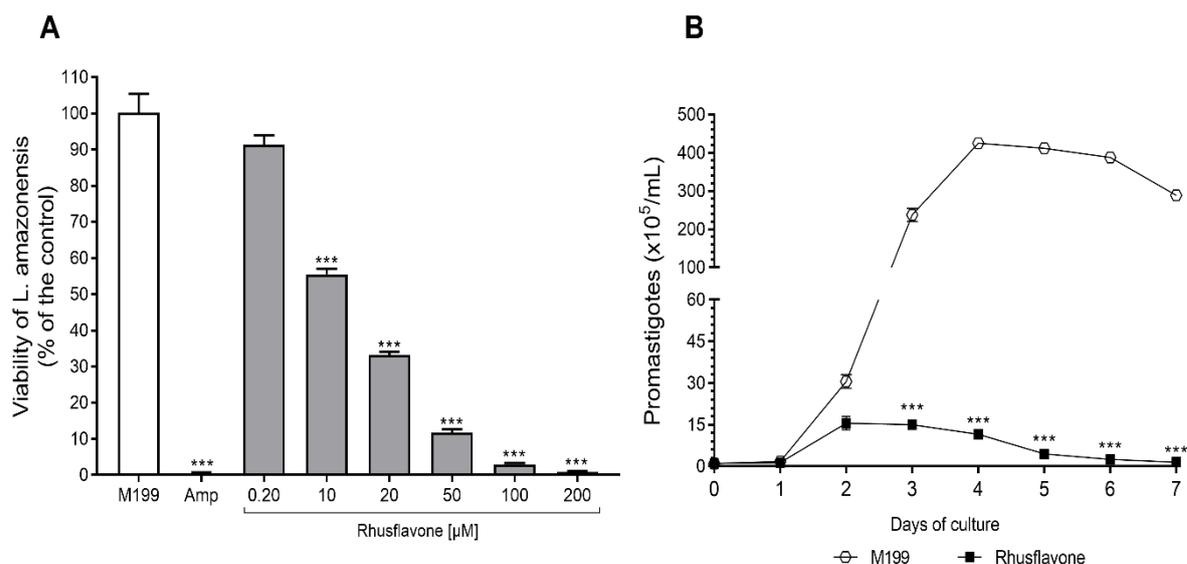
CE₅₀: Concentração de antioxidante necessária para reduzir 50% do radical.

DP: Desvio padrão

4.6. Atividade leishmanicida do biflavonoide rusflavona

Para testar a toxicidade da rusflavona em parasitas *Leishmania*, primeiro foi avaliada a viabilidade do promastigota de *L. amazonensis* após incubação in vitro na presença do composto em concentrações variando de 0 a 200 μM . Os resultados mostraram que a rusflavona matou efetivamente os parasitas de maneira dependente da concentração (Figura 25A). Causou declínio significativo da viabilidade mesmo em concentrações de 10 e 20 μM , resultando em mortalidade de 45,5 e 66,84%, respectivamente. A anfotericina B a 5 μM reduziu a viabilidade da promastigota em 100%. O valor de IC_{50} da rusflavona para 48 h de tratamento foi calculado em 5 μM . Além disso, o tratamento de promastigotas com rusflavona a 5 μM levou a uma inibição significativa do crescimento do parasita (Figura 25B).

Figura 25 Efeitos da rusflavona em formas promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Promastigotas na fase estacionária (3×10^6) foram incubados com meio M199 ou M199 mais rusflavona em concentrações de 0,20 a 200 μM , e a viabilidade foi determinada por MTT após 48 h de incubação. (B) Cinética de crescimento de promastigotas tratado com rusflavona ou M199. Promastigotas de *L. amazonensis* ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubados com meio M199 (controle) ou M199 mais rusflavona a 5 μM a 26 °C e o crescimento determinado diariamente usando uma câmara de Neubauer.



Os dados são expressos como médias \pm SEM ($n = 3$) e são representativos de três experimentos independentes. $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle (Meio M199 = 100% de viabilidade). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo de controle

GOMES, A. N. P.

