

Déborá Cristina de Pádua Guedes Amâncio

## COMPOSTOS BIOATIVOS DO PÓLEN

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria da Graça Campos e co-orientada pelo Professor Doutor Jorge Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# CAPÍTULO I

## I. INTRODUÇÃO

### I.1 Definição de Pólen:

Pólen é o gametófito masculino das flores, ou seja, o seu material genético, produzido pelas anteras nos estames, que atraído pelo ovário das mesmas fertiliza formando sementes, garantindo a reprodução, sendo constituído por pequenos grânulos de dimensão média de 50µm (CARPES, 2008).

A cada espécie vegetal corresponde um tipo de pólen, podendo-se dizer que o pólen é um "cartão de identidade" da planta considerada (FUNARI *et al.*, 2003). Os grãos de pólen apresentam uma enorme variedade de características morfológicas que são estabelecidas pela sua herança genética e não são influenciadas por alterações ambientais (BARTH *et al.*, 2010).

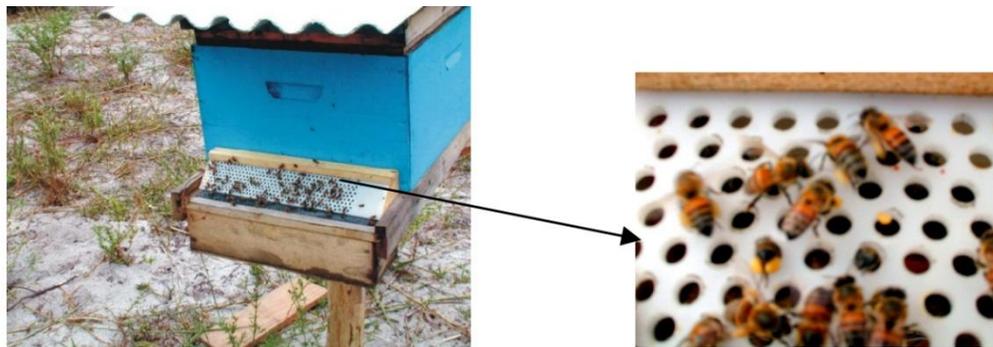
Enquanto o mel constitui a fonte de energia da colónia, o pólen é para as abelhas a principal fonte de nutrientes (CAMPOS, *et al.*, 2008). *Apis mellifera*, colhe pólen com a finalidade de alimentar as larvas nas fases iniciais de desenvolvimento e também para a longevidade da colónia.

Nesta colheita as abelhas operárias, quando tocam os estames, aquando da visita às flores, ficam com o corpo coberto de pó de pólen, devido à forte capacidade de aderência do mesmo. Com ele forma cargas polínicas que podem conter até 10% de néctar, que é necessário para a aglutinação. É ainda humedecido com secreções salivares, e aglutinado formando pastosas "pelotas". Estas secreções contêm diferentes enzimas, tais como amilase, catalase, etc. (FORCONE *et al.*, 2011).

Ulteriormente elas transportam as cargas polínicas para as colmeias em estruturas especializadas das suas pernas dianteiras e intermédias (corbícula) e depositam-nas nos alvéolos dos favos, comprimindo-os com as cabeças.

Os apicultores, através de armadilhas (caça-pólenes) colocadas à entrada da colmeia, colhem diariamente esse pólen que se designa vulgarmente por pólen apícola. O produto é deixado cair nos caça-pólenes uma vez que as abelhas não conseguem passar na maioria dos orifícios (armadilhas) com estas cargas nas patas. O pólen apícola é húmido e tem que ser

seco antes da comercialização para não desenvolver fungos nem bactérias, de forma a manter as suas propriedades e aumentar a sua validade.



**Figura 1** – Caça-pólenes (MAGALHÃES, 2005).

As abelhas levam, cada uma, para a colmeia uma carga média de pólen de 11,4 mg nas duas corbículas o que corresponde a cerca de 17% do peso da operária (FUNARI *et al.*, 2003). A necessidade diária de uma abelha operária ronda os 145 mg. Para coletar cerca de 250g de pólen, elas precisam de uma média de 17 mil voos.

De acordo com CARPES (2008), o pólen apícola, consoante a origem floral, pode ser classificado como monofloral ou multifloral. Quando há somente uma origem botânica, conservando as características quer organoléticas quer bioquímicas da planta de origem, trata-se de pólen monofloral. Quando a origem botânica é diversificada, isto é, há uma mistura de várias flores, o pólen possui propriedades bioquímicas variadas, sendo assim chamado de pólen multifloral. Este tipo é vulgarmente encontrado no comércio porque o apicultor mistura vários dias de colheita e isso reflete-se em diferentes espécies florais visitadas pelas abelhas. No entanto, sempre que elas tenham quantidade suficiente da mesma espécie floral apenas fazem cargas polínicas monoflorais. Quando este tipo de alimento é escasso podem aglutinar numa mesma carga pólenes de plantas diferentes mas isso não é muito frequente.

## **1.2 Contextualização Histórica**

Consideravelmente, a partir dos anos 80, houve um aumento significativo na procura de alimentos naturais que proporcionem uma melhor qualidade de vida. Este crescente

interesse tem impulsionado novas pesquisas direcionadas para compostos bioativos, os quais se encontram presentes em alimentos naturais (KARLING e CARPES, 2012).

Produtos apícolas, incluindo o pólen, têm sido utilizados desde há muito como alimento de elevado valor e diretamente ligados a dieta e, conseqüentemente a terapêutica. Foi usado durante séculos para proteger o organismo de doenças e mais especificamente para reduzir o processo de envelhecimento.

Pela medicina popular, o pólen tem sido usado para aliviar ou curar constipações, gripe, úlceras, anemia, reações alérgicas, enterites, etc. (CAMPOS *et al.*, 1997a).

Por volta de 487-380 a.C., Hérodicos de Sélymbrie, mestre de ginástica, inaugurou seu método de dieta, “A Grande Arte”, ou seja, a medicina em que Hipócrates de Cos (460-377 a.C.) estabelece em seu Tratado da Dieta, A Comida e a Natureza Humana (DEBRY, 1991). Empiricamente ou não, eles sabiam que a prática frequente de uma correta alimentação poderia ter efeitos profiláticos evitando o precoce ou o total aparecimento de algumas doenças.

Nos últimos anos, tem crescido muito a procura no mercado por alimentos funcionais. O objetivo tem sido, também a redução de despesas com a saúde que são consequência de vários males que afetam a população. Nos anos 90, o interesse pelo conceito de alimentos funcionais foi vivamente demonstrado por consumidores dos países ocidentais, incluindo nessa categoria todo produto alimentar ou ingrediente, seja de natureza convencional ou não, capaz de fornecer benefícios à saúde (NEVES, ALENCAR, e CARPES, 2009). O pólen apícola tem despertado a atenção do homem pela riqueza dos seus constituintes nutricionais com o propósito de que haja um proveito dos seus atributos alimentares na dieta humana (SOUZA *et al.*, 2004).

### **1.3 Critérios Para Controle de Qualidade do Pólen**

CAMPOS *et al.* (2008) sugerem critérios técnicos para a padronização da determinação da qualidade e identificação do pólen apícola. Do ponto de vista da higiene, a segurança microbiológica é o principal requisito de qualidade. Os principais contaminantes do pólen são metais pesados e pesticidas provenientes do ambiente e das práticas agrícolas. Para uma elevada qualidade, o pólen apícola deve ser colhido em áreas com, pelo menos, 3km de distância de fontes de contaminação, tais como intenso tráfico ou de áreas agrícolas com tratamento com pesticidas. A concentração de metais pesados nesta matriz vegetal não

deve ser superior a 0,1 mg/kg de Cd, 0,5 mg/kg de Pb, 0,5 mg/kg de As e 0,03 mg/kg de Hg. O pólen colhido na forma original deve conter entre 20-30% de conteúdo de água e o pólen desidratado (pólen apícola) a temperaturas que rondam os 42 °C deve possuir não mais de 6% de humidade. De acordo com a fonte floral, se se tratar de pólen apícola monofloral, o maior *taxon* deve corresponder a, pelo menos, 80%. Caso se trate de pólen apícola multifloral pode incluir diferentes *taxa* com diferentes percentagens. O uso de aditivos não é autorizado. Ao nível dos critérios macro e microscópicos, nenhuma substância deve estar presente, exceto fragmentos acidentais de abelhas, madeira, plantas e outros materiais inerentes ao processo de colheita do pólen pelas abelhas, que devem estar ausentes no produto comercializado. Uma limpeza mecânica e também manual deve ser efetuada para eliminar estes materiais diversos.

Quanto ao armazenamento, o pólen apícola, assim que colhido, deve ser congelado por pelo menos 48h para evitar qualquer contaminação e para destruição de possíveis ácaros, ovos, larvas de traças de cera e de outros insetos. O congelamento imediato contribui para o controlo do desenvolvimento de microrganismos da microflora normal do pólen. Depois do descongelamento pode ser guardado apenas por poucas horas e fazer-se de seguida a desidratação. Logo após a secagem, deve ser mantido em local ao abrigo da luz, fresco e seco, e em condições ideais pode ir até a um máximo de armazenamento de 2 anos, embora este limite seja contestado por alguns autores que o consideram muito elevado porque podem ocorrer mudanças na concentração nutricional do pólen de acordo com o armazenamento em causa. O congelamento não provoca mudanças substanciais na composição química das cargas polínicas, sendo, por isso, a técnica de preservação mais recomendada quando a salvaguarda do pólen para fins nutricionais ou terapêuticos é importante. A liofilização diminui a concentração da vitamina C e da pró-vitamina A (MURADIAN et al. 2005).

#### **1.4 Composição Química do Pólen**

Nos dias de hoje, sabe-se que o teor do pólen em macronutrientes faz dele um bom complemento para a alimentação diária, principalmente devido às proporções bem equilibradas de proteínas, lípidos e hidratos de carbono. O valor calórico do pólen pode ser avaliado com um fornecimento padrão de 100g numa média de  $381,70 \pm 14,69$  kcal. O conhecimento da composição química de nutrientes em alimentos é de elementar

importância para a determinação de dietas ajustadas aos indivíduos, para a recomendação de uma alimentação balanceada a grupos populacionais e desenvolvimento de novos produtos (SOUZA *et al.* 2004).

Outros componentes menores presentes no pólen são os minerais e os oligoelementos, compostos fenólicos, esteróis, flavonóides e terpenos. Possui ainda em sua composição vitaminas antioxidantes ( $\beta$ -caroteno como pró-vitamina A, vitaminas C e E) e também as vitaminas D e do complexo B. Existe uma relação entre as vitaminas e sua origem botânica. OLIVEIRA *et al.* (2009) concluíram que o local de origem botânica e de recolha influenciam os teores de vitamina no pólen. Na verdade, o pólen é referido apenas como o "alimento perfeitamente completo", uma vez que contém todos os aminoácidos essenciais necessários para o organismo humano. No entanto, a composição do pólen depende fortemente da fonte vegetal e da origem geográfica, em conjunto com outros fatores, tais como a composição genética das espécies vegetais, condições climáticas, tipo de solo momento da colheita, idade, e práticas apícolas (FEÁS, 2012).

Segundo PERIS (1984), o pólen supre a quantidade mínima em aminoácidos, dito essenciais, que o organismo humano necessita através de uma dose diária de 15g (equivalente a uma colher de sopa).

Compostos lipídicos e minerais (transportadores de cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre e manganês, etc.) representam 5 e 3% respetivamente. A maior parte dos ácidos gordos (60%) encontram-se na forma livre. Os ácidos gordos ligados, com bastante reflexo na composição do pólen, correspondem a um elevado teor de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) (70%) seguido por uma pequena quantidade de ácido linoleico e ácido oleico. Ácido palmítico é o ácido gordo saturado mais abundante (BASTOS, 2004). Os grãos de pólen recolhidos pelas abelhas, especialmente quando em contato com a saliva da abelha, são submetidos a várias modificações, tais como a oxidação de ácidos gordos insaturados por ação de enzimas hidrolíticas na saliva, temperatura e exposição ao oxigénio. Além disso, o pólen colhido pelas abelhas é manipulado pelos apicultores utilizando procedimentos de desidratação que podem ser prejudiciais aos ácidos gordos insaturados. Isto tem a sua importância uma vez que as abelhas geralmente selecionam pólen com um nível elevado de ácidos gordos insaturados (BONVEHI e JORDÁ, 1997).

O teor de proteínas do pólen corresponde a 15 a 30%, sendo que uma parte considerável da sua composição proteica, isto é, 10 a 13% encontra-se sob a forma de aminoácidos livres. Na verdade, a maior parte encontra-se na forma ligada. Possui ainda 20 a 40% de açúcar total, 20 a 26% de açúcar redutor. As fibras correspondem a 3 a 5%

(CARPES, 2008). Os teores de proteína de cargas polínicas (geralmente estimado a partir de níveis de azoto) fornecem informações sobre a qualidade nutricional dos recursos colhidos pelas abelhas. Pólen com menos de 20% de proteína bruta não pode satisfazer as exigências das colônias para o seu desenvolvimento e produção ótima. As abelhas (*Apis mellifera*) coletam entre 55 a 163 g de pólen diariamente por colônia (FORCONE, 2011). O teor de proteína no pólen depende da origem da planta. Estudos anteriores também evidenciaram que o teor de proteínas do pólen a partir da mesma espécie pode variar dependendo de fatores ambientais (condições climáticas, do solo, etc.) (CIRNU *et al.*, 1969).

Estudos de GILLIAM *et al.* (1980) demonstraram que a proteína do pólen pode conter entre 15 a 19 aminoácidos, incluindo todos os aminoácidos essenciais. Os aminoácidos vulgarmente encontrados, entre outros, são valina, treonina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, arginina, alanina, glicina, cisteína, histidina, serina, prolina. Uma conclusão elucidada por SZCZÉSNA (2006) vem de que a concentração de aminoácidos essenciais, expresso como percentagem do teor total de aminoácidos não é dependente da origem botânica do pólen, a despeito da concentração de aminoácidos, estes sim, dependentes da origem floral do pólen (PARAMÁS, 2006). Os estudos iniciais de DE GROOT (1953) mostraram que a metionina, arginina, triptofano, lisina, isoleucina, fenilalanina, histidina, valina, leucina, treonina são aminoácidos essenciais para as abelhas, enquanto a tirosina, cisteína, serina, hidroxiprolina, alanina, glicina e prolina são não essenciais. Há observações de que as abelhas mostram uma preferência para o pólen que é mais rico em aminoácidos essenciais, consistente com a hipótese de que as abelhas forragem preferencialmente o pólen com a maior qualidade nutricional disponível (COOK, 2003).

Minerais e oligoelementos são de importância vital para o organismo humano. São nutrientes protetores essenciais para a manutenção do estado de saúde e nutricional do corpo. A deficiência de minerais específicos pode levar a várias doenças crônicas. Os minerais não podem ser sintetizados no corpo humano e, por isso, eles devem ser obtidos através da dieta. Os alimentos contendo minerais em quantidades adequadas devem ser incluídos na dieta diária para assegurar o fornecimento adequado dos mesmos ao organismo. Vinte e seis dos elementos que ocorrem naturalmente são conhecidos por serem essenciais para a vida humana. Os elementos minerais podem ser geralmente classificados como importantes elementos nutritivos, essenciais (por exemplo: Ca, Cl, K, Mg, N, Na, P e S), elementos menores e traços nutricionalmente essenciais (tais como Fe, B, Br, I e Si) e aqueles considerados como tóxicos, ou com uma dualidade essencial/tóxico, em que os

níveis excessivos podem apresentar toxicidade (como Zn, Se, Mn, Mo) (STANCIU *et al.*, 2012).

O cálcio constitui o maior componente dos ossos e dentes, é essencial para o normal funcionamento do músculo cardíaco, coagulação sanguínea e regulação da permeabilidade celular e transmissão dos impulsos nervosos. Um déficit de cálcio pode afetar a formação de ossos e dentes, mas o excesso pode causar retenção de pedras nos rins. A deficiência de cálcio durante um longo período de tempo é responsável pela osteoporose, quando os ossos estão deteriorados e aumento do risco de fraturas. A dose diária necessária é entre 350 e 1100 mg/dia (MOGOS, 1997). O magnésio é, como um co-fator de muitas enzimas envolvidas no metabolismo de energia, lípidos, hidratos de carbono, ARN e da síntese de ADN, e na manutenção do potencial elétrico de tecidos do sistema nervoso e das membranas celulares, contração muscular e manutenção do equilíbrio osmótico. A deficiência de magnésio em humanos causa espasmos musculares, e tem sido associada a uma tensão arterial elevada, muitas doenças cardiovasculares, diabetes e osteoporose. A dose diária necessária é de 350 mg/dia para homens e de 300 mg/dia para mulheres (HARMANESCU *et al.*, 2007). O potássio está envolvido na contração muscular, no metabolismo dos lípidos, na síntese de proteínas, manutenção do equilíbrio de fluidos e eletrólitos no corpo, constitui-se uma parte essencial do balanço iônico, da função renal e adrenal, e é responsável pela transmissão de impulsos nervosos. A ingestão diária necessária de K é entre 2 a 4 g/dia (MOGOS, 1997). O sódio está presente em fluidos extracelulares em animais e seres humanos. É responsável pela despolarização da membrana celular e pelo equilíbrio de água no meio intra e extra celular (FUNARI, 2003). O ferro é um elemento essencial para os seres humanos, serve como um transportador de oxigênio pela hemoglobina dos glóbulos vermelhos, como um meio de transporte para os elétrons no interior das células. Cerca de 60% está ligado à hemoglobina e 10% a enzimas teciduais ferro-dependentes. Os restantes 20% e 10% estão armazenados como ferritina e hemosiderina, respetivamente (SCHÜMANN e ELSENHANS 2004). Zinco e ferro desempenham um importante papel promovendo o metabolismo orgânico, fortalecendo o sistema imunitário e prevenindo doenças. O zinco é um componente de aproximadamente 300 enzimas e proteínas que participam em todos os principais processos metabólicos. O cobre é um dos vários metais pesados residuais que são essenciais para a vida (STANCIU, 2011). O manganês é tanto um constituinte como um ativador de várias enzimas e proteínas em plantas, animais e seres humanos, e tem cerca de 20 funções identificadas. Também considera-se a presença de minerais que podem ser tóxicos consoante a concentração, isto

é, presença no organismo. Compostos solúveis de níquel em excesso são hepatotóxicos e nefrotóxicos mas como aerossóis ou poeiras, compostos de níquel insolúveis ou níquel elemental são muito tóxicos (carcinogénicos), o que justifica que alguns países tenham imposto limites restritos ( $0,05-1 \text{ mg/m}^3$ ) (SUNDERMAN, 2004). O chumbo não é um elemento essencial para a vida e é muito tóxico para o sistema nervoso e os rins (HARMANESCU, *et al.*, 2007).

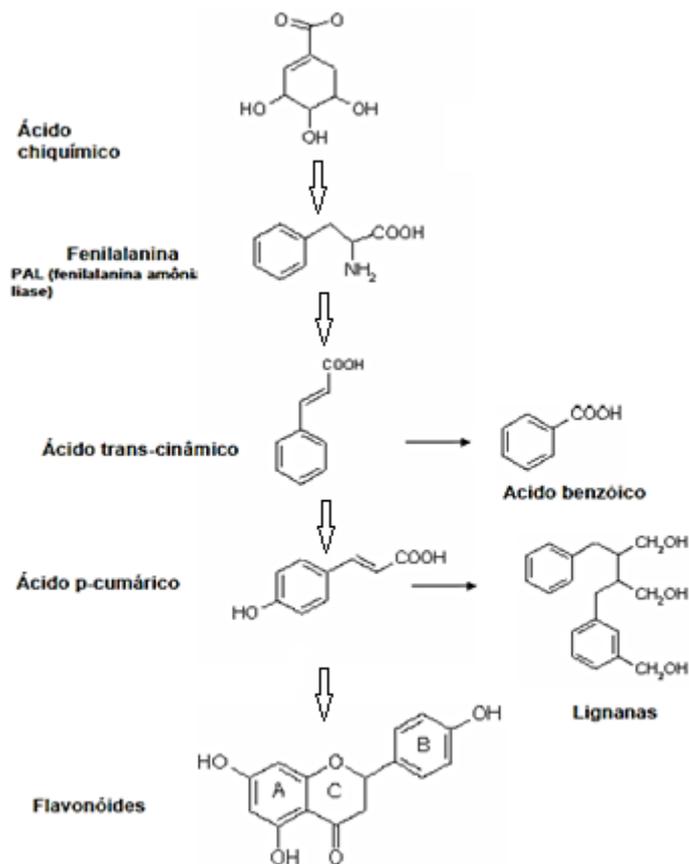
O pólen é um produto natural que apresenta essa composição nutricional rica, nomeadamente em minerais e oligoelementos contribuindo para um harmonioso funcionamento do organismo, quando ingerido diariamente. A concentração para a maioria dos minerais no pólen varia de acordo com a origem botânica, ainda que os níveis de zinco permaneçam mais ou menos constantes (STANCIU, 2011).

Os compostos fenólicos e seus derivados, tais como os flavonóides, são de fundamental importância na constituição do pólen. A sua determinação constitui um indicador de qualidade do produto assim como o índice de aminoácidos livres para os quais foi sugerida uma quantidade mínima de  $2\text{g}/100\text{g}$  para a padronização de pólen no mercado europeu. O estabelecimento dos parâmetros e o desenvolvimento de um marcador de qualidade podem coadjuvar a inclusão do pólen neste mesmo mercado. Também tem-se verificado que o conteúdo em compostos fenólicos altera-se com a origem floral (CARPES, 2008).

### **1.5 Constituintes Com Atividade Biológica No Pólen**

Já foi referido no texto acima que o pólen tem apresentado vários benefícios no que concerne a saúde humana.

Constituindo-se o principal meio alimentar das abelhas, esta matriz vegetal é rica em constituintes fenólicos, particularmente flavonóides, seus derivados, conhecidos por sua ação biológica. Composto fenólico é um termo genérico que se refere ao vasto número de compostos mundialmente dispersos através do reino vegetal e caracterizado por possuir no mínimo um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos substituídos. Estes compostos são produzidos nas plantas como metabolitos secundários através da via do ácido chiquímico (Figura 2).



**Figura 2** – Síntese de compostos fenólicos através da via do ácido chiquímico (SHAHIDI e NACZK, 2004).

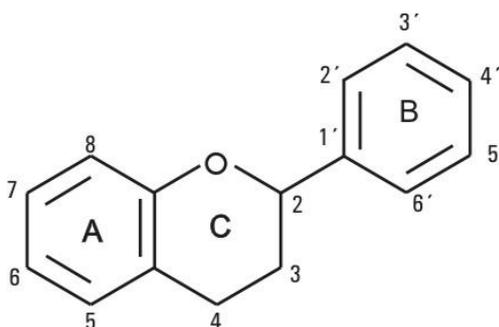
Os compostos fenólicos variam desde uma forma simplificada com baixo peso molecular compostos por anéis aromáticos individuais a grandes e complexos taninos e derivados polifenóis. Podem ser classificados, de acordo com o número e arranjo dos seus átomos de carbono, em flavonóides (flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas e outros) e não-flavonóides (ácidos fenólicos, hidroxicinamatos, e outros) (Figura 4).

Frequentemente são encontrados conjugados a açúcares e ácidos orgânicos (HUBINGER, 2009). Caracterizam-se pela presença de, pelo menos, um grupo hidroxilo ligado diretamente a um anel aromático. Os vegetais e muitos microrganismos têm a capacidade de sintetizar o anel aromático e, a partir dele, produzir vários compostos fenólicos o que não acontece com os animais por não possuírem essa capacidade, sendo necessária a ingestão de substâncias através da dieta.

Quimicamente, os compostos fenólicos existem tanto na forma livre como na forma conjugada. Grande parte dos compostos fenólicos é encontrada na natureza na forma de heterósidos ou ésteres e não na forma livre, são, por isso, solúveis em água e solventes

orgânicos polares. Este conhecimento é também importante uma vez que sabe-se que as propriedades estruturais dos compostos fenólicos afetam a proporção e a extensão da sua absorção no intestino delgado e cólon. A biodisponibilidade dos flavonóides glicosídeos tem lugar no cólon através da microflora intestinal. A absorção dos flavonóides depende da variedade e posição dos açúcares ligados, ou seja, os efeitos benéficos destes compostos dependem da quantidade ingerida associada à sua biodisponibilidade. (HUBINGER, 2009). De modo geral, possuem propriedades ácidas e seu isolamento pode ser feito através da sua solubilidade em soluções básicas. Podem formar pontes de hidrogénio intra ou intermoleculares. Quanto à absorção, mostram intensa absorção na região ultravioleta. Apresentam também propriedades de complexação com metais, facilidade em ser oxidados por luz, temperatura, meio alcalino, enzimas vegetais específicas, o que faz com que escureçam soluções (CARPES, 2008).

Por sua vez, os flavonóides são o grupo mais importante dentro dos derivados fenólicos. Constituem potenciais marcadores taxonómicos. Possuem uma estrutura heterocíclica de quinze carbonos com dois anéis aromáticos ligados através de uma ponte de três carbonos, sendo a estrutura comum o difenil-propano ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Figura 3). Para a diferenciação das posições dos carbonos da molécula, utiliza-se um sistema ordinário de numeração para os anéis A e C, e para o anel B sistema numeral seguido de apóstrofe (Figura 3). Quando no processo de biossíntese não há ciclização para formar o anel C, a numeração com apóstrofe é feita no anel A (TRUEBA, 2003).



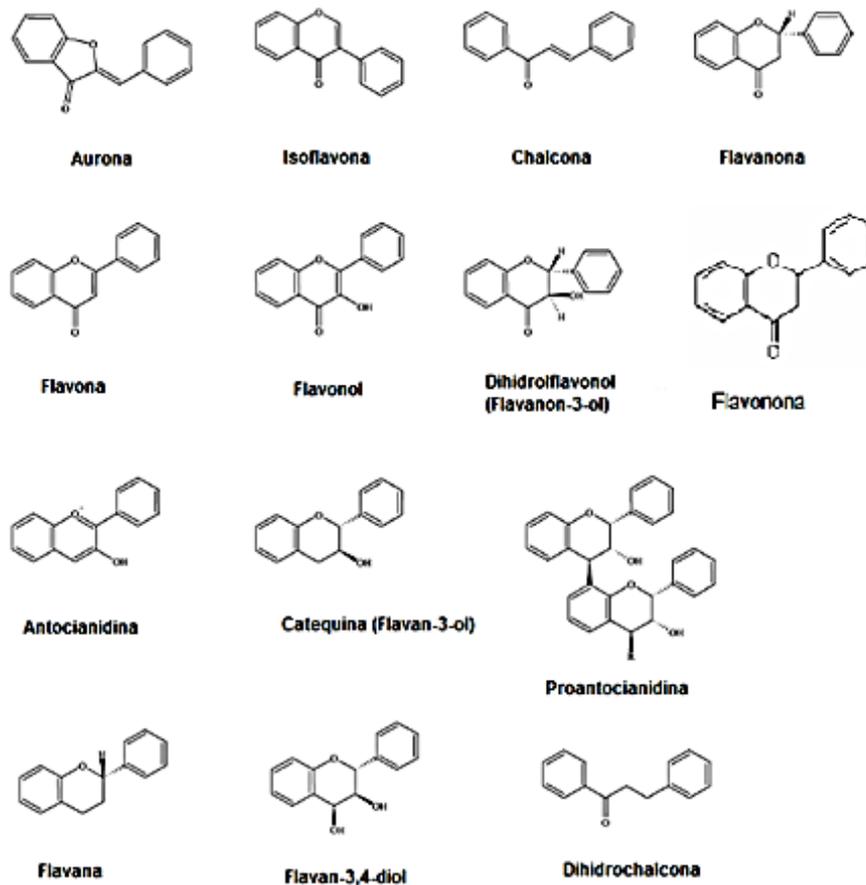
**Figura 3** – Sistema de numeração e estrutura básica dos flavonóides (TRUEBA, 2003).

Os flavonóides são os mais numerosos compostos fenólicos encontrados em todo reino vegetal. Têm um importante e variado papel como metabolito secundário, estando envolvido em processos como proteção à exposição UV, pigmentação, resistência a doenças,

etc. (HUBINGER, 2009). De fato, os protetores fenólicos UV-B, tais como os ácidos fenólicos e os flavonóides, são encontrados principalmente na parede superficial do pólen para a proteção do seu vulnerável protoplasma contra radiação solar e outros agentes químicos e microbiológicos ambientais (LOPES *et al.*, 2011).

De modo geral, estes compostos são maioritariamente encontrados na forma de glicosídeos, isto é, ligação de um açúcar à uma ligação semiacetal em um grupo hidroxilo (ou mais) da molécula, mas também ocorrem naturalmente na forma de agliconas, ou seja, na forma livre. No pólen é a forma glicolisada que predomina. Os açúcares mais comumente encontrados nos flavonóides são a L-ramnose, D-galactose e a D-glicose, assim como dissacarídeos e trissacarídeos. É a sua estrutura química que determina a especificidade da sua ação. São classificados em 8 grupos que têm em comum a presença de um anel pirânico, isto é, com heteroátomo de oxigênio, excetuando as chalconas. Dentro ainda de cada grupo podem variar em número e posição dos substituintes hidroxilos e no grau de glicosilação e alquilação. BONVEHI *et al.* (1997) verificaram que os flavonóides mais encontrados em produtos apícolas são caemferol, miricetina, quercetina, isoramnetina, galangina (flavonóis), apigenina, rutina, canferide, acetina e crisina (flavonas) (CARPES, 2008).

Os flavonóis são os mais difundidos entre os flavonóides. São facilmente encontrados em plantas em florescimento e que desempenham importante ação na estimulação do crescimento do tubo polínico e função essencial fisiológica na germinação do pólen. Estudos de MARKHAM e CAMPOS (1996) revelaram, no entanto, compostos flavonóides raros ainda não elucidados, os derivados de flavonóis glicolisados, 7-O-metilherbacetina-3-O-soforósido e 8-O-metilherbacetina-3-O-soforósido. A descoberta destes vem sugerir a ação dos mesmos como um dos fatores que restringem a polinização cruzada (MARKHAM e CAMPOS, 1997).



**Figura 4** – Estrutura das principais classes de flavonoides.

Estes compostos, isto é, flavonóides, atraíram muita atenção para os campos da nutrição, saúde e medicina como resultado da crescente evidência de seus benefícios. Além disso, têm valor acrescido devido a sua participação como componente essencial na germinação do pólen e crescimento do tubo polínico (YLSTRA *et al.*, 1992). Atualmente, o pólen vem-se destacando por apresentar diversas propriedades biológicas.

A quercetina, um dos principais flavonóides do pólen, tem mostrado ser um composto com elevada atividade antioxidante, com especial ação sobre os glóbulos vermelhos. Os resultados de SILVA *et al.* (2009) apresentaram um efeito protetor da quercetina contra a hemólise hipotónica dependente da concentração, podendo prevenir até 50% da hemólise, apresentando-se como uma possível terapêutica na anemia. A capacidade de bloquear o ciclo celular em várias fases através da inibição da expressão de genes específicos e de aumentar a expressão de genes supressores de tumores faz desse composto um ativo em células carcinogénicas da próstata. O ácido hidroxâmico é um composto ativo que existe no extrato do pólen que mostrou inibição do crescimento de células tumorais prostáticas *in vitro* (ZHANG *et al.* 1995) e que deu origem a um produto comercializado

com o nome de Cernitin®(WÓJCICKI e SAMOCHOWIEC, 1984). A sua aplicação torna-se, portanto, benéfica em doentes com hiperplasia benigna da próstata (HBP) responsável pelo alívio dos sintomas, diminuição do volume da próstata e frequência urinária.

Os compostos fenólicos incluem-se sobretudo na categoria de sequestradores de radicais livres, inibindo a cadeia de iniciação ou impedindo a propagação da cadeia radicalar (linha secundária de defesa), ainda que também possam exercer sua ação antioxidante por meio de outros mecanismos, como quelantes de iões metálicos que catalisam reações de oxidação (VECCHIA *et al.*, 2009), interação sinérgica com antioxidantes endógenos, inibição da xantina oxidase e indução da atividade antioxidante das enzimas (LOPES, 2011).

Um radical livre é uma estrutura neutra ou carregada que possui um único eletrão desemparelhado. Estas espécies altamente reativas promovem desordens moleculares importantes, bem como o envelhecimento celular e, por conseguinte, morte celular, geração de radicais livres secundários, oxidação, fragmentação, etc. Espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) são produzidas em todas as células de mamíferos como o resultado do metabolismo celular normal e, devido à ativação de enzimas oxidantes, em resposta a um estímulo exógeno. O equilíbrio entre a produção de ROS e a defesa antioxidante determina o grau de *stress* oxidativo. A geração de ROS tem sido associada com a sinalização celular, respostas de *stress*, proliferação celular, etc. A capacidade de ROS para induzir o dano celular e causar a morte das células abre a possibilidade de utilizar esta propriedade no tratamento do cancro por meio de um mecanismo mediado por radicais livres (VILLAMOR *et al.* 2004). A oxidação, nomeadamente de fosfolípidos constituintes da parede celular, está diretamente envolvida na degradação do nosso organismo, pois viabiliza a entrada na célula de xenobióticos, bactérias, vírus, etc. Estes compostos precisam, por isso, ser preservados para a manutenção da saúde celular, uma vez que as células têm capacidade limitada para a atividade oxidativa destes radicais. Nesta medida, os antioxidantes podem conduzir ao equilíbrio. Todavia, em caso de desordens excessivas, os endógenos não colmatam as necessidades pelo que torna-se necessária uma suplementação exógena obtida através da alimentação (LOPES, 2011).

Sabe-se que os radicais livres ativos estão envolvidos em vários processos degradativos celulares, como diabetes, doenças cardiovasculares, Parkinson, distúrbios gastrointestinais, aterosclerose, cancro, artrite, etc. Estas espécies podem ser produzidas tanto através do normal metabolismo como por influências externas, como a radiação ultravioleta (CAMPOS *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm sido realizados de modo a relacionar a estrutura de flavonóides e sua atividade anti-radicalar. CARPES (2008) elucida que a habilidade antioxidante dos flavonóides e ácidos fenólicos está relacionada com o número e posição dos grupos hidroxilos na molécula. Isto é, um aumento do número de substituintes hidroxilos conduz a um aumento da atividade antioxidante. Compostos com três grupos hidroxilos no anel fenil de ácidos fenólicos ou o anel B dos flavonóides têm elevado poder antioxidante. A perda de um grupo hidroxilo diminui levemente a atividade, ao passo que a perda de dois grupos hidroxilos representa significativa perda de atividade. Além disso, a glicosilação resulta em redução da atividade antioxidante para alguns flavonóides tais como a quercetina, a adição de uma porção de açúcar diminui a atividade da aglicona e a adição de uma segunda porção diminui ainda mais a atividade, devido a problemas relacionados a impedimento estérico (HUBINGER, 2009). SINGLETON *et al.* (1999) determinaram que os principais determinantes para a atividade anti-radicalar são a presença de dois grupo hidroxilo no anel B, assim como a presença da insaturação no anel C e a presença da função 4-oxo no anel C. O grupo dihidroxilo e outras funções podem também explicar a habilidade dos flavonóides em quelar metais de transição como cobre e ferro (VECCHIA, 2009).

A atividade dos antioxidantes, depende assim, de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais). Sabe-se que a atividade antioxidante está correlacionada à outras, tais como atividades anti-inflamatória, anti-carcinogénica e anti-aterosclerótica. Esta avaliação pode ser usada como um marcador da bioatividade do pólen. Alguns estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante dos flavonóides é maior que a das vitaminas C e E (NEVES, ALENCAR e CARPES, 2009).