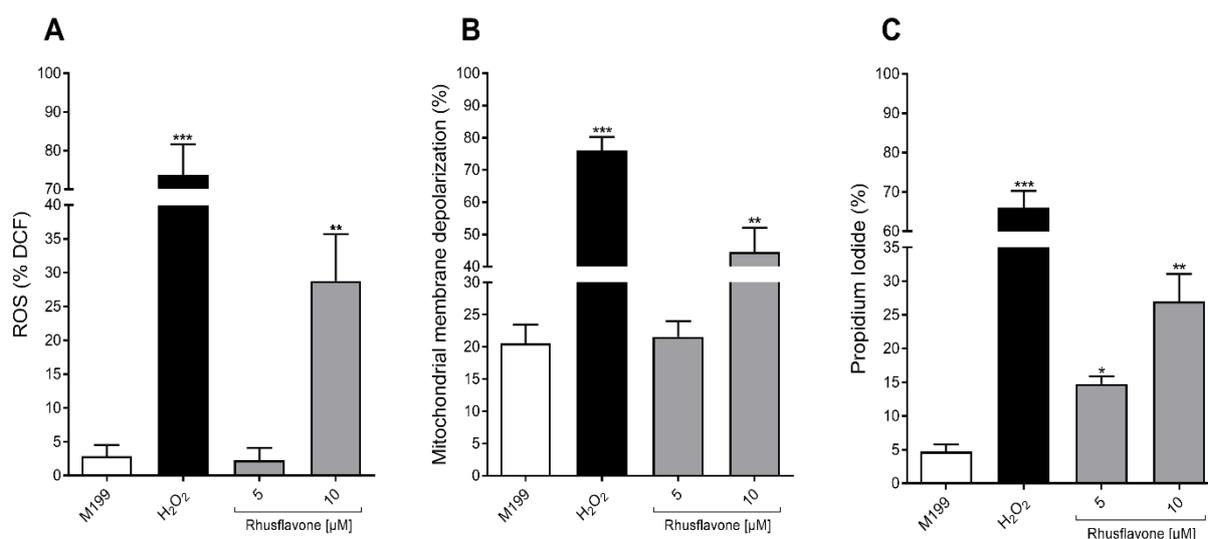
Este é o primeiro estudo relatando a atividade leishmanicida da rusflavona contra *L. amazonensis*, um dos principais agentes da leishmaniose tegumentar. Esses dados são consistentes com a literatura (RIZK et al., 2014), que relatou a atividade leishmanicida de outros bioflavonoides, como amentoflavona e robustaflavona, contra *L. amazonensis*.

Para entender melhor os efeitos do composto sobre *L. amazonensis*, foram medidas espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas tratados com rusflavona. O tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com rusflavona na concentração de 10 μM ($2 \times \text{IC}_{50}$) levou a um aumento significativo na produção de ROS 6 h após a incubação (Figura 26A). Como esperado, a incubação de parasitas com H_2O_2 a 2 mM causou elevação significativa em ROS. ROS constituem um dos mais efetores oxidativos contra parasitas *Leishmania* (CEZAROTTO et al., 2019). Na verdade, em *Leishmania* spp. A disfunção da cadeia de transporte de elétrons pode resultar na liberação excessiva de ROS da mitocôndria e na perda do potencial da membrana mitocondrial, um possível mecanismo de ação para essas moléculas (DAGNINO et al., 2018; MARTINS et al., 2018).

Também foi investigado o efeito da rusflavona no potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$). O tratamento dos parasitas com rusflavona a 5 μM não causou diferença significativa no potencial mitocondrial, enquanto a concentração de 10 μM apresentou despolarização significativa de $\Delta\Psi\text{m}$ após 6 h de incubação em relação ao grupo controle (Figura 26B). Como esperado, a incubação de parasitas com H_2O_2 a 2 mM causou despolarização potente de $\Delta\Psi\text{m}$. Na verdade, a disfunção da mitocôndria de *Leishmania* prejudica a produção e a sobrevivência de ATP (KATHURIA et al., 2014; GARCIA et al., 2017), e medicamentos anti-leishmania, como anfotericina B e pentamidina, atuam causando diminuição e colapso de $\Delta\Psi\text{m}$, respectivamente (LEE et al., 2002).

Considerando que o tratamento de promastigotas com rusflavona causou alterações significativas na morfologia do parasita (dados não mostrados), avaliou-se a integridade da membrana plasmática de promastigotas tratados por 24 horas com rusflavona pela coloração com PI. Observou-se que, à semelhança da ação do H_2O_2 , os promastigotas tratados com rusflavona a 5 ou 10 μM apresentaram aumento significativo da fluorescência do PI (Figura 26C), indicando perda da integridade da membrana, o que sugere morte celular por necrose (STROPPIA et al., 2017).

Figura 26 Mecanismos de ação da rusflavona sobre promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *L. amazonensis* tratada com rusflavona. (B) Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de *L. amazonensis* exposto a rusflavona. (C) Determinação da integridade da membrana de *L. amazonenses*.



Os dados são expressos como médias \pm SEM ($n = 3$) e são representativos de três experiências independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo de controle

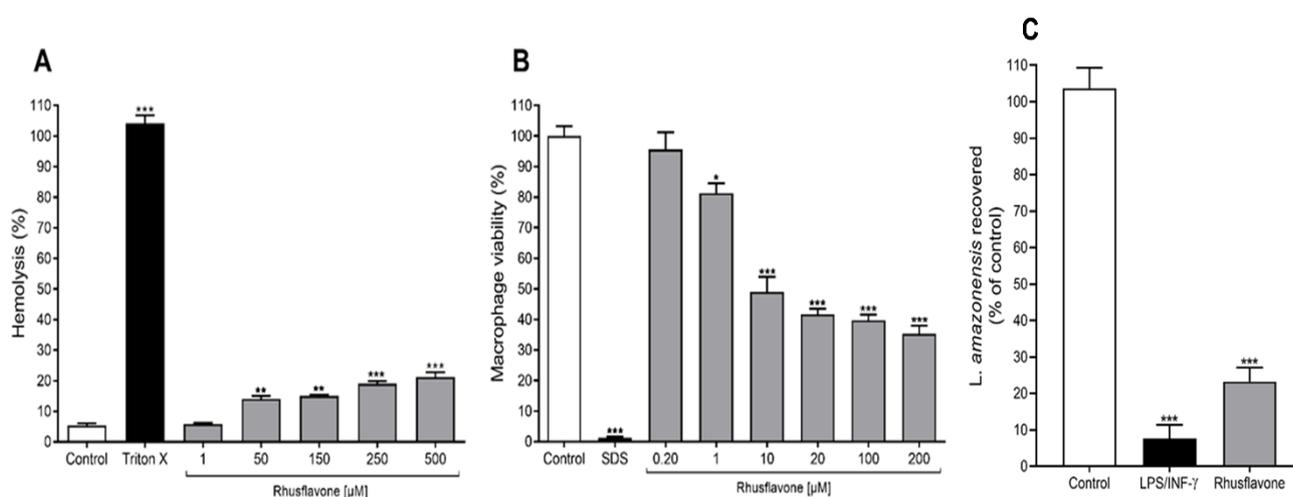
No ensaio de eritrócitos humanos, os resultados mostraram que a rusflavona não foi tóxica na concentração de 1 μM , causou 14% de hemólise a 50 μM e mesmo na concentração mais alta (500 μM) causou apenas 20% de hemólise (Figura 27A). Em contraste, dados da literatura mostraram que a anfotericina B exerce forte efeito hemolítico com 70 a 84% de hemólise em 14,9 a 16,91 μM , respectivamente (VALDEZ et al., 2009; DE MELLO et al., 2014). O ensaio hemolítico é usado para avaliar possíveis mecanismos citotóxicos envolvendo danos à membrana (FRESHNEY, 2005).

Em relação aos efeitos citotóxicos em macrófagos, a 1 e 10 μM a mortalidade foi de 18 e 51%, respectivamente. A 200 μM , a rusflavona causou mortalidade de 65% (Figura 27B). O CC_{50} foi estimado em 20 μM . Considerando a relação macrófagos CC_{50} /amastigotas IC_{50} de *Leishmania*, a rusflavona apresentou baixa citotoxicidade, GOMES, A. N. P.

demonstrando seletividade para o parasita. O índice de seletividade para eritrócitos (eritrócitos CC_{50} /promastigotas IC_{50}) foi estimado em > 100 e para macrófagos (macrófagos CC_{50} /amastigotas IC_{50}) > 10 . Na literatura, os compostos foram considerados eficazes quando SI é maior que 5 ou ≥ 10 (GROGL et al., 2013; NAVAZUAZO et al., 2010). Esses dados estão de acordo com estudos (RIZK et al., 2014) que descobriram que o biflavonoide amentoflavona também apresentou baixa citotoxicidade *in vitro* contra macrófagos e SI favorável.

O efeito da rusflavona em amastigotas intramacrófagos também foi avaliado. Para isso, verificou-se que a rusflavona a 2 μ M, concentração 10 vezes menor que aquela capaz de causar 50% de mortalidade dos macrófagos ($CC_{50}=20 \mu$ M), estimulou a atividade leishmanicida dos macrófagos, reduzindo a sobrevivência dos amastigotas para 76,7% (Figura 27C), indicando um índice de seletividade favorável (SI > 10 para amastigotas). Como esperado, a estimulação de macrófagos com LPS mais IFN- γ induziu morte parasitária significativa, como demonstrado antes (ROMÃO et al., 1999).

Figura 27 Citotoxicidade da rusflavona em hemácias e macrófagos *in vitro*. (A) Atividade hemolítica: As taxas hemolíticas foram estimadas medindo a absorbância dos sobrenadantes de glóbulos vermelhos a 540 nm. (B) Viabilidade do macrófago: ensaios de MTT. (C) Atividade anti-amastigota.



Os dados são expressos como médias \pm SEM ($n = 3$) e são representativos de três experiências independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle.

5. CONCLUSÃO

A análise química utilizando UPLC-DAD-qTOF-MS/MS permitiu identificar 81 substâncias no pólen apícola de *Mimosa pudica*, 54 em *Attalea funifera* e 40 em *Elaeis guineenses*. As principais classes identificadas foram: flavonoides, acil espermidinas e lipídeos. Do pólen apícola de foram isolados os biflavonoides rusflavona, amentoflavona e rusflavanona.

12 substâncias foram identificadas nas três amostras, sendo 1 açúcar, 4 flavonoides e 7 acil espermidinas.

As análises realizadas para determinação do teor de minerais mostraram boa precisão e robustez, permitindo determinação de micro e macro elementos no pólen apícola. Os principais minerais encontrados na composição das amostras foram K, Mg, e Ca. A alta relação K/Na pode tornar valioso produto para dietas com equilíbrio eletrolítico definido e a presença de Se e Zn faz dele uma fonte potencial de minerais antioxidantes para a dieta humana.

As amostras analisadas, principalmente as frações acetato de etila, apresentaram potencial antirradicalar frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, que pode ser explicada pela presença dos compostos fenólicos presentes nas amostras.