Correspondência entre o aumento do consumo de compostos fenólicos com ação antioxidante e o abatimento do risco de doenças cardiovasculares bem como de certos tipos de cancro tem sido claramente evidenciados por estudos epidemiológicos (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

O ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) é um ácido gordo essencial, importante para a saúde humana, não pode, contudo, ser produzido pelo organismo. Por esta razão, é necessário obtê-lo por meio da alimentação. Uma vez ingerido, o organismo o converte em dois tipos de ácidos gordos ómega-3, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), que são mais rapidamente utilizados pelo organismo. Estudos em seres humanos mostraram que um suplemento dietético com ácidos gordos polinsaturados diminui a viscosidade sanguínea e reduz os níveis de triglicédeos e colesterol. O papel do ácido  $\alpha$ -

linolénico como um precursor do EPA é significativa, uma vez que o EPA é responsável por reduzir a agregação plaquetária, exibindo um efeito anti-trombótico. SEPPÄNEM *et al.* (1989) verificaram que o extrato lipossolúvel do pólen contém elevado teor de ácido  $\alpha$ -linolénico.

HAMAMOTO *et al.* (2006) indicaram um efeito estimulatório da fração hidrossolúvel do extrato do pólen apícola na formação óssea *in vitro*. A administração oral desse mesmo extrato em ratos promoveu um significativo aumento do teor de cálcio, indicando resultados *in vivo* da participação do pólen na osteoporose, uma vez que nesta doença há redução da massa óssea.

KAFADAR *et al.* (2012) realizaram um estudo comparativo em 32 ratos com o objetivo de avaliar a perda da massa óssea devido à osteoporose. Após 12 semanas de administração de pólen, os ratos foram sacrificados. Antes do sacrifício, a densidade mineral óssea (DMO) foi medida e amostras de sangue foram colhidas para análise bioquímica. Após o sacrifício, foi determinado o nível de cálcio ósseo nas amostras de tecidos. Verificou-se que a DMO da coluna lombar e do fémur proximal foi significativamente maior no grupo de pólen apícola, assim como os níveis de cálcio e fosfato do tecido ósseo.

A bioatividade de componentes do pólen também está demonstrada na sua ação anti-diarréica. Extratos de pólen de *Eucalyptus globulus labill* e *Salix atrocinerea*, estudados por CAMPOS (1997a), mostraram efeitos no retardamento da diarreia e na diminuição da percentagem de excrementos diarréicos, respetivamente. Esta atividade pode ser atribuída à quercetina, embora outros compostos fenólicos possam também ter um papel nesta atividade.

Derivados de herbacetina, flavonóide presente no pólen de *Eucalyptus globulus*, *Ranunculus sardous* e *Ulex europeans* apresentaram atividade antibiótica, isto é, efeito inibitório sobre os microrganismos patogénicos (CAMPOS *et al.* 1998). Esta ação está relacionada à inativação de enzimas celulares e mudanças na permeabilidade das membranas celulares. Em estudos *in vitro* e *in vivo* de MIDDLETON (1986), verificou-se que a quercetina apresentou propriedades antivirais contra o herpes simplex do tipo 1, para influenza tipo 3 e polio tipo 1.

Estudo realizado por MARUYAMA *et al.* (2010) a fim de verificar a ação anti-inflamatória de extratos etanólicos do pólen, apurou que após 5h da administração de extratos etanólicos do pólen em ratos com edema da pata induzido por uma injeção de carragenina, houve inibição da produção de COX-2 e NO, o que sugere que o extrato etanólico do pólen apícola mostra uma potente atividade anti-inflamatória e seu efeito atua através da inibição da produção de NO, para além da atividade inibidora da COX-2. Alguns

flavonóides incluídos no pólen apícola podem, em parte, participar em algumas das ações anti-inflamatórias (MARUYAMA, *et al*, 2010).

Quando comparado com outros alimentos, o pólen apresenta elevado teor em proteínas, minerais e vitaminas, porém reduzida quantidade em gorduras pelo que BELL *et al*. (1983) propuseram que o pólen se constitui um coadjuvante na alimentação materna durante a gravidez sem afetar o normal desenvolvimento do feto.

BONVEHI e JORDÁ (1997) sugerem que uma quantidade mínima de 200 mg de rutina/kg de pólen deve estar presente para que se garanta as propriedades nutricionais e biológicas do pólen, assim como a aceitação do mesmo pelo mercado Europeu. A rutina se constitui o melhor identificador de flavonóides na forma de agliconas livres.

Os flavonóides tais como a rutina, quercetina, apigenina, demonstraram redução da incidência de doenças degenerativas tais como arteriosclerose e tumores carcinogénicos induzidos em ratos (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

A caracterização físico-química e biológica é importante para um correto controlo de qualidade e uma padronização desta matriz vegetal para possíveis utilizações na indústria alimentar e farmacêutica (ALENCAR, 2002).

## **1.6 Objetivo**

O objetivo deste projeto foi o de realizar uma abordagem e caracterização da matriz vegetal, pólenes, colhida manualmente e de pólen apícola no intuito de compreender algumas das suas potencialidades como matriz vegetal que possam vir a serem usadas para retirar constituintes bioativos. Algumas amostras correspondem a diferentes anos de colheita, vários países produtores de diferentes regiões do globo de modo a perceber-se se contêm perfil cromatográfico similar e iguais constituintes químicos.

Para isso pretende fazer-se uma avaliação dos taxa com mais potencial para exploração industrial e ainda o rastreio de alguns compostos bioativos mais promissores.

As informações recolhidas no presente trabalho irão constituir um primeiro tomo de dados de uma possível série de trabalhos a serem desenvolvidos, no sentido de criar um repositório de *fingerprints* para as espécies estudadas de uma forma padronizada.

## 2. FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS

### 2.1 Microscopia ótica

A microscopia ótica tem como objetivo a observação e análise microestrutural de objetos sólidos, sendo a ferramenta mais utilizada para a caracterização morfológica. Trata-se de um processo básico da biologia moderna, sendo responsável por algumas das mais importantes descobertas relacionadas com a vida. A sua história tem início em 1285 com o fabrico das primeiras lentes óticas através do polímero do vidro por Fiorentino Salvino d'Amato (MASI, 1988).

Os principais tipos de microscópio ótico são o convencional e o confocal. Apesar de básicos existem numerosas variações dentre os mesmos, além da possibilidade de inclusão de acessórios, originando diferentes combinações e satisfazendo as necessidades.

De uma maneira simples, um microscópio é constituído fundamentalmente por três elementos: um sistema ótico de ampliação (lentes), um sistema de iluminação (o sistema completo compreende uma fonte de luz, um condensador de iluminação, um diafragma de campo, um espelho ajustável, um condensador de foco e um diafragma de abertura), e um sistema de visualização.

O microscópio apresenta dois sistemas de lentes convergentes: a objetiva e a ocular. A primeira, que fica próxima ao objeto a ser visualizado, é constituída por um conjunto de lentes que apresenta pequena distância focal e que fornece uma imagem real e ampliada do objeto que é observado. A segunda, que fica próxima ao olho do observador, funciona como uma lupa, dando uma imagem virtual e aumentada da imagem real que se formou pela objetiva. Estas estão dispostas nas extremidades de um cilindro oco, que constitui a coluna do microscópio e que possui a capacidade de se aproximar ou afastar da amostra para que se tenha uma focalização perfeita. A potência do microscópio é resultado do produto da ampliação linear da objetiva pela potência da ocular. Seu valor será elevado quando as distâncias focais da objetiva e ocular forem pequenas. A distância mínima distinguível entre dois pontos é limitada pela difração da luz. Assim, se o feixe de luz incidente possuir uma abertura angular grande e forem utilizadas lentes de inversão, o poder separador será melhorado, pois elimina-se a difração das bordas da lente (BRADBURY, 1989).

Apesar de toda ajuda que proporciona, apresenta baixa resolução ( $\approx 0,5\mu\text{m}$ ), apenas visualização de imagem plana sem profundidade, além de exigir preparação prévia da

amostra. A escala de observação é da mesoestrutura, grão e tamanho das partículas, com ampliação típica até  $\times 10^2$  (MASI, 1988).

## 2.2 HPLC/DAD

O HPLC enquadra-se dentro da classe da cromatografia de eluição. Nele, um líquido (fase móvel) circula em íntimo contato com um sólido ou um outro líquido imiscível (fase estacionária). Ao introduzir uma mistura de substâncias (analitos) no fluxo da fase móvel, cada analito avança ao longo do sistema, com uma velocidade diferente que dependerá da sua afinidade para com cada uma das fases. Isto significa que, após a conclusão do percurso da amostra através da coluna, cada uma das substâncias introduzidas no sistema eluirá com um tempo diferente, isto é, estarão separadas (RUTZ, 2009). A função da bomba é a de fornecer um fluxo constante e livre de impulsos de fase móvel através da coluna, sem que o fluxo seja influenciado pela pressão da cabeça da coluna, já que esta pode variar devido à obstrução das linhas de fluxo, do filtro da cabeça da coluna, etc.

Em cromatografia líquida pode-se trabalhar em duas modalidades: isocrática, quando a fase móvel mantém a mesma composição durante a eluição, e em gradiente, quando a composição da fase móvel muda segundo uma função dependente do tempo. Os principais métodos de misturas de componentes da fase móvel são mistura a alta pressão ou mistura a baixa pressão.

Ao nível de injetores, estes podem ser fundamentalmente de seringa ou de válvula. O detetor é um dispositivo que permite medir, à saída da coluna, uma propriedade física do eluente, que deverá depender da composição deste, como, por exemplo, a radiação ultravioleta. Nos detetores de absorção ultravioleta, a linha de base representa a transmissão máxima de luz e qualquer desvio dela indicará perda ou absorção de radiação (COLLINS e GUIMARÃES, 1988).

A utilização de absorção de luz ultravioleta para o controlo de uma corrente líquida e análise dos vários componentes que se encontram em solução, é uma extensão natural da espectrofotometria. Ao contrário do que acontece com o índice de refração, a absorção de UV é um parâmetro específico para cada composto, uma vez que terá de apresentar uma absorção adequada a cada região do espectro ou, se necessário, ser combinado com um reagente adequado para formar um derivado que apresenta absorção. O conhecimento

prévio das absorções de diversos grupos funcionais a determinados comprimentos de onda é importante para obter uma resposta máxima do detetor. Há diversos tipos de detetores.

A coluna é o elemento fundamental da cromatografia líquida já que é nela aonde se dá lugar a separação. Resulta da correta eluição da coluna adequada a cada separação. Características como diâmetro interno, comprimento, enchimentos, tamanho das partículas do enchimento influenciam a capacidade de separação (COLLINS e GUIMARÃES, 1988).

### **2.3 Determinação da humidade**

O processo de secagem por infravermelhos é realizado utilizando um analisador de humidade, neste caso, Kern MLB 50-3.

De maneira a se atingir objetivos pré-definidos, pode-se proceder a otimização do processo por meio de seleção do tempo total de análise, de intervalos de tempo para submeter a amostra sobre a ação do infravermelho, da temperatura, humidade residual desejada, de modos pré-definidos para amostras já estudadas, entre outros parâmetros.

Há a possibilidade de se determinar em percentagem a massa seca, a humidade, etc. A determinação da humidade é feita através da medição inicial da massa da amostra à qual é subtraído o valor da massa no fim do tempo pré-determinado, resultando na determinação do valor da humidade uma vez que a quantidade de água presente foi eliminada pelo processo de evaporação devido ao calor gerado pela radiação infravermelha. Esta radiação não tem energia suficiente para promover transições eletrónicas mas apenas excitação eletrónica (na forma de vibrações).

$$\text{Humidade em \%} = \frac{\text{Massa perdida}}{\text{Massa inicial}} \times 100$$

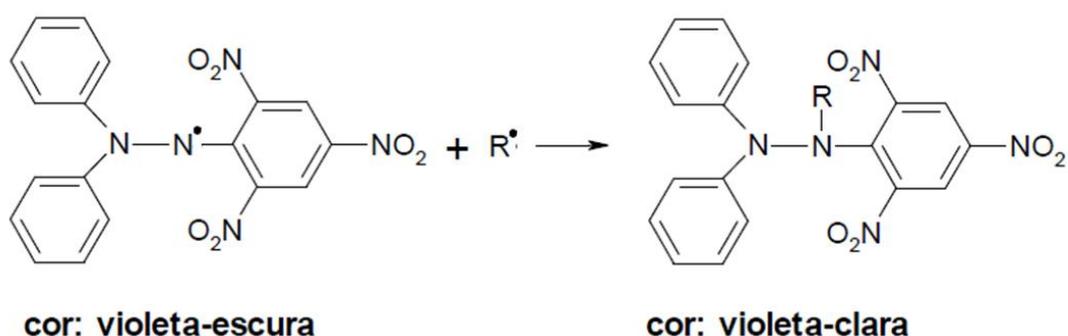
### **2.4. Atividade anti-radicalar**

Como metodologia indireta mais antiga para se determinar a atividade anti-radicalar surge o teste de DPPH, sendo proposto inicialmente na década de 50 para se descobrir os dadores de hidrogénio em matérias de origem natural. Posteriormente foi quantificado para a determinação do potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos bem

como amostras biologicamente relevantes. Nos últimos anos o método DPPH tem sido utilizado para avaliar a capacidade de sequestro do radical livre em produtos apícolas. Dada a rapidez e simplicidade do radical, este é preferido em relação a outros (CARPES, 2008). Também tem sido muito empregue na determinação da atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas tais como compostos fenólicos, fenólicos totais, flavonóis, fenilpropanóides, antocianinas, antocianidinas, cumarinas (LEJA *et al*, 2007), quitosana com diferentes pesos moleculares, rutina e caemferol (SILVA *et al.*, 2005). Foi usado largamente para rastreio preliminar de compostos capazes de capturar espécies de oxigénio ativo uma vez que são muito mais estáveis e mais fáceis de manusear do que radicais livres de oxigénio.

Positivamente, uma característica desse método é o não envolvimento de condições extremas quer de temperatura quer de oxigenação. O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um agrupamento (BORGES *et al.*, 2011).

Como método indireto que é, consiste na reação de DPPH em meio alcoólico, um radical orgânico livre estável, que aceita um eletrão ou um radical hidrogénio de um antioxidante para tornar-se uma molécula diamagnética estável, isto é, um não-radical DPPH-H (Figura 5). No final da reação, a quantidade de DPPH restante corresponde inversamente à atividade de sequestro do antioxidante em causa. Pode ser aplicado quer a substâncias polares como a substâncias apolares (ALMARAZ-ABARCA, 2004).

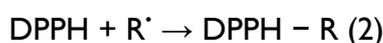


**Figura 5** – Estabilização do radical livre DPPH (RUFINO *et al.*, 2007).

A atividade anti-radicalar pode ser expressa em  $CE_{50}$ , ou seja, a concentração eficaz da solução em estudo necessária para diminuir em 50% a concentração inicial da solução de DPPH, isto é, a sua absorvância (abs), apesar de haver várias formas de expressar o resultado da ação antioxidante por esse método (MARGHITAS, 2009).

No ensaio de DPPH, os compostos antioxidantes vão reagir com um radical de azoto centralizado (difenil-picrilhidrazilo) que tem uma absorção característica a um comprimento de onda a 517nm, que oculta-se quando o hidrogénio do antioxidante é retirado, e é convertido em difenil-picrilhidrazina, a um ritmo muito rápido. A coloração violeta típica do radical muda para amarelo, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância, correspondendo ao produto reduzido a medida que se dá a reação, ou seja, quanto menos intensa é a coloração violeta da solução maior é a ação anti-radicalar. Partindo dos resultados obtidos determina-se a percentagem de atividade anti-radicalar ou sequestradora de radicais livres e/ou percentagem de DPPH remanescente no meio reacional. O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de degeneração e reatividade com a maioria dos compostos, o que faz com que apenas reagentes redutores fortes sejam capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico. A baixa absorvância indica atividade sequestrante de radicais livres (BORGES, 2011).

A reação do radical livre DPPH com um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>) ocorre de acordo com as equações 1 e 2:



Por outro lado, acredita-se que os antioxidantes impedem a cadeia de oxidação de radicais livres e doam hidrogénio do grupo hidroxilo fenólico, formando assim um produto final estável, que não inicia ou continua a propagar a oxidação lipídica.

Apesar do DPPH originar um resultado bastante similar à oxidação lipídica, a comparação quantitativa não pode ser feita uma vez que a reação com DPPH depende da conformação da estrutura dos compostos e também porque há reações muito específicas de determinados antioxidantes com o radical (BORGES *et al.*, 2011).

Este método revela que cada espécie de pólen possui um valor CE<sub>50</sub> característico, independentemente do local e época da colheita (CAMPOS *et al.*, 2003).

A monitorização da atividade anti-radicalar da matéria fresca e depois de sujeita à extração etanólica parte da intenção de se determinar a validade da matriz vegetal de modo a se verificar se houve ou não degradação e/ou alteração da mesma após manipulação. A ocorrência eventual de alteração no final do processo é indicada pelo valor da atividade anti-

radicalar o que permite estabelecer um padrão de qualidade e definir estratégias para um controle de modo haver garantias de qualidade quer do produto fresco quer do produto processado.

## 2.5 Espectrofotometria

A espectrofotometria UV-Vis é uma técnica analítica que permite determinar a concentração de um composto em solução. Baseia-se no fato da capacidade das moléculas absorverem radiações eletromagnéticas e, por sua vez, a quantidade de luz absorvida depende de forma linear da concentração. Para a determinação deste tipo de medidas emprega-se um espectrofotômetro em que se pode selecionar o comprimento de onda do feixe de luz que passa pela solução e medir a quantidade de luz absorvida pela mesma. O comprimento de onda das radiações que uma molécula pode absorver e a eficiência da absorção dependem do meio (pH, temperatura, força iônica, constante dielétrica). Quando a luz é absorvida pela molécula, origina-se um salto de elétrons de um estado energético fundamental para um estado de maior energia (estado excitado). Cada molécula tem uma série de estados excitados que a distinguem das restantes moléculas, o que faz com que o seu espectro de absorção seja distinto para cada uma. A molécula no estado excitado liberta energia até ao estado fundamental.