O estudo demonstrou pela primeira vez que o composto isolado de pólen apícola exerce alta atividade contra as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*. Outras análises experimentais irão caracterizar melhor a atividade quimioterápica dos compostos *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

ANTONELLO, A. M.; SARTORI, T.; FOLMER CORREA, A. P.; BRANDELLI, A.; HEERMANN, R.; RODRIGUES JÚNIOR, L. C.; PERES, A.; ROMÃO, P. R. T.; DA SILVA, O. S. Entomopathogenic bacteria *Photorhabdus luminescens* as drug source against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, p. 1065-1074, 2018.

AL-DAIHAN, S. e BHATA, R. S. Protective effect of bee pollen against sodium fluoride-induced hepatonephrotoxicity and serum electrolyte changes in rats. **Fluoride**, v. 52, p. 9-17, 2019.

ALEBACHEW, G. W. Economic value of pollination service of agricultural crops in Ethiopia: biological pollinators. **Journal of Apicultural Science**, v. 62, p. 265-273, 2018.

ALIDADI, S.; MORADI, M.; ASADI-SAMANI, M.; LORIGOOINI, Z. Antioxidant potential and total phenolic compounds of extracts and fractions of *Pistacia atlantica*. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, p. 293-297, 2017.

ALIMOGLU, G.; GUZELMERIC, E.; YUKSEL, P. I.; CELIK, C.; DENIZ, I.; YESILADA, E. Monofloral and polyfloral bee pollens: Comparative evaluation of their phenolics and bioactivity profiles. **LTW – Food science and technology**, v. 142, ID 110973, 2021.

AL-SHAGDARI, A.; ALARCÓN, A. B.; CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Biflavonoids, Main Constituents from *Garcinia bakeriana* Leaves. **Natural Product Communication**, v. 8, p. 1237-1240, 2013.

ALTUNATMAZ, S. S.; TARHAN, D.; AKSU, F.; BARUTÇU, U. B.; OR, M. E. Mineral element and heavy metal (cadmium, lead and arsenic) levels of bee pollen in Turkey. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 136-141, 2017.

ALVARADO, J. L.; DELGADO, M. D. Flora apícola en Uxpanapa, Veracruz, Mexico. **Biotica**, v. 10, p. 257–275, 1985.

GOMES, A. N. P.

ALVES, R. F. 2017. **Análise polínica e química de amostras de pólen apícola monofloral de espécies da família Arecaceae**. Feira de Santana-BA. 120p. Tese (Pós-graduação em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

ALVES, R. F.; SANTOS, F. A. R. Análise volumétrica do pólen de *Attalea funifera* Mart. (Arecaceae) em amostras de pólen apícola do litoral do baixo sul da Bahia, Brasil. **Paubrasilia**, v. 1, p. 5-11, 2018b.

ALVES, R. F.; SANTOS, F. A. R. Pollen foraged by bees (*Apis mellifera* L.) on the Atlantic Forest of Bahia, Brazil. **Palynology**, v. 43, p. 1-7, 2018a.

ARES, A. M.; VALVERDE, S.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; J. BERNAL. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 110-124, 2018.

ARRUDA, J. C.; SILVA, C. J.; SANDER, N. L. Conhecimento e uso do babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) por quilombolas em Mato Grosso. **Fragmentos de cultura**, v. 24, p. 239-252, 2014.

BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados Brasileiros e do distrito federal. **Boletim de Indústria Animal**, v. 62, p. 167-175, 2005.

BERDEAUX, O.; JUANEDA, P.; MARTINE, L.; CABARET, S.; BRETILLON, L.; ACAR, N. Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7738-7748, 2010.

Brasil. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. **A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento sobre Informação Nutricional Complementar**. Diário Oficial da União, n. 219, Brasília, 13 nov. 2012, Seção 1, p.122, 2012.

BRASIL, Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de

GOMES, A. N. P.

Própolis. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001**. Ministério da Agricultura. 2001.

BRIDI, R.; ATALA, E.; PIZARRO, P. N.; MONTENEGRO, G. Honeybee pollen load: fenolic composition and antimicrobial activity and antioxidant capacity. **Journal of Natural Products**, v. 82, p. 559-565, 2019.

CALDAS, F. R. L.; FILHO, F. A.; FACUNDO, H. T.; ALVES, R. F.; SANTOS, F. A. R.; SILVA, G. R.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Composição química, atividade antiradicalar e antimicrobiana do pólen apícola de Fabaceae. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 49-56, 2019.

CAMPOS, M. G. R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, p. 156–163, 2008.

CARPES, S. T.; CABRAL, I. S. R.; LUZ, C. F. P.; CAPELETTI, J. P.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 7, p. 667 – 673, 2009.

CEZAROTTO, C. S.; DORNELES, A.; BALDISSERA, F. G.; DA SILVA, M. B.; MARKOSKI, M. M.; RODRIGUES JÚNIOR, L. C.; PERES, A.; FAZOLO, T.; BORDIGNON, S. A. L.; APEL, M. A.; ROMÃO, P. R. T.; VON POSER, G. L. Leishmanicidal and antichemotactic activities of icetexanes from *Salvia uliginosa* Benth. **Phytomedicine**, v. 58, ID 152748, 2019.

CHAGAS, K. P. T.; FREIRE, A. S. M.; PINHEIRO, L. G.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Genetic diversity of long-established populations of *Elaeis guineensis* Jacquin (Arecaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, p. 1-9, 2019.

CONTE, P.; CARO, A. D.; BALESTRA, F.; PIGA, A.; FADDA, C. Bee Pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: a 1 physical-chemical, technological and sensory approach, **LWT - Food Science and Technology**. v. 90, p. 1-7, 2018.

GOMES, A. N. P.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DAGNINO, A. P. A.; MESQUITA, C. S.; DORNELES, G. P.; TEIXEIRA, V. O. N.; BARROS, F. M. C.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; FONSECA, S. G.; MONTEIRO, M. C.; RODRIGUES JUNIOR, L. C.; PERES, A. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species trigger mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1199-1209, 2018.

DAHL, A. Pollen lipids can play a role in allergic airway inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

DAOUD, A.; MALIKA, D.; BAKARI, S.; HFAIEDH, N.; MNAFGUI, K.; KADRI, A.; GHARSALLAH, N. Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. **Arabian Journal of Chemistry**, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.07.014> (*In press*), 2015.

DE MELLO, T. F.; BITENCOURT, H. R.; PEDROSO, R. B.; ARISTIDES, S. M.; LONARDONI, M. V.; SILVEIRA, T. G. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27-34, 2014.

DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, L. M.; MOREIRA, M. M.; DELERUE-MATOS, C.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Fenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen, **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1-21, 2018.

DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, M. L. M. F.; SATTLER, J. A. G.; SOUZA, B. R.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 808-815, 2016.

DIAS, L. G.; TOLENTINO, G.; PASCOAL, A.; ESTEVINHO, L. M. Effect of processing conditions on the bioactive compounds and biological properties of bee pollen. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 5, p. 357-365, 2016.

GOMES, A. N. P.

DOREA, M. C.; NOVAIS, J. S.; SANTOS, F. A. R. Botanical profile of bee pollen from the southern coastal region of Bahia, Brazil. **Scientific note**, v. 24, p. 862-867, 2010.

ECKERT, C. G.; HERLIHY, C. R. Using a cost–benefit approach to understand the evolution of self-fertilization in plants: the perplexing case of *Aquilegia Canadensis* (Ranunculaceae), **Plant Species Biology**, v. 19, p. 159-173, 2004.

FANG, N.; YU, S.; BADGER, T. M. LC-MS/MS Analysis of Lysophospholipids Associated with Soy Protein Isolate. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 6676-6682, 2003.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 22 Out. 2019.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043-1048, 2011.

FREIRE, K. R. L.; LINS, A. C. S.; DÓREA, M. C.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Palynological origin, fenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, v. 17, p. 1652-1664, 2012.

FRESHNEY, R. I. 2005. Culture of Specific Cell Types. In: Freshney R. I., editor. Culture of animal cells. New York: Wiley Online Library. p. 375-420.

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

GARCIA F.P.; HENRIQUE S. R. J.; DIN Z.; RODRIGUES-FILHO E.; UEDA-NAKAMURA T.; AUZELY-VELTY R.; NAKAMURA C. V. A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 22, n. 1, p. 57-71, 2017.

GARDANA, C.; BO', C. D.; QUIXAZÁN, M. C.; CORRREA, A. R.; SIMONETTI, P. Nutrients, phytochemicals and botanical origin of commercial bee pollen from different

GOMES, A. N. P.

geographical areas. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 73, p. 29-38, 2018.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2002-2008, 2009.

GERVAZONI, L. F. O.; BARCELLOS, G. B.; FERREIRA-PAES, T.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An overview. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, ID 579891, 2020.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO, E. A.; VEIGA, A. K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, p. 209-223, 2015.

GONTIJO, V. S.; JUDICE, W. A. S.; CODONHO, B.; PEREIRA, I. O.; ASSIS, D. M.; JANUÁRIO, J. P.; CAROSELLI, E.; JULIANO, M. A.; DOSATTI, A. C.; MARQUES, M. J.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, M. H. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.

GODZIEN, J.; CIBOROWSKI, M.; MARTÍNEZ-ALCÁZAR, M. P.; SAMCZUK, P.; KRETOWSKI, A.; BARBAS, C. Rapid and reliable identification of phospholipids for untargeted metabolomics with LC-ESI-QTOF-MS/MS. **Journal of proteome research**, v. 14, p. 3204-3216, 2015.

GREMBECKA, M.; SZEFER, P. Evaluation of honeys and bee products quality based on their mineral composition using multivariate techniques. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 4033 – 4047, 2013.

GROGL, M.; HICKMAN, M.; ELLIS, W.; HUDSON, T.; LAZO, J. S.; SHARLOW, E.; R.; JOHNSON, J.; BERMAN, J.; SCIOTTI, R.; J. Drug Discovery Algorithm for Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 216-221, 2013.

GOMES, A. N. P.