A medição da absorvância da luz pelas moléculas é efetuada em espectrofotômetros que são constituídos por: uma fonte de energia, um monocromador para a seleção das radiações de um determinado comprimento de onda, um compartimento de alojamento das células que contém as amostras (o vidro não transmite radiação pelo que não deve ser utilizado como material), um detetor e um amplificador que converte sinais luminosos em sinais elétricos, e um sistema de leitura de dados (LAMOGLIA, 2005).

Os métodos espectrofotométricos para determinação da atividade anti-radicalar são comparativamente simples baseando-se sistematicamente, na capacidade de descoloração da amostra. O ensaio recebe o nome do reagente cuja absorção será atenuada pelo antioxidante, ou seja, ensaio de DPPH. Reagentes estes responsáveis pelo fator custo do método fotométrico e que indicam a capacidade anti-radicalar total do produto no que diz respeito a sequestrar os radicais livres (BORGES, 2011).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Amostras

Foram utilizadas amostras frescas quer de pólen apícola como de pólen colhido diretamente das plantas.

##### 3.1.1.1 Locais de Colheita

As amostras de pólen foram colhidas, diretamente das plantas, entre as latitudes 39°1'3.51"N e 40°8'3.67"N e longitudes entre 7°26'53.91"W e 9°10'42.29"W, equivalendo à zona centro de Portugal.

**Tabela I** – Coordenadas dos locais de colheita do pólen diretamente da planta.

| NOME CIENTÍFICO                 | COORDENADAS   |               |
|---------------------------------|---------------|---------------|
|                                 | Latitude      | Longitude     |
| <i>Acacia dealbata</i> L.       | 40°8'3.67"N   | 7°31'26.74"W  |
| <i>Bignonia</i> sp              | 39°49'24.03"N | 7°27'16.37"W  |
| <i>Carpobrotus edulis</i> L.    | 38°51'48.38"N | 9°26'53.91"W  |
| <i>Coleostephus myconis</i> L.  | 39°49'20.43"N | 7°27'42.90"W  |
| <i>Crepis</i> sp                | 39°49'20.43"N | 77°27'42.90"W |
| <i>Digitalis purpurea</i> L.    | 39°49'15.12"N | 7°27'8.61"W   |
| <i>Galactites tomentosus</i> L. | 39°49'22.02"N | 7°27'24.01"W  |
| <i>Lavatera</i> sp              | 39°1'3.51"N   | 9°10'42.29"W  |
| <i>Ligustrum</i> sp             | 39°49'22.47"N | 7°28'1.21"W   |
| <i>Melaleuca</i> sp             | 39°49'18.72"N | 7°27'39.05"W  |
| <i>Olea europaea</i> L.         | 39°49'35.01"N | 7°27'26.60"W  |
| <i>Opuntia</i> sp               | 39°49'22.02"N | 7°27'24.01"W  |
| <i>Papaver rhoeas</i> L.        | 39°49'29.62"N | 7°27'15.25"W  |
| <i>Silybum marianum</i> L.      | 39°49'22.02"N | 7°27'24.01"W  |
| <i>Tilia</i> sp                 | 39°49'21.94"N | 7°27'37.63"W  |
| <i>Viburnum tinus</i> L.        | 39°49'21.59"N | 7°27'41.80"W  |
| <i>Zea mays</i> L.              | 40.18'28.02"N | 8.61'23.97"W  |

As amostras de pólen apícola correspondem a várias espécies de diferentes países, colhidos em vários anos<sup>1</sup> (*Brassica napus*, *Camellia sinensis*, *Cocos nucifera*, *Crepis sp*, *Eucalyptus globulus*, *Lotus sp*, *Olea europaea*, *Zea mays*).

**Tabela 2** – Países de onde foram colhidos os pólenes apícolas estudados.

| NOME CIENTÍFICO             | Países   |        |       |            |        |               |                   |
|-----------------------------|----------|--------|-------|------------|--------|---------------|-------------------|
|                             | Portugal | Brasil | China | Eslováquia | México | Nova Zelândia | Sultanato de Oman |
| <i>Brassica napus</i> L.    | X        | X      | -     | X          | -      | X             | X                 |
| <i>Camellia sinensis</i> L. | -        | -      | X     | -          | -      | X             | -                 |
| <i>Cocos nucifera</i>       | -        | X      | -     | -          | -      | -             | -                 |
| <i>Crepis sp</i>            | X        | -      | -     | -          | -      | X             | -                 |
| <i>Eucalyptus globulus</i>  | X        | X      | -     | -          | -      | -             | -                 |
| <i>Olea europea</i> L.      | X        | -      | -     | -          | -      | -             | -                 |
| <i>Zea mays</i> L.          | X        | X      | -     | -          | X      | -             | -                 |

### 3.1.1.2 Conservação

As amostras foram conservadas à temperatura ambiente (18-22°C) em local seco, fresco e ao abrigo da luz, ou no frigorífico (4°C) ou no congelador (-18 a -22°C). Em qualquer uma das condições de armazenamento não há alteração quer da morfologia quer da estrutura molecular dos compostos constituintes.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Microscopia Ótica

#### 3.2.1.1 Preparação das amostras

Cada amostra foi extraída com uma solução de etanol:água (na proporção de 1:1, 1 mL) num 1,5 mL em tubo Eppendorf durante 45 minutos. A extração foi auxiliada por vortex e, posteriormente, colocada em ultrassons (modelo DT 100, 35kHz) por 30 minutos. O material insolúvel foi separado através de centrifugação (4800 rpm por 5 minutos). A

<sup>1</sup> Tal como será discutido nos resultados, o ano da colheita não interfere no perfil dos extratos nem na estrutura dos compostos, pelo que foi possível usar matrizes de vários anos para comparação.

montagem do material foi feita em lâmina e lamela de microscópio. O sedimento foi extraído com uma micropipeta para uma lâmina devidamente identificada e datada. Uma gota da suspensão de grãos de pólen bem misturada foi aplicada sobre uma lâmina, coberta com uma lamela de 22 × 22 milímetros, e selada com verniz.

### **3.2.1.2 Análise das amostras ao microscópio**

Usou-se o microscópio Olympos BX51 com as ampliações 10, 40, 60 e 100x, e fotografaram-se com a máquina Olympos Digital acoplada ao microscópio.

## **3.2.2 HPLC/DAD**

### **3.2.2.1 Preparação dos extratos**

Os grãos de pólen de cada amostra foram pesados em uma balança após *tara* do *eppendorf* e assim registados os valores. Cada amostra foi extraída com uma solução de etanol a 50% (1:1, V/V) (na proporção de 10 mg de amostra:1 mL de solvente) num 1,5 mL em tubo *eppendorf* durante 45 minutos. A solução etanólica usada como solvente consegue extrair todos os tipos de flavonóides e derivados de ácidos fenólicos existentes no pólen, sendo possível obter um perfil completo dos mesmos quando as mesmas são analisadas por HPLC. A extração foi auxiliada por vortex (agitador) e, posteriormente, colocada em ultrassons por 30 minutos. O material insolúvel foi separado através de centrifugação (4800 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi imediatamente usado para injeção em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/DAD).

### **3.2.2.2 Hidrólise ácida**

A 5 mL da solução resultante do isolamento dos compostos principais (metodologia explicada a diante) foi adicionado 1 mL de água e 1 mL de HLC concentrado (37%) e colocou-se em banho-maria a 100 °C por 2h30 min. Ulteriormente, depois de arrefecida, foi

extraída com 2 mL de AcOEt em ampola de decantação. A fase orgânica foi então separada e concentrada em evaporador rotativo.

### 3.2.2.3. Determinação de perfis cromatográficos por HPLC/DAD

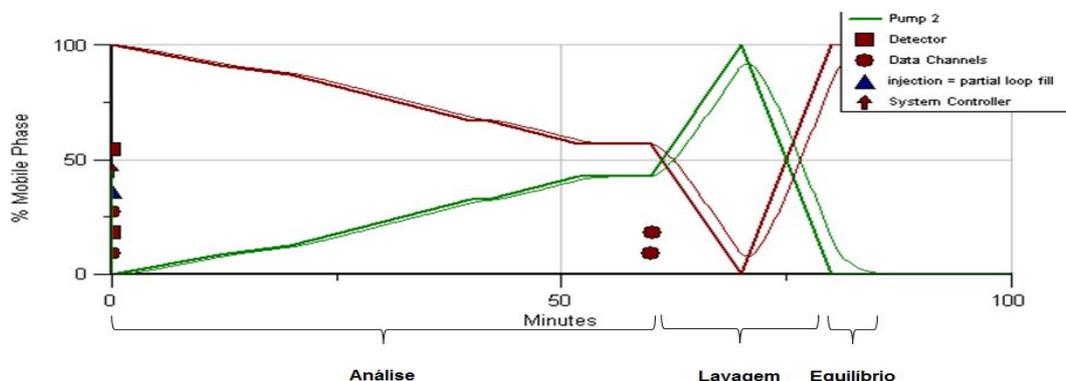
A identificação de cada *taxon* foi realizada *on-line* em HPLC acoplado a um detetor de fotodiodos (DAD - Gilson 170 diode array), e os perfis fenólicos foram comparados com uma base de dados de perfis de pólen.

A metodologia de HPLC/DAD foi, pela primeira vez, empregue ao estudo de produtos apícolas em 1990 por CAMPOS *et al.* onde se verificou que estes produtos eram ricos em compostos fenólicos, especialmente flavonóides (CAMPOS, 1997b).

Os extratos das amostras foram analisados num sistema HPLC constituído por um cromatógrafo (Gilson Electronics SA, EUA) formado por duas bombas (modelos 305 e 306), um misturador (modelos 811 B), um modelo manométrico (modelo 805), uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, fase C<sub>18</sub> (30x4mm i.d., 5µm; Macherey-Nagel, EUA), e coluna analítica Waters Spherisorb S5 ODS-2, partículas de 5 µm (4,6x250 mm) estabilizada a 25°C em forno modelo 7956, usando uma mistura eluente num gradiente de água-acetonitrilo, com um fluxo de 0,8 mL/min. Os cromatogramas-padrão foram registados a λ 260 e 340 nm (CAMPOS *et al.*, 1997a) e os dados espectrais recolhidos entre 220 e 400 nm (os espectros dos ácidos fenólicos e dos flavonóides em estudo estão todos nesta gama de absorção no ultravioleta). A análise dos resultados fez-se com software Unipoint System 2.1 que se encontra ligado ao detetor, e para a determinação estrutural de cada molécula recorreu-se às regras estabelecidas por CAMPOS e MARKHAM (2007).

Os solventes compreendem água destilada ajustada a pH 2,5 com ácido ortofosfórico e microfiltrada por filtros Milipore 0,22 µ (A) e acetonitrilo (B), usando um gradiente linear que começa com 100% de A, diminui para 91% durante os próximos 12 minutos, para 87% durante 8 minutos e para 67% durante 10 minutos. Depois de se manter o solvente nesta composição por 2 minutos, A diminui para 57% durante 10 minutos e depois mantém-se assim até o fim da análise (CAMPOS *et al.*, 1997a).

Tempo 0 a 60 minutos corresponde a Análise, tempo 60,01 a 80 a lavagem, e 80,01 a 85 minutos ao equilíbrio.



**Figura 6** – Gráfico síntese do gradiente de solventes em função do tempo da análise HPLC/DAD.

#### 3.2.2.4. Análise em Ressonância Magnética Nuclear

Para a elucidação estrutural completa, espectros de RMN foram realizados em aparelho Bruker AC a 300 MHz com compostos isolados, dissolvidos em DMSO-d<sub>6</sub>, com TMS como padrão interno a 30 ° C.

Para análise dos resultados recorreu-se a MARKHAM e GEIGER (1993).

#### 3.2.3 Determinação da Humidade

O processo de secagem por infravermelho foi feito utilizando um analisador de humidade Kern MLB 50-3 e otimizado para atingir uma humidade residual de cerca de 4%. Este é o valor de humidade considerado ideal não somente devido a redução da contaminação microbiológica mas também porque mantém o pólen com um aspeto agradável e atrativo (para comercialização).

Foram utilizadas alíquotas de 1g de pólen e secou-se a 50°C durante 10 minutos (FRIGERIO *et al.*, submetido para publicação).

### 3.2.4 DPPH

A avaliação da atividade anti-radicalar do extrato de pólen foi realizada através da capacidade sequestrante do radical livre difenil-picrilhidrazilo (DPPH) que foi medida usando um sistema espectrofotométrico. Os extratos etanólicos do pólen foram adicionados do radical estável DPPH numa solução de etanol a 95%. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogénio retirado de um composto antioxidante. 1 mL de solução de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  M em etanol a 95%) foi adicionado em tubo de ensaio a uma quantidade apropriada do extrato etanólico do pólen seguido de imediata homogeneização usando vortex. Depois de 10 minutos, foi registada a quantidade remanescente de radicais DPPH a  $\lambda$  517 nm. A referência padrão foi o ácido ascórbico com uma concentração eficaz a 50% ( $CE_{50}$ ) =  $1,5 \times 10^{-2}$  mM ( $R^2 = 0.9993$ ) (CAMPOS *et al.*, 2003).

#### 3.2.4.1 Preparação da solução de DPPH

Uma quantidade de 2,364 mg de reagente sólido de DPPH foi pesada em balança de elevada precisão em vidro de relógio previamente tarado. A diluição foi realizada para 100 mL de uma solução etanólica a 95% em balão volumétrico. A homogeneização foi realizada em ultrassons durante 30 minutos seguido de vortex por 5 minutos. Findo esse passo, a solução foi completada até aos 100 mL com solução etanólica a 95% e sujeita novamente a vortex por mais 5 minutos. Dado à sua instabilidade sob a ação da luz, a solução preparada foi transferida para um frasco de cor âmbar e rotulada devidamente.

A solução é perfeitamente estável durante 2 horas, tempo necessário para a realização dos ensaios de atividade anti-radicalar.

#### 3.2.4.2 Preparação do padrão ácido ascórbico

O padrão ácido ascórbico foi preparado pesando 66 mg em balança de elevada precisão e procedendo à diluição em 100 mL de solução etanólica a 95% em balão volumétrico.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudaram-se vários tipos de pólen sendo que a base de dados de referência foi executada com amostras colhidas à mão diretamente das plantas. As amostras selecionadas visavam por um lado estabelecer uma base de comparação dos perfis cromatográficos para identificação das espécies e para isso usaram-se as amostras que foram retiradas diretamente das plantas (tabela 1), cujos espécimes se encontram no herbário do Instituto Politécnico de Castelo Branco. Foram usadas neste trabalho e também na Tese de Mestrado que ainda se encontra em curso da aluna Marisa Serrano (Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar da Escola Superior Agrária de Castelo Branco), tendo sido ela que procedeu à colheita da maioria delas.

De todas as amostras, colhidas diretamente das plantas, que foram estudadas por HPLC/DAD apenas foram incluídas neste texto os resultados das que foram selecionadas com constituintes que, tendo um espectro de absorção no UV distinto, pressupõem para esta matriz vegetal compostos diferentes dos mais correntes glicosídeos de quercetina e caemferol. Selecionaram-se assim as espécies *Acacia dealbata* L., *Carpobrotus edulis* L., *Crepis* sp, *Lavatera* sp, *Melaleuca* sp, *Olea europaea* L., *Silybum marianum* L., *Tilia* sp e *Viburnum tinus* L. Todas as outras estão colocadas em anexo.

Outro grupo de amostras corresponde a matrizes vegetais que podem ser obtidas em larga escala, para poderem ser usadas com fins industriais, e em que se usam as abelhas como meio coletor. As amostras foram retiradas dos caça-pólenes à entrada das colmeias pelos apicultores ou pelos investigadores envolvidos na equipa, e correspondem ao que designamos por cargas polínicas. São provenientes do pólen apícola e tiveram origem em diferentes países. Quando as amostras eram misturas com diversas espécies florais, fez-se previamente a seleção pela cor o que pode ajudar no reconhecimento das espécies botânicas que compõem as várias amostras de pólen e normalmente corresponde a *taxa* diferentes. Foram estudadas várias amostras monoflorais mas apenas se selecionaram algumas, por exemplo, *Brassica napus* (Eslováquia), *Camellia sinensis* (China), *Cocos nucifera* (Brasil), *Eucalyptus globulus* (Portugal) e *Zea mays* L. (Brasil) (tabela 2). A razão desta escolha prende-se com o fato de serem as que potencialmente podem ser obtidas em larga escala, várias toneladas/ano.

#### 4.1. Análise do pólen por microscopia ótica

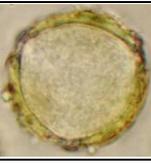
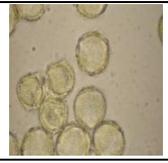
Várias técnicas laboratoriais são utilizadas para preparar os pólenes para observação microscópica e para a sua identificação. A dificuldade permanece na interpretação dos dados obtidos e na avaliação dos mesmos. Com recurso ao Atlas Polínico de Andalucia Occidental (VALDES *et al.*, 1987) e tendo uma ideia prévia de que plantas se tratavam fez-se uma primeira abordagem à identificação.