GUO, W.; NAZIM, H.; LIANG, Z.; YANG, D. Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. **The Crop Journal**, v. 4, p. 83 – 91, 2016.

HAN, X.; CHENG, H. Characterization and direct quantitation of cerebroside molecular species from lipid extracts by shotgun lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 163-175, 2005.

HEIM, C.; SJOVALL, P.; LAUSMAA, J.; LEEFMANN, T.; THIEL, V. Spectral characterisation of eight glycerolipids and their detection in natural samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 23, p. 2741-2753, 2009.

HIPÓLITO, J.; SOUSA, B. S. B.; BORGES, R. C.; BRITO, R. M.; JAFF, R.; DIAS, S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GIANNINI, T. C. Valuing nature's contribution to people: The pollination services provided by two protected areas in Brazil. **Global Ecology and Conservation**, v. 20, p. 1-11, 2019.

HSU, F.; TURK, J. Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: Mechanisms of fragmentation and structural characterization. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2673-2695.

JANNESAR, M. S. SHOUSHARI, A. MAJD, Z. POURPAK. Bee pollen flavonoids as a therapeutic agent in allergic and immunological disorders. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 16, n. 3, p. 171-182, 2017.

JUSTINO, A. B.; MIRANDA, N. C.; FRANCO, R. R.; MARTINS, M. M.; SILVA, N. M.; ESPINDOLA, F. S. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with *in vitro* antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83-92, 2018.

KALAYCIOGLU, Z.; KAYGUSUZ, H.; DOKER, S.; KOLAYLI, S.; ERIM, F. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 402 – 408, 2017.

GOMES, A. N. P.

KARKAR, B.; ŞAHİN, S.; GÜNEŞ, M. E. Antioxidative effect of turkish chestnut bee pollen on dna oxidation system and its fenolic compounds. **GIDA the journal of food**, v. 43, p. 34-42, 2018.

KATHURIA, M.; BHATTACHARJEE, A.; SASHIDHARA, K. V.; SINGH, S. P.; MITRA, K. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 5916-5928, 2014.

KERWIN, J. L.; WIENS, A. M.; ERICSSON, L. H. Identification of Fatty Acids by Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 31, p. 184-192, 1996.

KLEIN, M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B**, v. 274, p. 303-313, 2007.

KOCOT, J.; KIEŁCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.; MUSIK, I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-29, 2018.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAZMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

KOSTIC, A. Z.; KALUDEROVIC, L. M.; DOJCINOVIC, B. P.; BARAC, M. B.; BABIC, V. B.; MACUKANOVIC-JOCICE, M. P. Preliminary investigation of mineral content of pollen collected from different Serbian maize hybrids – is there any potential nutritional value? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 2803–2809, 2017.

KOSTIC, A. Z.; BARAC, M. B.; STANOJEVIC, S. P.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D. M.; TESIC, Z. L.; SIKOPARIJA, B.; RADISC, P.; PRETOVIC, M.; PESIC, M. B. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 301-309, 2015.

GOMES, A. N. P.

LI, Q.; LIANG, X.; ZHAO, L.; ZHANG, Z.; XUE, X.; WANG, K.; WU, L. UPLC-Q-Exactive orbitrap/MS-Based lipidomics approach to characterize lipid extracts from bee pollen and their in vitro anti-inflammatory properties, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 6848-6860, 2017.

LEE N.; BERTHOLET S.; DEBRABANT A.; MULLER J.; DUNCAN R.; NAKHASI H. L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 1, p. 53-64, 2002.

LI, Q.; WANG, K.; MARCUCCI, M. C.; SAWAYA, A. C. H. F.; HU, L.; XUE, X.; WU, L.; HU, F. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites, **Journal of Functional Foods**. v. 49, p. 472–484, 2018.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology. **Bee World**, v. 59, p. 139–157, 1978.

MAJEWSKI, J. Pollination value as an ecosystem service. **Ekonomia i środowisko**, v. 64, p. 208-219, 2018.

MALERBO-SOUZA, D. T.; SILVA, F. A. S. Comportamento forrageiro da abelha africanizada *Apis mellifera* L. no decorrer do ano. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, p. 183-190, 2011.

MARTINS, R. C.; DORNELES, G. P.; TEIXEIRA, V. O. N.; ANTONELLO, A. M.; COUTO, J. L.; RODRIGUES JÚNIOR, L. C.; MONTEIRO, M. C.; PERES, A.; SCHREKKER, H. S.; ROMÃO, P. R. T. Imidazolium salts as innovative agents against *Leishmania amazonensis*. **International Immunopharmacology**, v. 63, p. 101-109, 2018.

MBING, J. N.; NDONGO, J. T.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATCHADÉ, A. T.; PIÉBOJI, J. G.; TIH, R. G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.; GUEIFFIER, A. Flavonoids from the leaves of *Ouratea zenkeri* and *Ouratea turnerae*. **Asian Chemistry Letters**, v. 13, p. 81- 88, 2009.

MIHAJLOVIC, L.; RADOSAVLJEVIC, J.; BURAZER, L.; SMILJANIC, K.; VELICKOVIC, T.C. Composition of polyfenol and polyamide compounds in common

GOMES, A. N. P.

ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen and sub-pollen particles. **Phytochemistry**, v. 109, p. 125-132, 2015.

MIRANDA, C. S.; FIUZA, R. P.; CARVALHO, R. F.; JOSÉ, N. M. Efeito dos tratamentos superficiais nas propriedades do bagaço da fibra de piaçava *Attalea funifera* Martius. **Química Nova**, v. 38, p. 161-165, 2015.

MOK, H. J.; LEE, J. W.; BANDU, R.; KANG, H. S.; KIM, K.; KIM, K. P. A rapid and sensitive profiling of free fatty acids using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) after chemical derivatization. **RSC Advances**, v. 6, p. 32130-32139, 2016.

MORGANO, M. A.; MATINS, M. C. T.; RABONATO, L. C.; MILANI, R. F.; YOTSUYANAGIA, K.; RODRIGUEZ-AMAYAC, D. B. A Comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: Geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 727 – 736, 2012.

MORI, S.; AKAMATSU, M.; FUKUI, H.; TSUKIOKA, J.; GOTO, K.; HIRAI, N. The unusual conformational preference of N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-coumaroilespermidina *E-Z* isomers from the Japanese apricot tree, *Prunus mume*, for the (*ZZZ*)-form. **Phytochemistry Letters** 31 (2019) 131–139, 2019.

MURPHY, R. C.; AXELSEN, P. H. Mass spectrometric analysis of long-chain lipids. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 579-599, 2011.

MYINT, K. Z. W.; KIDO, T.; KUSAKARI, K.; DEVKOTA, H. P.; KAWAHARA, T.; WATANABE, T. Rhusflavanone and mesuaferrone B: tyrosinase and elastase inhibitory biflavonoids extracted from the stamens of *Mesua ferrea* L. **Natural product research**, Short Communication, p. 1-5, 2019.

NAKAMURA, M.; RA, J.; JEE, Y.; KIM, J. Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quepaertensis* Nakai leaf extract. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, p. 316-326, 2017.

NAVA-ZUAZO C.; ESTRADA-SOTO S.; GUERRERO-ALVAREZ J.; LEON-RIVERA I.; MOLINASALINAS G. M.; SAID-FERNANDEZ S.; CHAN-BACAB M. J.; CEDILLO-GOMES, A. N. P.

RIVERA R.; MOOPUC R.; MIRON-LOPEZ G.; NAVARRETE-VAZQUEZ G. Design, synthesis, and *in vitro* antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethylureas. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 6398-6403, 2010.

NEGRI, G.; BARRETO, L. M. R. C.; SPER, F. L.; CARVALHO, C.; CAMPOS, M. G. R. Phytochemical analysis and botanical origin of *Apis mellifera* bee pollen from the municipality of Canavieiras, Bahia State, Brazil. **Brazilian journal of food technology**, v. 21, p. 1-16, 2018.

NEGRI, G.; TEIXEIRA, E. W.; ALVES, M. L. T. M. F.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I, P.; BORGUINI, R. G.; SALATINO, A. Hydroxycinnamic acid amide derivatives, fenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from southeast Brazil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 5516-5522, 2011.

NOVAIS, J. S.; LIMA, L. C.; SANTOS, F. A. R. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera* L. in a semi-arid area from Bahia, Brazil. **Grana**, v. 48, p. 224-234, 2009.

OHTA, S.; FUJIMAKI, T.; UY, M. M.; YANAI, M.; YUKIYOSHI, A.; HIRATA, T. Antioxidant hydroxycinnamic acid derivatives isolated from Brazilian bee pollen. **Natural Product Research**, v. 21, p. 726–732, 2007.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p.321–326, 2011.

PACINI, E. **Encyclopedia of Ecology**: Pollination. 1^a Ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2008.

PEI, D.; LIU, J.; DI, D. Cerebroside and ceramide from the pollen of *Brassica napus* L. **Fitoterapia**, v. 81, p. 838-843, 2010.

PI, J.; WU, X.; FENG, Y. Fragmentation patterns of five types of phospholipids by ultra-high-performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 1319-1332.

GOMES, A. N. P.

PLETTNER, E.; SLESSOR, K. N.; WINSTON, M. L. Biosynthesis of Mandibular Acids in Honey Bees (*Apis mellifera*): De Novo Synthesis, Route of Fatty Acid Hydroxylation and Caste Selective β -Oxidation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 32-42, 1998,

POPAK, A. E.; MARKWITH, S. H. Economic Valuation of Bee Pollination Services for Passion Fruit (Malpighiales: Passifloraceae) Cultivation on Smallholding Farms in São Paulo, Brazil, Using the Avoided Cost Method, **Journal of Economic Entomology**, v. 112, p. 2049-2054, 2019.

PRIEU, C.; SAUQUET, H.; GOUYON, P.; ALBERT, B. More than sixty origins of pantoporate pollen in angiosperms. **American journal of botany**, v. 104, p. 1837-1845, 2017.

QIAN, W. L.; KHAN, Z.; WATSON, D. G.; FEARNLEY, J. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 78–83, 2008.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista científica eletrônica de engenharia florestal**, v. 6, p. 1-21, 2007.