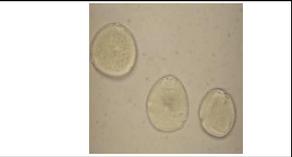
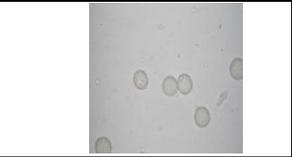
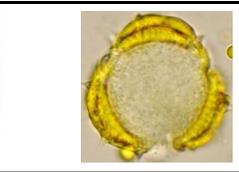
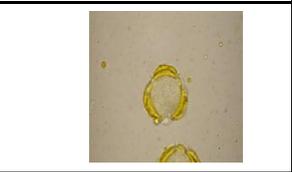
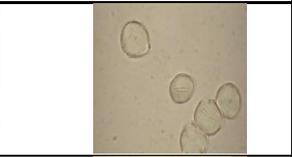
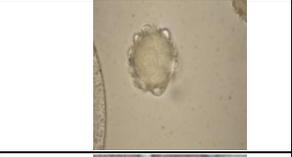
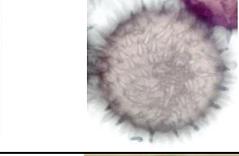
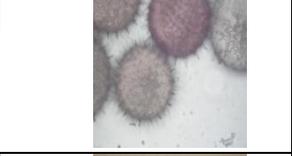
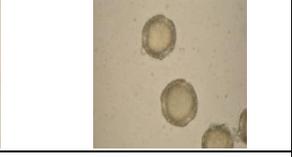
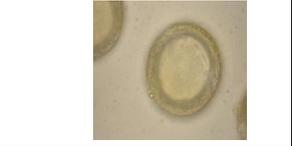
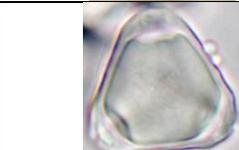
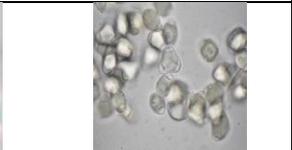
Como ponto de partida, a análise microscópica fornece a primeira abordagem para a identificação da origem floral do pólen. As principais características como tamanho, forma e ornamentações em comparação com os dados disponíveis publicados e o pólen colhido manualmente a partir da planta irá fornecer informações suficientes para concluir esta etapa.

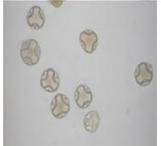
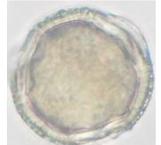
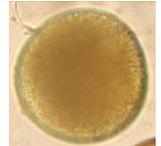
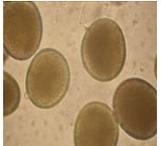
A título de exemplo, temos na tabela 3 as fotografias correspondentes a 21 amostras com as respetivas análises microscópicas. Foram colocadas todas ao mesmo tamanho por razões logísticas embora se tenham verificado as medidas de acordo com o Atlas atrás referido e estando em concordância com os dados bibliográficos. A proporção real dos tamanhos encontra-se na coluna da direita.

Depois de se ter a base de dados de referência, para as análises posteriores destas matérias-primas a observação microscópica também é realizada para a confirmação do taxon do pólen, isto é, sua origem botânica, embora a confirmação por HPLC/DAD seja quase sempre suficiente e mais precisa.

**Tabela 3** – Imagens das flores e microscópicas de pólenes estudados.\*

| NOME CIENTÍFICO           | IMAGEM  | MICROSCOPIA ÓTICA (Ampliação 100x)   | MICROSCOPIA ÓTICA (proporção real)  |
|---------------------------|---|--|---|
| <i>Acacia dealbata</i> L. |  |  |  |
| <i>Bignonia</i> sp        |  |  |  |
| <i>Brassica napus</i> L.  |  |  |  |

| NOME CIENTÍFICO                 | IMAGEM  | MICROSCOPIA ÓTICA (Ampliação 100x)   | MICROSCOPIA ÓTICA (proporção real)  |
|---------------------------------|---|--|---|
| <i>Camellia sinensis</i> L.     |    |    |    |
| <i>Carpobrotus edulis</i> L.    |    |    |    |
| <i>Cocos nucifera</i> L.        |    |    |    |
| <i>Coleostephus myconis</i> L.  |    |    |    |
| <i>Crepis</i> sp                |   |   |   |
| <i>Digitalis purpurea</i> L.    |  |  |  |
| <i>Galactites tomentosus</i> L. |  |  |  |
| <i>Lavatera</i> sp              |  |  |  |
| <i>Ligustrum</i> sp             |  |  |  |
| <i>Lotus</i> sp                 |  |  |  |
| <i>Melaleuca</i> sp             |  |  |  |

| NOME CIENTÍFICO            | IMAGEM  | MICROSCOPIA ÓTICA (Ampliação 100x)   | MICROSCOPIA ÓTICA (proporção real)  |
|----------------------------|---|--|---|
| <i>Olea europaea</i> L.    |    |    |    |
| <i>Opuntia</i> sp          |    |    |    |
| <i>Papaver rhoeas</i> L.   |    |    |    |
| <i>Silybum marianum</i> L. |    |    |    |
| <i>Tilia</i> sp            |   |   |   |
| <i>Viburnum tinus</i> L.   |  |  |  |
| <i>Zea mays</i> L.         |  |  |  |

\* As fotos dos flores foram retiradas do site <http://jb.utad.pt>, exceto as de *Crepis* e *Cocos nucifera* que foram cedidas por M. G. Campos.

#### 4.2. HPLC/DAD

De uma forma geral a abordagem através de perfis cromatográficos de flavonóides e compostos fenólicos tem-se mostrado muito mais precisa e também mais informativa relativamente à microscopia de pólenes. A caracterização bem como a abordagem das matrizes vegetais para rastreio de compostos bioativos utiliza a mesma metodologia.

No curso deste trabalho, esta técnica demonstrou ser mais conveniente quer qualitativa quer quantitativamente na identificação do taxon do pólen em causa, e ainda útil na caracterização dos constituintes predominantes do mesmo.

Através do gradiente usado, a eluição dos compostos fenólicos com tempos de retenção entre 25 e 60 minutos permitiu imediatamente a determinação do tipo de composto fenólico em causa. Dentro dos pólenes analisados, a deteção de picos no cromatograma a 260 e 340nm significava a existência de flavonóides (flavonas e flavonóis) e de alguns derivados do ácido cinâmico, quase sempre polímeros. Estes perfis foram suficientes para distinguir cada espécie do pólen apícola depois de comparado com as referências da base de dados executada no decurso deste trabalho e também com o material que já existia previamente no laboratório. Assim, os flavonóides, já reconhecidamente usados com marcadores quimio-taxonómicos de plantas em geral, são aqui também usados como marcadores das espécies florais que correspondem às amostras em estudo.

Com vista ao aproveitamento industrial do seu valor taxonómico, a atenção foi voltada para as estruturas dos flavonóides constituintes por fornecer caracteres químicos precisos para a caracterização e identificação das espécies do pólen mas essencialmente para que pudessem ser extraídos em larga escala e usados como mais-valia económica, por exemplo, para preparação de medicamentos.

As condições de extração dos constituintes do pólen, nomeadamente, a utilização de etanol a 50% deve-se ao fato desta concentração permitir que toda a gama de compostos de interesse, isto é, flavonóides livres, flavonóides heterósidos, ácidos fenólicos, etc., estejam representados no mesmo cromatograma ainda que não estejam na totalidade das suas concentrações, possibilitando assim uma melhor comparação e análise da amostra em causa. Tem ainda um menor impacto ambiental relativamente a concentrações superiores e a outros solventes. No fim do cromatograma surgem os compostos mais apolares e concomitantemente os de maior peso molecular, enquanto o início do cromatograma é representado por compostos mais polares e de menor peso molecular. Além destes aspetos, o fator económico surge como outro grande componente de peso, bem como a maior estabilidade de uma solução etanólica a 50% face ao etanol a 100% viabilizando um manuseio mais facilitado. A utilização de etanol a 100%, volatilizava-se mais rapidamente e apenas permitiria a extração de compostos menos polares, tais como, alguns flavonóides com seus heterósidos. Por seu turno, a utilização de água a 100% também condicionaria a extração a apenas alguns compostos mais polares.

Assim, ainda que o programa de análise definido para essa concentração de etanol seja extenso (60 minutos), há a possibilidade de se efetuar um rastreio completo de várias estruturas dos compostos em estudo, o que de outro modo exigiria a utilização de pelo menos 3 tipos de análises HPLC/DAD, uma para os ácidos fenólicos livres, outra para os combinados e possivelmente as geninas dos flavonóides, e ainda um terceiro para os heterósidos respetivos. No entanto, se houver ulteriormente um interesse acrescido por um componente específico do pólen que possa vir a ser utilizado no desenvolvimento de algum medicamento, há que definir um programa mais apropriado, tornando-se, claramente menor e conduzindo a uma análise mais específica e pormenorizada.

#### **4.2.1. Resultados cromatográficos obtidos com a análise HPLC/DAD**

A análise HPLC/DAD permitiu a determinação dos *taxa* presentes nas amostras de pólen apícola analisadas através do perfil cromatográfico e dos espectros no UV obtidos durante o *screening* que sugerem a subclasse de flavonóides analisados (HUBINGER, 2009), baseando-se de uma forma geral em tudo o que foi dito no início deste ponto 4.2.

Diferentes perfis de compostos fenólicos e polifenólicos foram obtidos através da análise dos extratos das várias amostras colhidas diretamente das flores e serviram de *fingerprints* de referência para a identificação das cargas polínicas pertencentes à diferentes *taxa*.

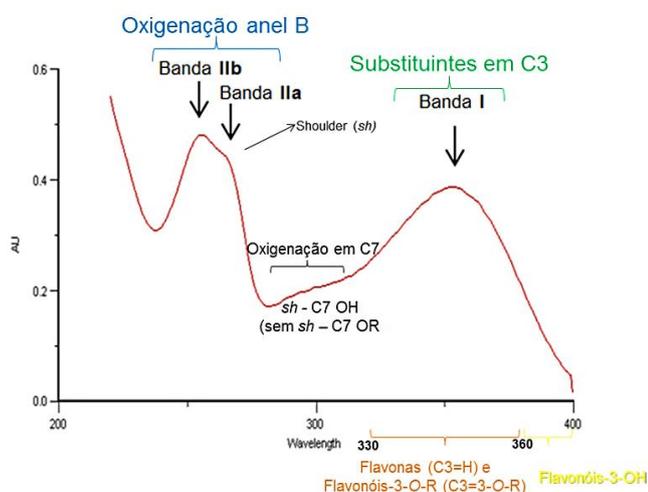
##### **4.2.1.1. Flavonóides**

A teoria ultravioleta desenvolvida por CAMPOS e MARKHAM (2007) foi de suma importância para desenhar a primeira abordagem às estruturas flavonóides dos compostos estudados.

De todas as amostras de pólen apícola correspondentes aos diferentes *taxa* estudados selecionaram-se para estudo mais detalhado as de *Camellia sinensis*, *Cocos nucifera* L. e *Zea mays* L. dada a elevada quantidade em que podem ser produzidas e porque contêm compostos do tipo herbacetina-3-R, isoramnetina-3-O-R e quercetina-3,7,4'- tri-derivada respetivamente. Sendo estes compostos menos usuais no pólen foram, em seguida, isolados por TLC e a análise de <sup>1</sup>H-RMN confirmou as estruturas de acordo com a hipótese anteriormente proposta usando as regras de CAMPOS e MARKHAM (2007) e os dados publicados na literatura, como mais à frente explicaremos para cada um deles.

Essas regras aplicadas aos compostos estudados envolvem evidência predeterminada como seguidamente se passa a explicar de uma forma geral para melhor entendimento dos resultados que iremos apresentar em cada *fingerprint*.

Os flavonóis e as flavonas apresentam absorção característica no ultravioleta com dois máximos de absorção, correspondendo a banda II a 240-285nm e a banda I a 300-400nm. Na banda II podemos avaliar de uma forma geral a oxigenação do anel B, enquanto a intensidade da banda I se deve essencialmente à substituição C3 do anel C (Figura 7), sendo também afetada quando há substituição no anel A, por exemplo em C6 ou C8.



**Figura 7** – Elucidação das bandas de absorção no espectro UV das flavonas e dos flavonóis.

Se o espectro ultravioleta apresenta duas bandas de absorção próximo de 250nm (banda II) e 350nm (banda I), significa que a estrutura principal pode ser uma flavona e/ou flavonol-3-derivado. A distinção entre eles é feita recorrendo à intensidade de absorção da banda I relativamente à banda II. Se a banda I é mais intensa que a banda II, em geral, é uma flavona (C3 com hidrogénio) e, se for o inverso, banda I menos intensa que a banda II é um flavonol-3-O-substituído, mas diferente de um OH livre. Os substituintes em C3 nestes casos são principalmente glicosídeos, mas os ácidos fenólicos também se podem ligar aqui. Nesta última situação a banda I poderá ser maior que a banda II e a forma será similar à do próprio ácido fenólico.

Outra importante regra compreende a forma da banda II (cerca de 250-285nm). Quando nas flavonas ou flavonóis falta uma substituição no anel B, ou possuem um anel B-4'-oxigenado, a banda II do espectro aparece como um único pico (por exemplo, apigenina a  $\lambda$  267nm e caemferol 3-O-derivados com  $\lambda$  265 nm). A introdução de uma oxigenação

adicional no anel B geralmente produz uma banda II desdobrada em banda IIa e IIb. Quase sempre uma é mais intensa que a outra sendo que a de menor intensidade aparece designada como *shoulder* e a outra é que tem a intensidade máxima, por exemplo, a luteolina e a quercetina-3-O-derivados com  $\lambda$  254-266sh e 255-267sh respectivamente. Se se der a situação inversa, em que a banda IIa pode aparecer mais intensa e o *shoulder* do lado do comprimento de onda da banda IIb, uma possível substituição em C6 ou C8 (anel A) ou em C3' (anel B) são as possibilidades mais prováveis.

Se há uma correspondência exata para o espectro, mas o Tempo de Retenção (TR) é diferente, então é provável que o composto desconhecido difira do composto referência apenas no número ou natureza dos açúcares ligados ao local da glicosilação, ou na natureza da substituição. Por exemplo, O-metilo em comparação com O-etilo, ou a presença/ausência de um grupo acilo alifático no açúcar. Se o composto desconhecido eluiu mais rapidamente do que o composto referência (isto é, tem um menor TR), em seguida, dado que a fase sólida cromatográfica é não polar em relação ao solvente polar, isto indica que o desconhecido é mais polar (por exemplo, contém mais açúcares ou um açúcar de polaridade mais elevada). Por outro lado, se o composto desconhecido eluiu mais lentamente do que a referência (isto é, um TR superior), é neste caso menos polar (por exemplo, contém menos açúcares ou um açúcar de menor polaridade ou então contém um grupo acilo alifático). No caso em que nenhuma correspondência exata para o espectro de absorção pode ser encontrada entre os espectros de referência, uma estreita correspondência pode indicar que o composto desconhecido está relacionado com a referência, talvez com o mesmo padrão de oxigenação, mas com um padrão de substituição diferente. Se o espectro apresentar ainda um *shoulder* entre 280-310nm, é porque pode haver um 7-OH livre e se pelo contrário, este não existir, quase de certeza há uma 7-O-substituição que é geralmente uma glicosilação. Quando há substituições em C6 ou C8, por vezes desaparece este *shoulder* mas é um falso positivo, ou seja, o que acontece é que as glicosilações nesses locais projetam-se espacialmente sobre o OH em C7, parecendo que está substituído (CAMPOS e MARKHAM, 2007).

Como se pode ver nas figuras nº 8 a 21 os perfis cromatográficos permitiram usar os espectros de cada um dos constituintes separados para avaliar os dados correspondentes à absorção UV e a partir daí determinar as respectivas estruturas segundo a teoria atrás descrita.

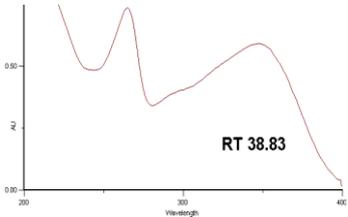
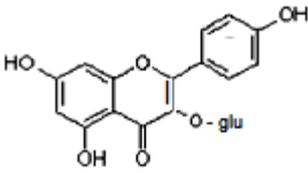
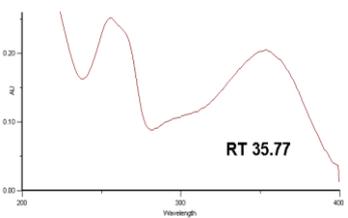
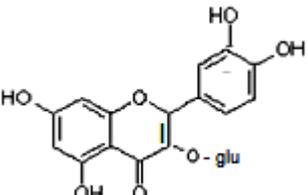
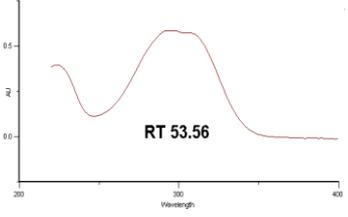
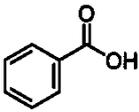
Foram também identificadas as estruturas através da observação do espectro de absorção UV com uma ocorrência menor nos extratos analisados. Em baixo elucidam-se os

compostos através do seu espectro de absorção UV, da sua estrutura química e ainda informação sobre o cromatograma respetivo e a espécie em causa.

Em nenhum dos casos se especula sobre o tipo de oses que substituem as estruturas dos flavonóides porque na generalidade quando são utilizadas por via oral sofrem hidrólise e ulterior conjugação por metilação, glucuronização e/ou sulfuronização no ciclo entero-hepático pelo que é arbitrário o tipo de estrutura osídica em questão (CLIFORD e BROWN, 2006). No entanto, recentemente SOUZA *et al.*, 2013 determinaram que o tipo de oses era importante na interação do modelo de ligação entre da G-proteína do “human respiratory syncytial virus” (HRSC) e os flavonóides, pelo que acaso alguma destas estruturas possa vir a ser escolhida para a situação supracitada deverá ser feita a identificação da cadeia glucídica.

De uma forma geral, a maioria dos constituintes nas amostras correspondem aos espectros de caemferol-3-O-glicosídeo ou quercetina-3-O-glicosídeo para além de polímeros de ácidos fenólicos cujos espectros de absorção no UV e estrutura química se demonstram na tabela a seguir (tabela 4).

**Tabela 4** – Informação sobre os compostos mais comumente encontrados nas amostras analisadas.

| Espectro de absorção no UV  | Estrutura química  | Nome                                   |
|---|--|--|
|  |  | Derivado 3-O-glicosilado do Caemferol  |
|  |  | Derivado 3-O-glicosilado da Quercetina |
|  |   | Derivado do ácido fenólico             |

A importância do estudo destes extratos era procurar apenas estruturas que fogem do padrão normal de absorção e que, para isso, podem corresponder a compostos novos e/ou raros na natureza.

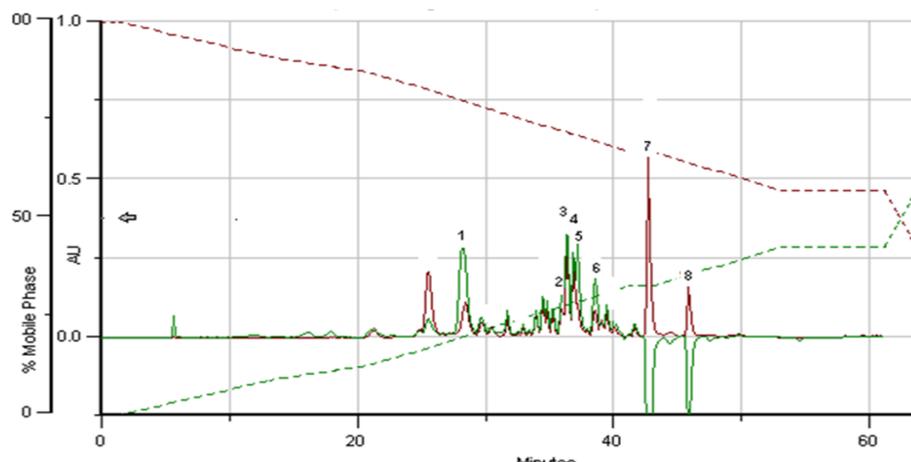
Os que atrás referimos já foram suficientemente estudados e não é pertinente a sua avaliação uma vez que existem bastantes dados sobre eles. Quanto aos outros, neste trabalho foram apenas discutidas hipóteses de estruturas químicas e para alguns foram ainda feitas pesquisas de possível bioatividade consoante o tipo de moléculas em causa (capítulo 2).

Para continuar a investigação, apenas as amostras *Camellia sinensis* e *Zea mays* L. das quais tínhamos material vegetal suficiente foi feito o isolamento de compostos provavelmente com estruturas diferentes dos flavonóides mais disseminados na natureza.

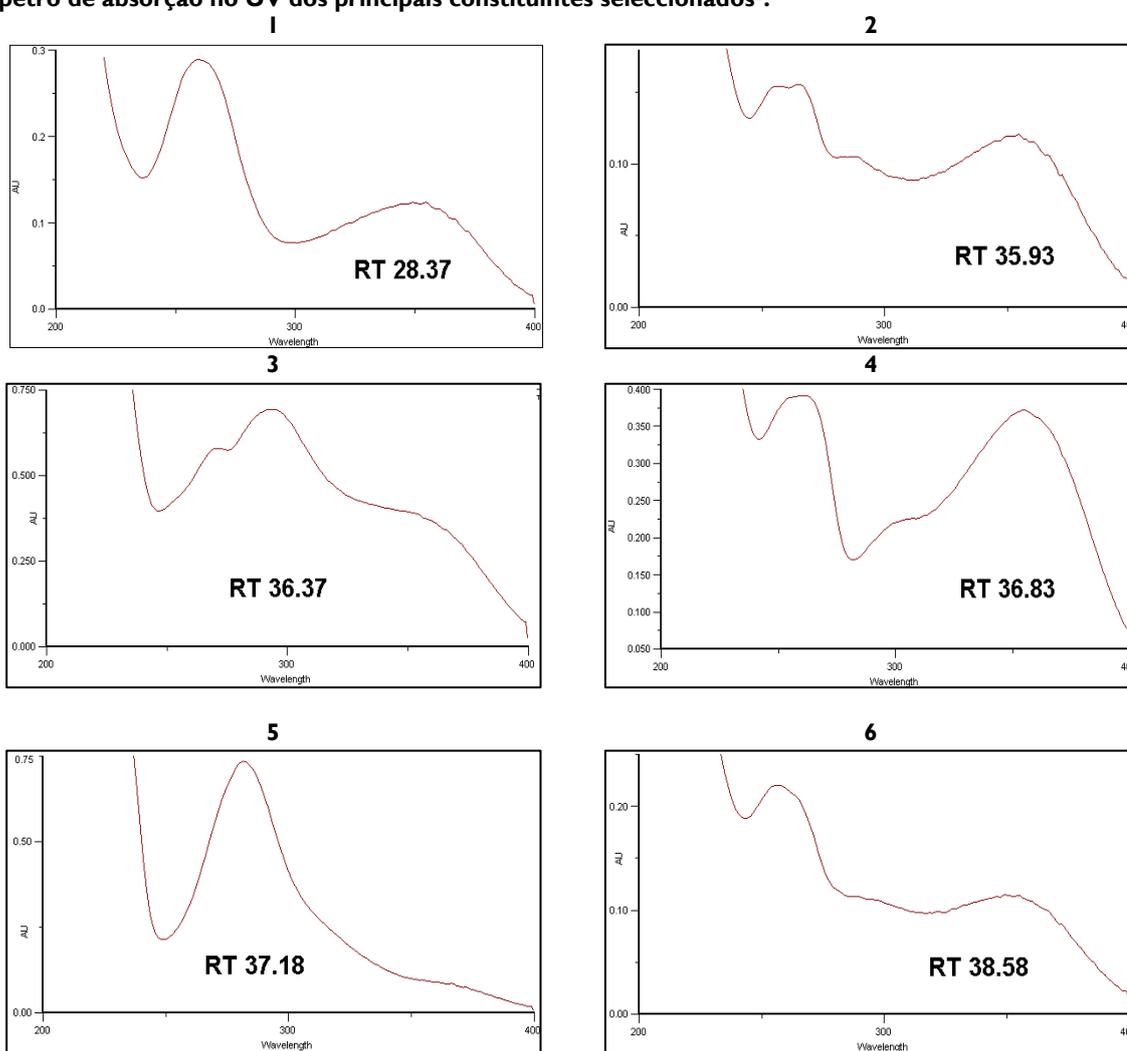
As amostras *Cocos nucifera* e *Zea mays* L. contêm derivados da isoramnetina embora no caso do *Zea mays* L. também apresente derivados da quercetina que para além da substituição em C3-O-glucósido também se apresenta substituído em 7 e 3' e foram, por isso, selecionados para os estudos de bioatividade.

Para a atividade terapêutica o tipo de oses das glicosilações é indiferente uma vez que estas são hidrolisadas no intestino, contudo, a posição na molécula é importante já que a glucuronização e/ou sulfuronização vão ocorrer nesses hidrolisados.

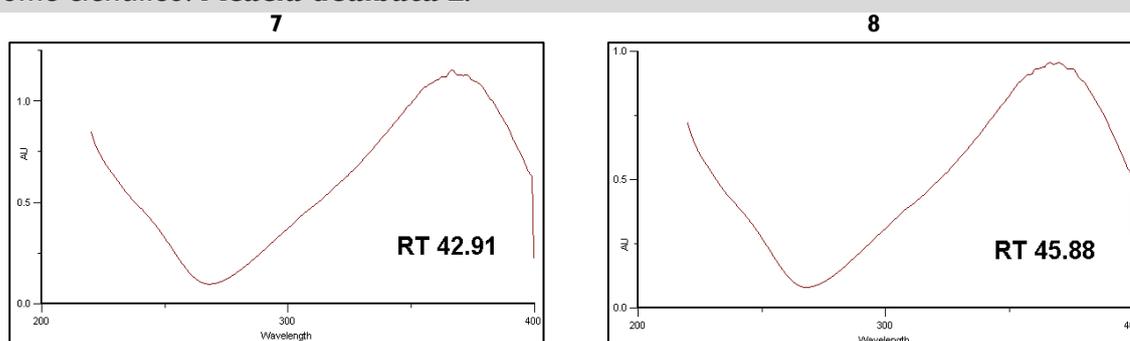
De seguida apresentam-se nas figuras 8 a 20 *fingerprint*s de 13 espécies florais e respetivos flavonóides.



Espectro de absorção no UV dos principais constituintes seleccionados<sup>2</sup>:



<sup>2</sup> A selecção fez-se retirando todos os espectros mais vulgares de compostos das várias espécies de pólen analisadas e que na generalidade correspondiam a derivados 3-O-glicosilados de caemferol e de quercetina dado que são muito frequentes na natureza e também em outras matrizes vegetais. Também não se deu relevância aos derivados dos ácidos fenólicos pela mesma razão, à exceção dos derivados do ácido cafeico existentes no pólen de *Camellia sinensis* pois, à semelhança dos flavonóides que foram seleccionados nas outras espécies de pólenes, apresentava um espectro ultravioleta invulgar.



**Figura 8** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Acacia dealbata*.

Os compostos 1 e 3 são desconhecidos uma vez que não há informação sobre os mesmos na literatura, embora o 1 tenha um espectro com as bandas I e II dos flavonóides mas a I está demasiadamente baixa relativamente a II.

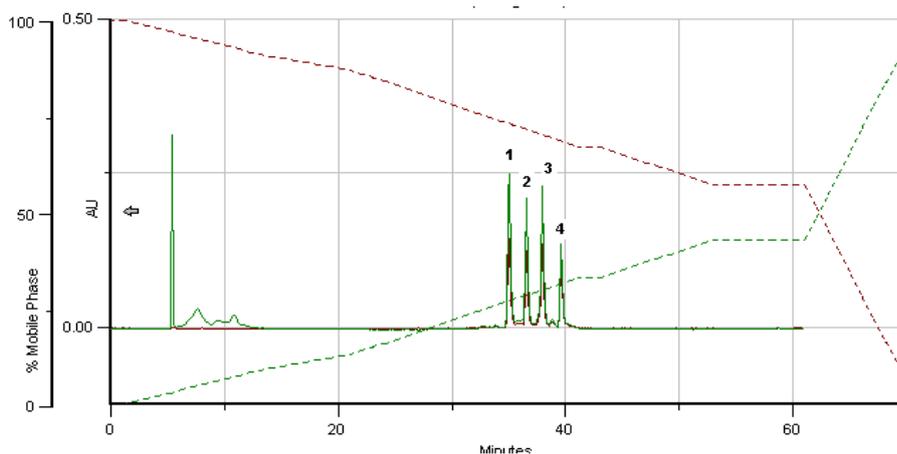
O composto 2 é uma quercetina-3-O-substituída possivelmente em C6 ou em C8. Tem as mesmas bandas do composto 1 mas aqui a proporção entre elas é típica de uma substituição em C3 e o desdobramento da banda II,  $\lambda$  255, 264 sh nm revela a existência da substituição 3', 4' no anel B, sendo que o *shoulder* na banda IIb indica possível substituição em C6 ou C8.

O composto 4 é uma miricetina-3-O-R. O *shoulder* entre 280-310nm é indicativo de C7-OH livre, a não definição de picos da banda II deve-se ao 3', 4', 5'-OHs.

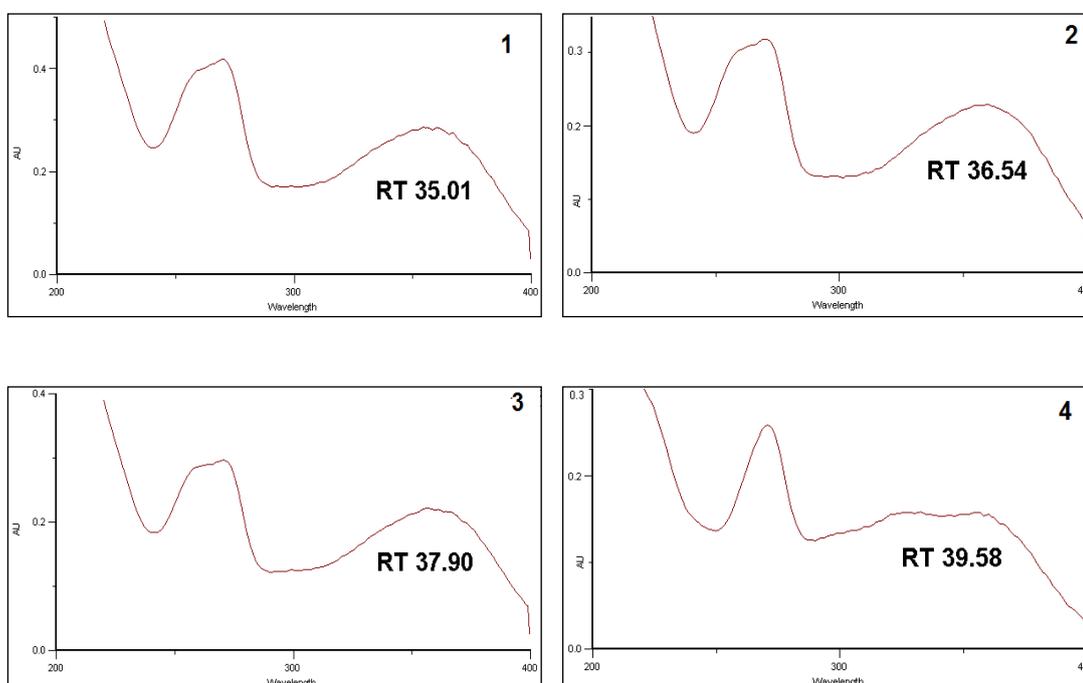
O composto 5 é um dihidroflavonóide.

O composto 6 é uma quercetina-3-O-substituída mas em que alguma influência está a ser exercida sobre a intensidade da banda I que está mais baixa que o normal, o que também se verifica no composto 1.

Compostos 7 e 8 – atendendo a que este espectro é típico das chalconas e que COSTA (2011) determinou a estrutura da naringenina-chalcona no pólen de *Olea europaea* exatamente com o mesmo aspeto de absorção no UV neste caso estas duas estruturas devem pertencer a este mesmo constituinte mas derivatizado com radicais mais polares, provavelmente oses, uma vez que têm TR bastante menores (cerca de 8 minutos).



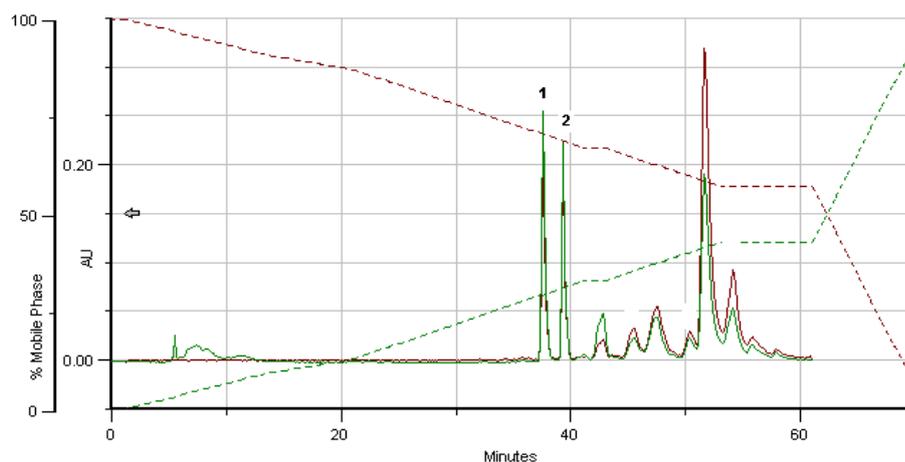
**Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:**



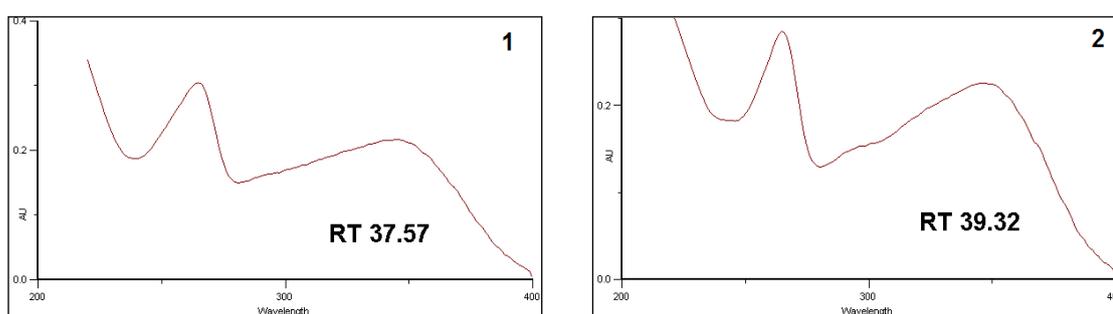
**Figura 9** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Altheia rosea*.

Os compostos 1, 2 e 3 são 3,7-*O*-di-substituídos da quercetina, apresentando a banda I a 356nm e com intensidade inferior a banda II para 3-*O*-substituição da quercetina, ao que se acrescenta ausência total de absorção entre 280-310nm que corresponde a substituição em C7. Uma vez que a banda IIa tem maior intensidade que a banda IIb provavelmente estas estruturas podem estar substituídas em C6 ou C8.

O composto 4 corresponde a um espectro típico de uma herbacetina e comparando com a tabela de TR de CAMPOS e MARKHAM (2007) poderá estar di-substituído em C3 por duas oses.



**Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:**

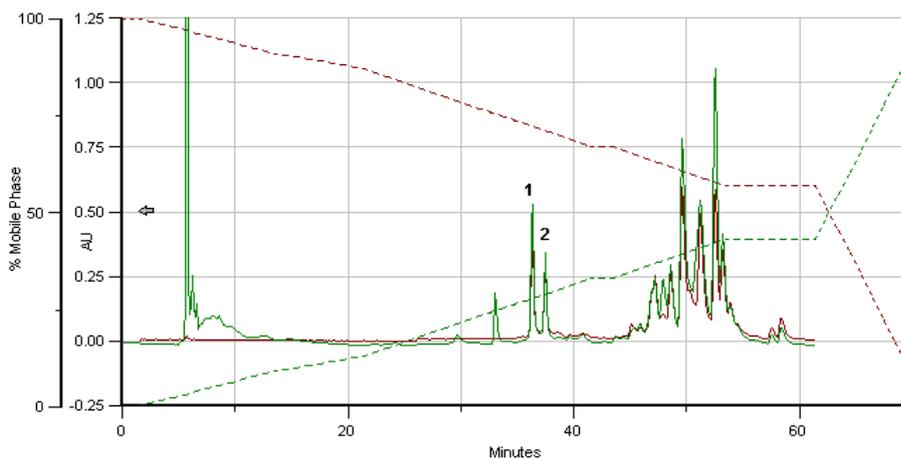


**Figura 10** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Brassica napus*.

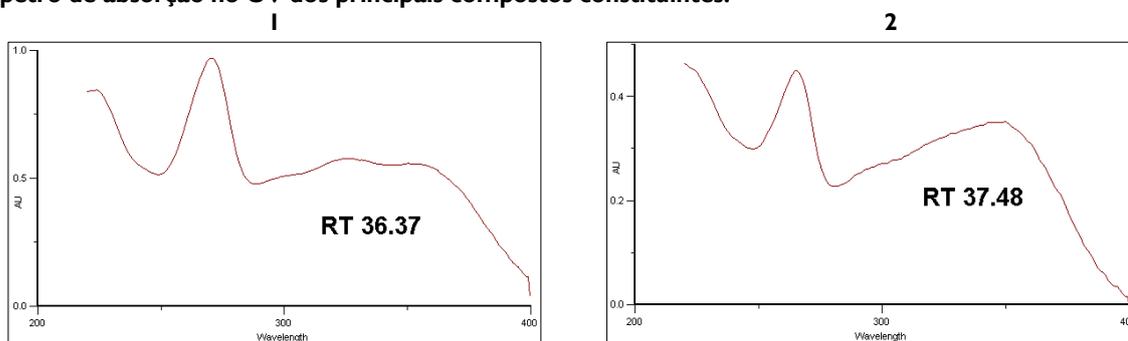
Os compostos 1 e 2 são 3-O-derivados do caemferol. Apresentam a banda II com uma absorção única típica de um OH em 4' no anel B, e com maior intensidade que a banda I que se apresenta a 347nm característica da substituição em C3.

O composto 2 apresenta *shoulder* entre 280-310nm correspondente a hidroxilação em C7 livre. Comparativamente, no composto 1 não é clara esta zona do espectro pelo que poderá haver algum substituinte a influenciá-la.

Os compostos restantes são todos derivados do ácido fenólico.



Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:

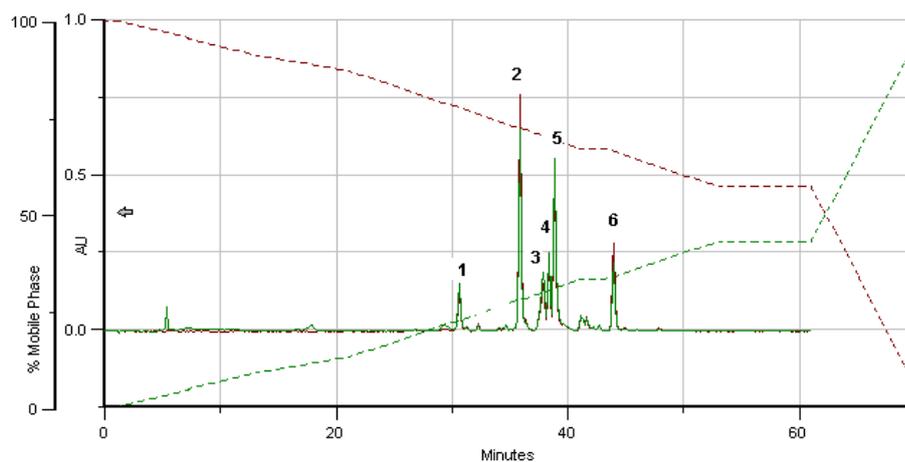


**Figura 11** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Camellia sinensis*.

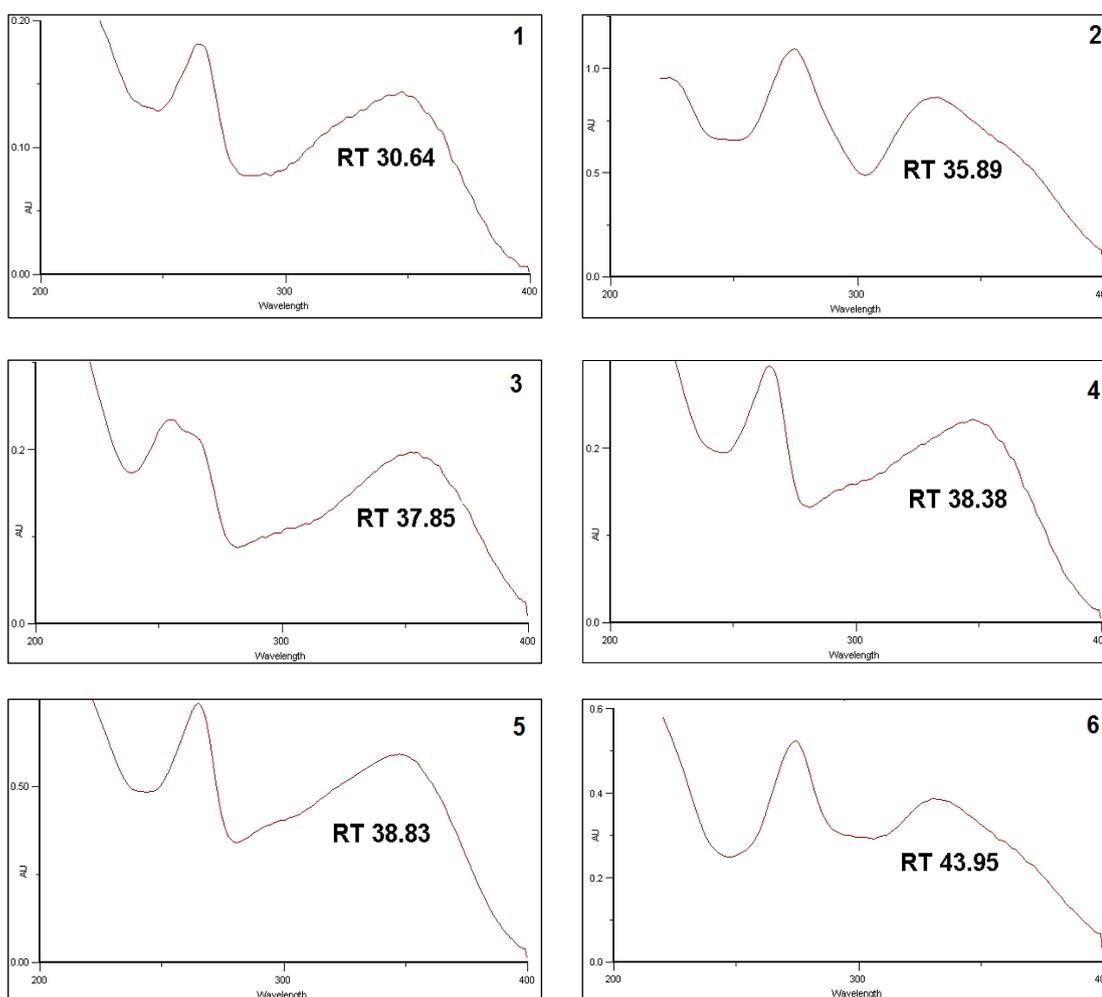
O conteúdo em flavonóides é baixo sendo o composto 1 um derivado da herbacetina-3-O-substituída.

O composto 2 é um 3-O-derivado do caemferol.

Todos os outros são derivados de ácidos fenólicos.



**Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:**



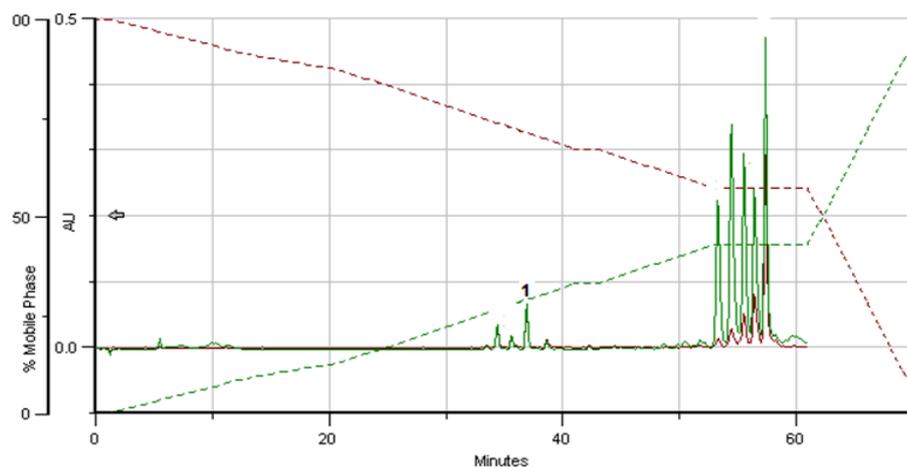
**Figura 12** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Carpobrotus edulis*.

Composto 1, 4 e 5 são do 3-O-derivados do caemferol com as bandas características a 265nm e a 350nm com *shoulder* do C7-OH livre nos compostos 4 e 5 e ausência do mesmo para o composto 1, indicativo de substituição nessa zona da molécula.

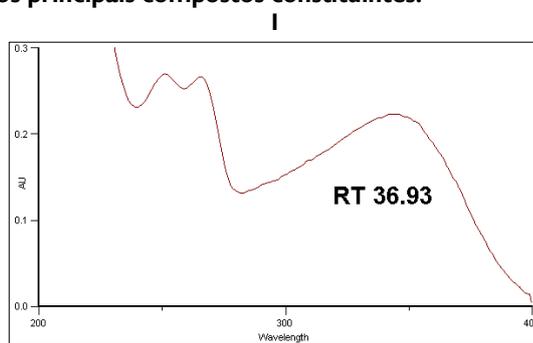
O composto 2 tem um vale a 300nm característico das flavonas substituídas em C6 com ausência de OH no anel B. As duas bandas de absorção a 274,1 e 331,3nm com maior intensidade da banda II relativamente a banda I assemelham-se ao padrão de absorção da baicaleína. Comparando os TR dever ser um diglicosídeo da baicaleína. No caso do composto 6 em que o padrão de absorção embora similar não é igual, revela que pode haver substituições em C7 porque a alteração localiza-se na zona do vale entre 290-305nm.

O composto 3 como já foi referido anteriormente para espectros similares é um 3-O-derivado da quercetina.

Nome científico: ***Crepis sp***

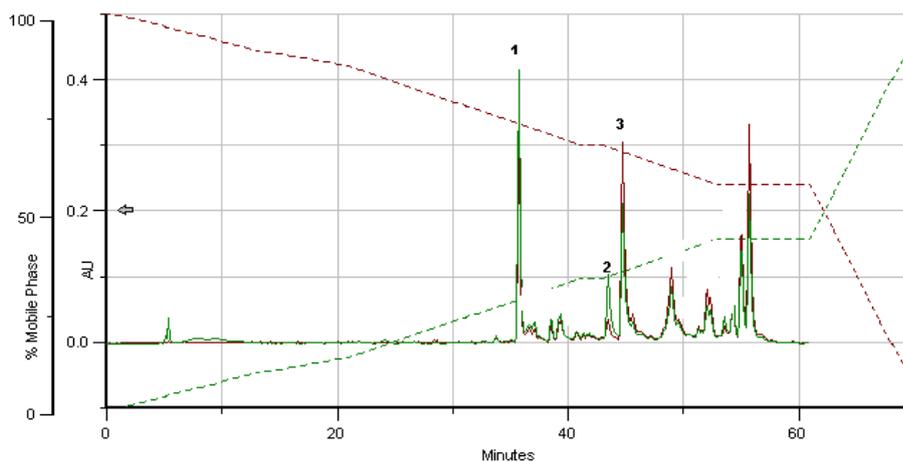


Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:

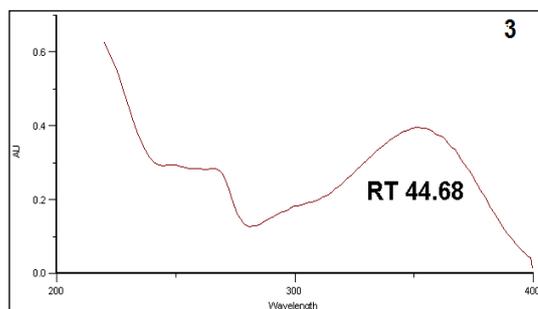
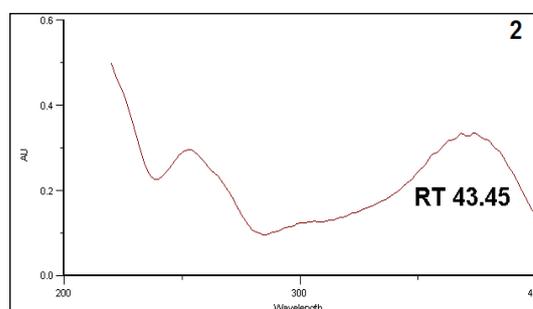
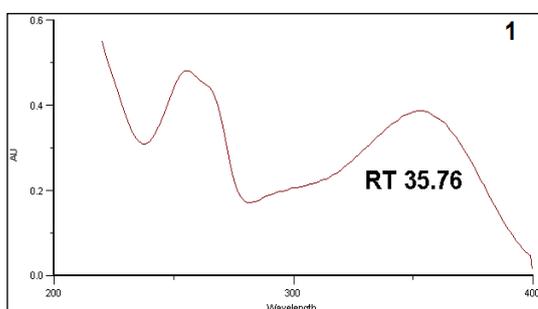


**Figura 13** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Crepis sp*.

O composto I é um derivado da quercetina-3-O-glicosilada e todos os outros são derivados de ácidos fenólicos.



Espetro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:



**Figura 14** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Eucalyptus globulus*.

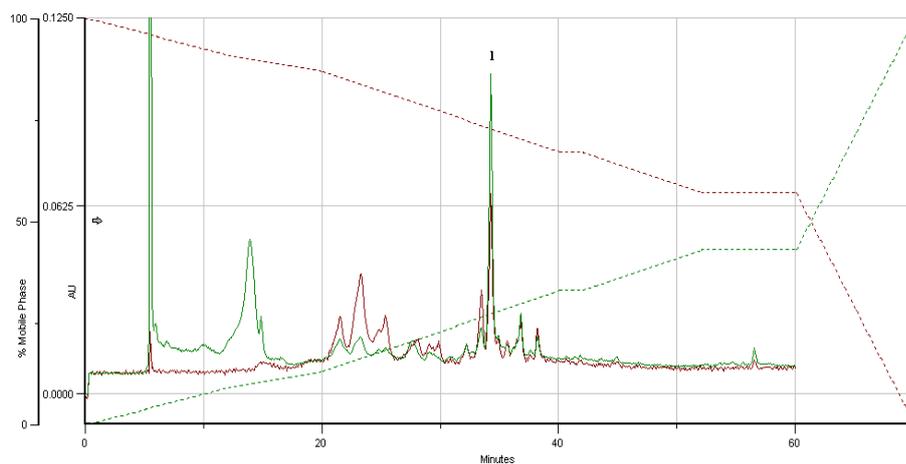
O composto 1 é a quercetina-3-O-soforósido.

O composto 2 é um miricetina.

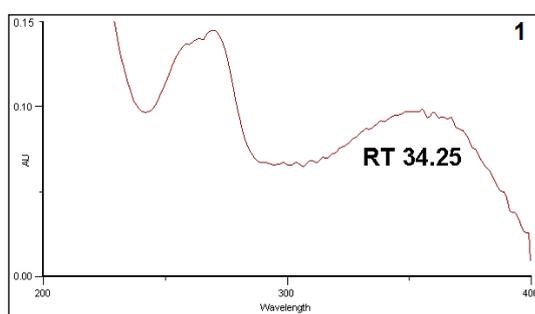
O composto 3 é uma tricetina (CAMPOS, 1997b).

Todos os outros compostos relevantes em termos de concentração são derivados de ácidos fenólicos.

Nome científico: **Lavatera sp**



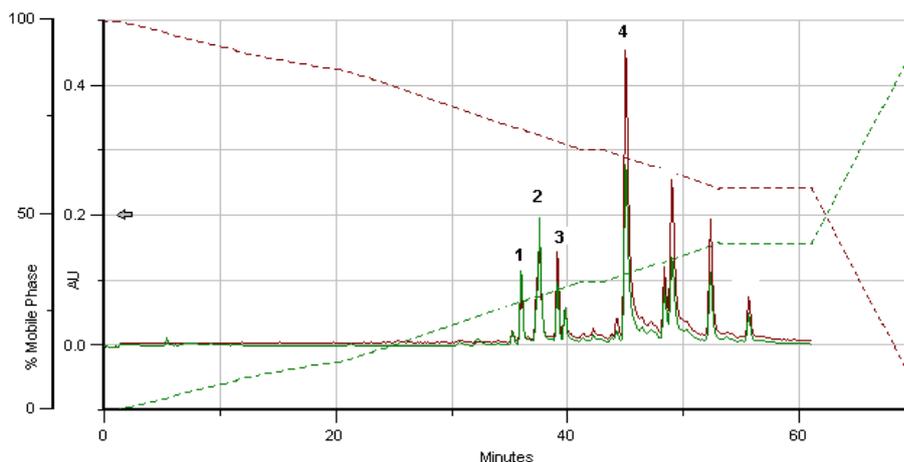
Espetro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:



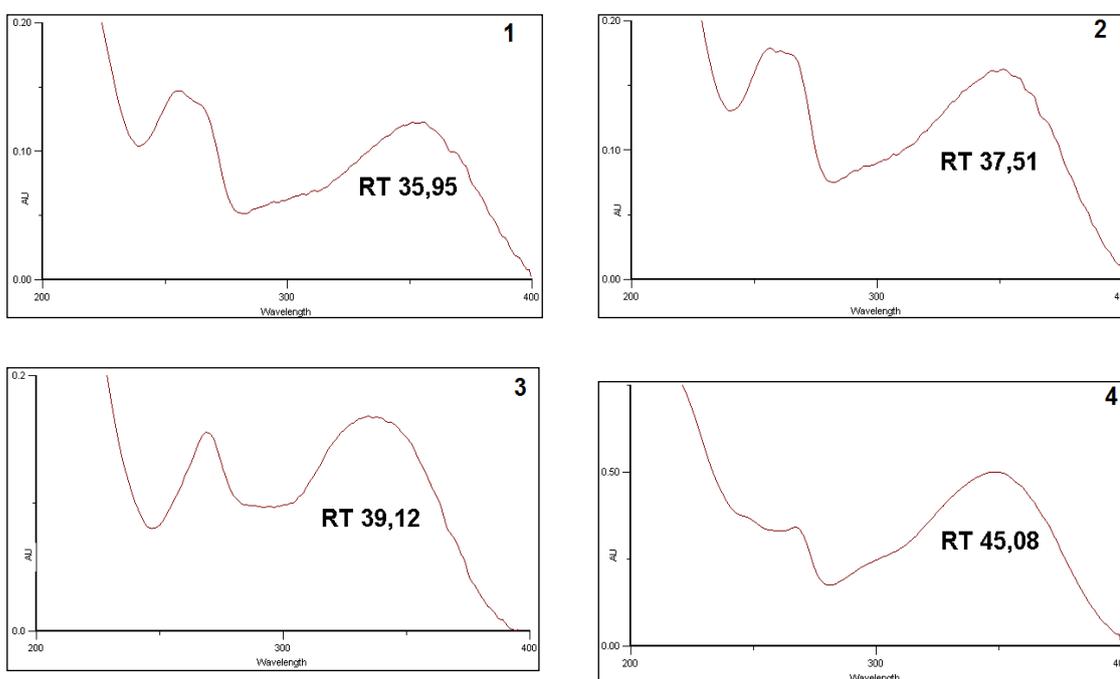
**Figura 15** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Lavatera sp*.