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

RIZK, Y. S.; SANTOS-PEREIRA, S.; GERVAZONI, L.; HARDOIM, D. J.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S. F.; PELAJO-MACHADO, M.; CAROLLO, C. A.; ARRUDA, C. C. P.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; ZAVERUCHA-DO-VALLE, T.; CALABRESE, K. S. Amentoflavone as na Ally in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Analysis of Its Antioxidant/Prooxidant Mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, ID 615814, 2021.

RIZK, Y. S.; FISCHER, A.; CUNHA, M. C.; RODRIGUES, P. O.; MARQUES, M. C. S.; MATOS, M. F. C.; KADRI, M. C. T.; CAROLLO, C. A.; ARRUDA, C. C. P. *In vitro* activity

GOMES, A. N. P.

of the hydroethanolic extract and biflavonoids isolated from *Selaginella sellowii* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1050-1056, 2014.

ROCCHETTI, G.; CASTIGLIONI, S.; MALDARIZZI, G.; CARLONI, P.; LUCINI, L. UHPLC-ESI-QTOF-MS fenolic profiling and antioxidant capacity of bee pollen from different botanical origin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 335-346, 2019.

ROMÃO, P. R. T.; FONSECA, S. G.; HOTHERSALL, J. S.; NORONHA-DUTRA, A. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. **Parasitology**, v. 118, p. 559-566, 1999.

SALVADOR, J. T.; CARVALHO, T. C.; LUCCHESI, L. A. C. Relações cálcio e magnésio presentes no solo e teores foliares de macronutrientes. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, p. 27-32, 2011.

SANTOS, S. S.; ARAÚJO, R.; GIAROLLA, J.; SEOUD, O.; FERREIRA, E. I. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, ID 105906, 2020.

SARAIVA, L. C. F.; CUNHA, F. V. M.; LÉLLIS, D. R. O. D.; NUNES, L. C. C. Composition, biological activity and toxicity of bee pollen: State of the art, **Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas**. v. 17, n. 5, p. 426 – 440, 2018.

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

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R., Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507-511, 2006.

GOMES, A. N. P.

SIREGAR, E. H.; ATMOWIDI, T.; KAHONO, S. Diversity and abundance of insect pollinators in different agricultural lands in Jambi, Sumatera. **Hayati Journal of biosciences**, v. 23, p. 13-17, 2016.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total fenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

STANCIU, O. G.; MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D.; CAMPOS, M. G. Specific distribution of minerals in selected unifloral bee pollen. **Food Science and Technology Letters**, v. 3, p. 27-31, 2012.

STROPPIA P. H. F.; ANTINARELLI L. M. R.; CARMO A. M. L.; GAMEIRO J.; COIMBRA E. S.; SILVA A. D. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034-3045, 2017.

TAHA, E. A. Chemical composition and amounts of mineral elements in honeybee-collected pollen in relation to botanical origin. **Journal of Apicultural Science**, v. 59, n. 01, p. 75-81, 2015.

VALDEZ, R.H.; TONIN, L.T.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; MORGADO-DIAZ, J. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; NAKAMURA, C. V. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 110, n. 1, p. 7-14, 2009.

VESPER, H.; SCHMELZ, E.; NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M. N.; DILLEHAY, D. L.; LYNCH, D. V.; MERRILL, A. H. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 129, p. 1239-1250, 1999.

VOGT, T. Unusual espermina-conjugated hydroxycinnamic acids on pollen: function and evolutionary advantage. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 5311–5318, 2018.

GOMES, A. N. P.

WANG, C.; WANG, M.; HAN, X. Comprehensive and quantitative analysis of lysophospholipid molecular species present in obese mouse liver by shotgun lipidomics. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 4879-4887, 2015.

WENNEKES, T.; VAN DEN BERG, R. J. B. H. N.; BOOT, R. G.; VAN DER MAREL, G. A.; OVERKLEEF, H. S.; AERTS, J. M. F. G. Glycosphingolipids—Nature, Function, and Pharmacological Modulation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, p. 8848-8869, 2009.

WINSTON, M. The biology of the honey bee. **Insectes Sociaux**, v. 35, p. 318-318, 1988.

YANG, K.; WU, D.; YE, X.; LIU, D.; CHEM, J.; SUN, P. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 708-18, 2013.

YANG, N.; YANG, Y.; LI, K. Analysis of hydroxy fatty acids from the pollen of *Brassica campestris* L. var. *oleifera* DC. by UPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2013, p. 1-6, 2012.

YAO, H.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; OU, H.; LI, Y.; LI, S.; SHI, P.; LIN, X. Analysis of the total biflavonoids extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and its *in vitro* and *in vivo* anticancer effects. **Molecules**, v. 22, p. 1-17, 2017.

ZHANG, J.; KUBANEK, J.; HAY, M. E.; AALBERSBERG, W.; YE, W.; JIANG, R. Rapid identification of triterpenoid sulfates and hydroxy fatty acids including two new constituents from *Tydemania expeditionis* by LC-MS. **Journal of mass spectrometry**, v. 46, p. 908-916, 2011.