O composto 1 é possivelmente 3,7-O-R quercetina substituída em C6 ou C8.

Nome científico: **Melaleuca sp**



**Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:**



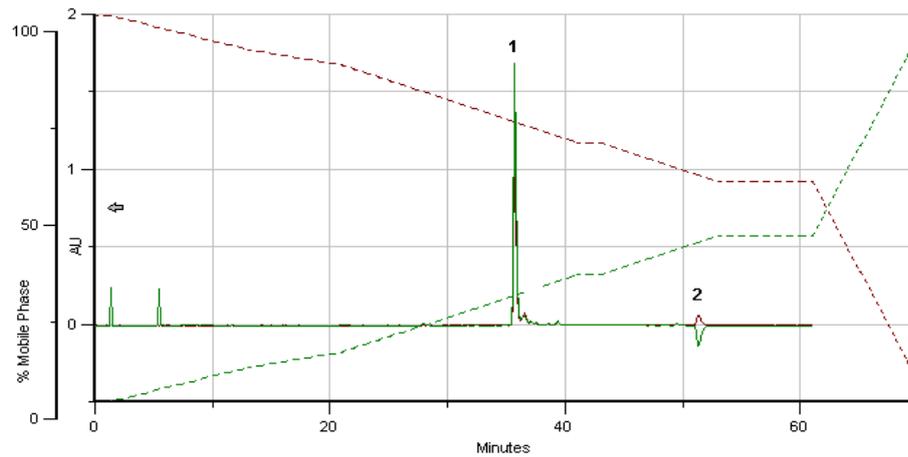
**Figura 16** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Melaleuca sp*.

O composto 1 é a quercetina-3-O-soforósido e o composto 4 a tricetina. Ambos característicos das Myrtaceas, tal como anteriormente no *fingerpint* do *Eucalyptus globulus* (CAMPOS *et al.*, 2002).

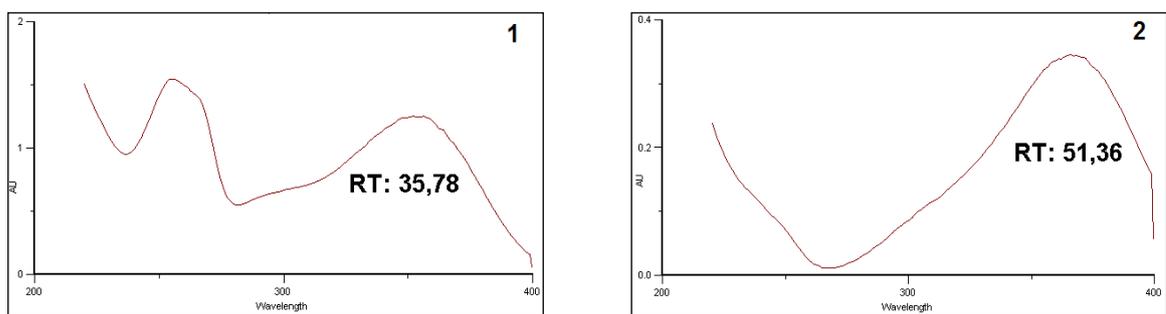
O composto 2 é também uma quercetina-3-O-R.

O composto 3 tem uma absorção típica da apigenina-7-O-substituída.

Nome científico: ***Olea europaea* L.**



Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:

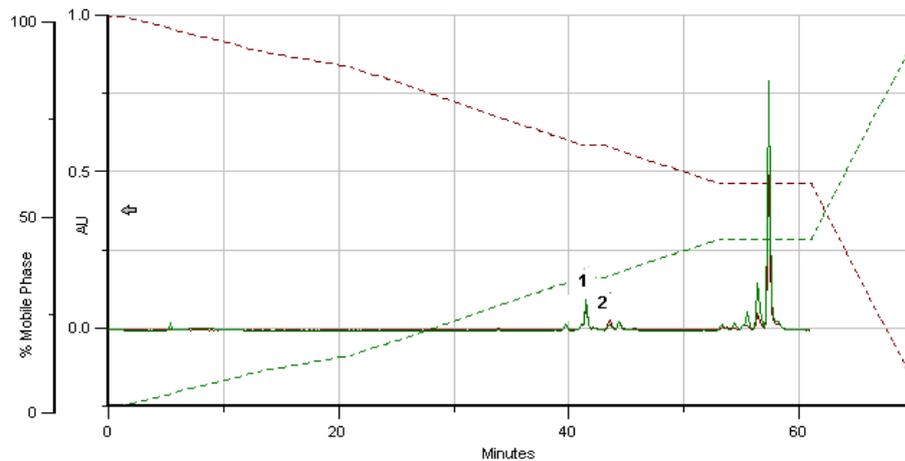


**Figura 17** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Olea europaea* L..

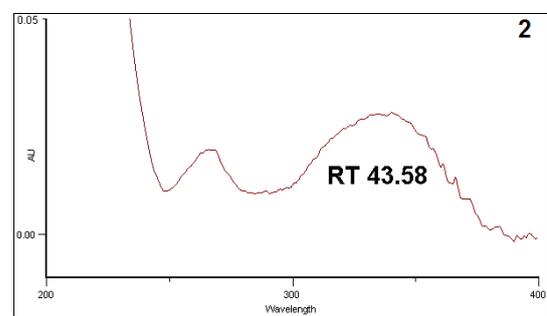
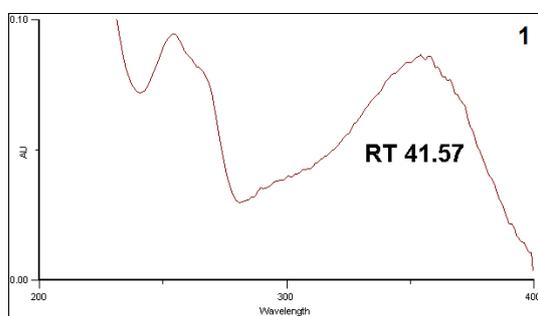
O composto 1 é uma quercetina-3-O-R.

O composto 2 é uma naringenina-chalcona (COSTA, 2011).

Nome científico: **Silybum marianum**



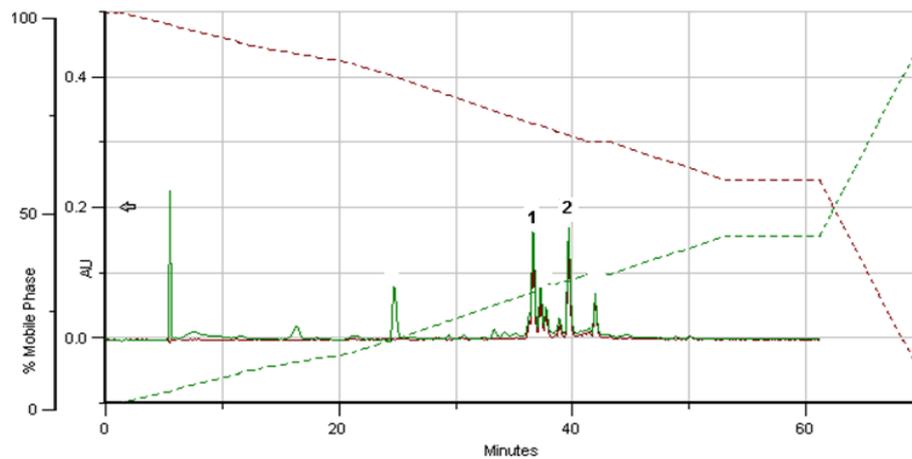
**Espetro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:**



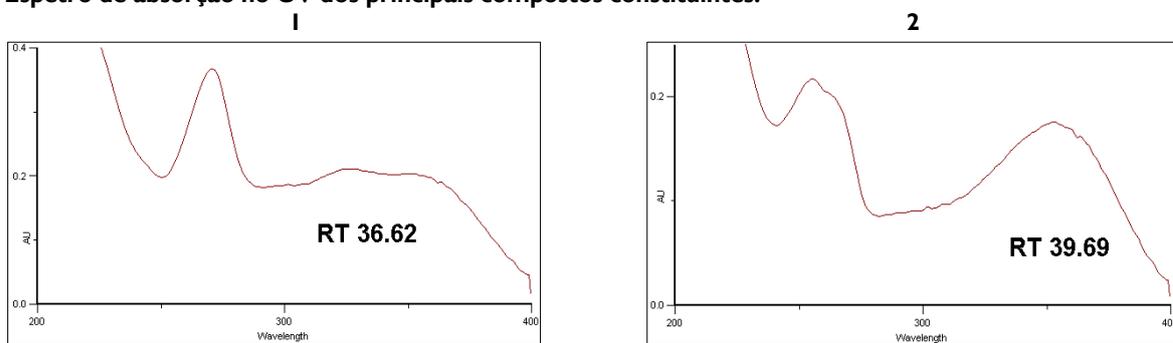
**Figura 18** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Silybum marianum*.

O composto 1 é uma isoramnetina 3-O-glicosilada, certamente igual ao composto 3 existente no pólen de *Cocos nucifera*.

O composto 2 é uma apigenina-7-O-substituída.



Espetro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:

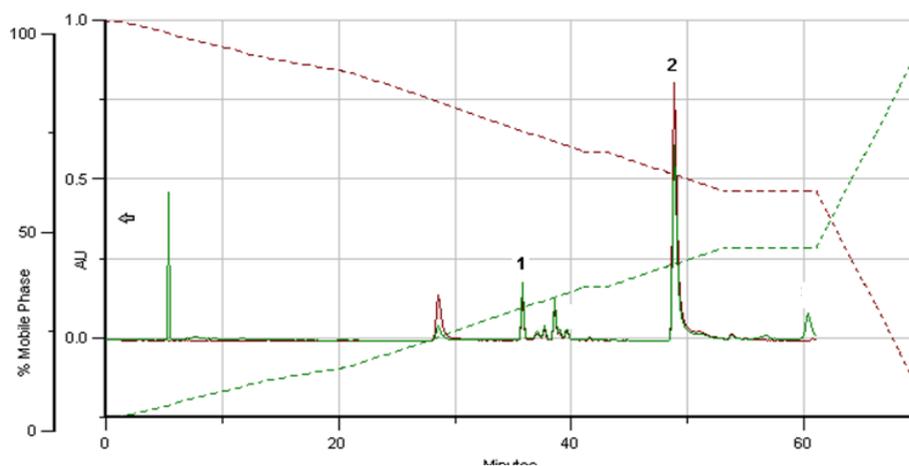


**Figura 19** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Tilia sp*.

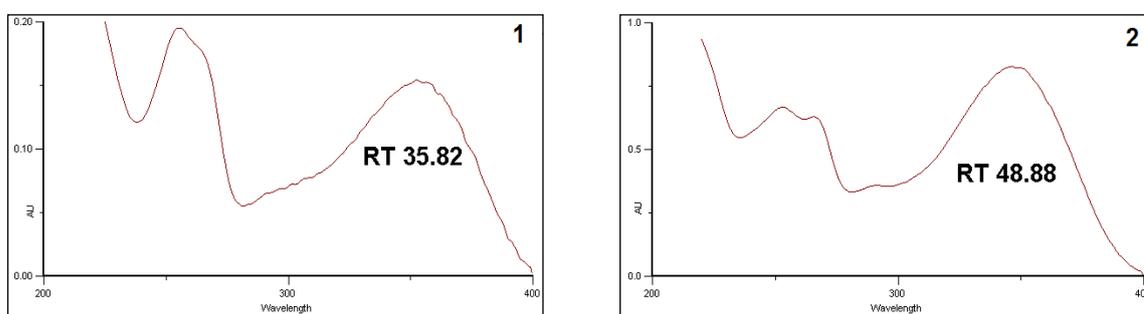
O composto 1 é um derivado da herbacetina-3-O-glicosilada.

O composto 2 é um derivado da quercetina-3-O-R com possibilidade de ter o 7-O-substituído dada a ausência de sh entre 280-310nm.

Nome científico: **Viburnum tinus L.**



**Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:**



**Figura 20** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Viburnum tinus L.*

O composto 1 é uma quercetina-3-O-R possivelmente um sofrósido, tal como, para o *Eucalyptus globulus* e na *Olea europaea*.

O composto 2 é uma diosmetina.

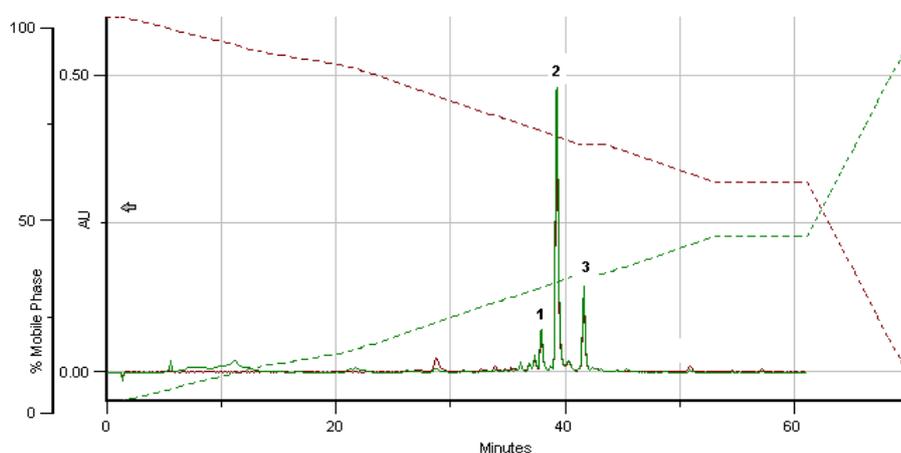
# Cocos nucifera

(O material que abaixo se descreve integrou o artigo BARRETO *et al.*, submetido).

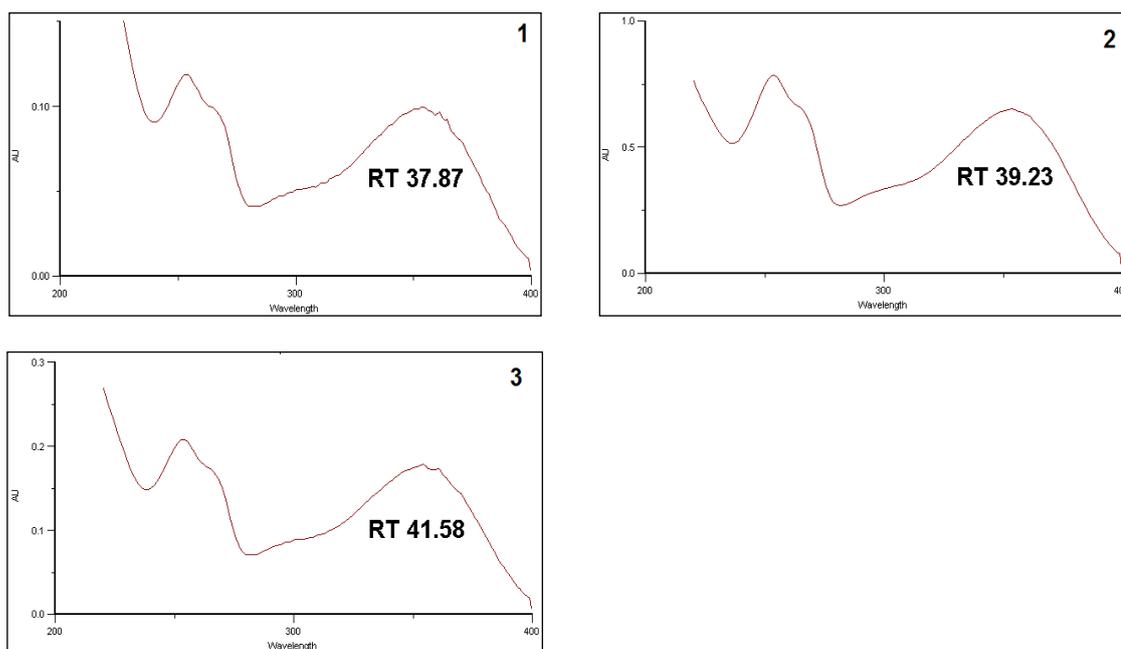
O coqueiro *Aracaceae* conhecido como *Cocos nucifera* é uma planta arbórea de altura de 25 metros. As variedades de coco são: cocos verdes gigantes que produzem frutos para a industrialização e o híbrido de coco anão com frutos verdes, vermelhos e amarelos que têm polinização e seus frutos são para o consumo de água de coco.

Considerando-se a produção alcançada por colmeia em áreas produtoras de coco, em cerca de 200 a 350 g/dia, o incentivo para a produção em escala industrial é grande.

Nome científico: ***Cocos nucifera***



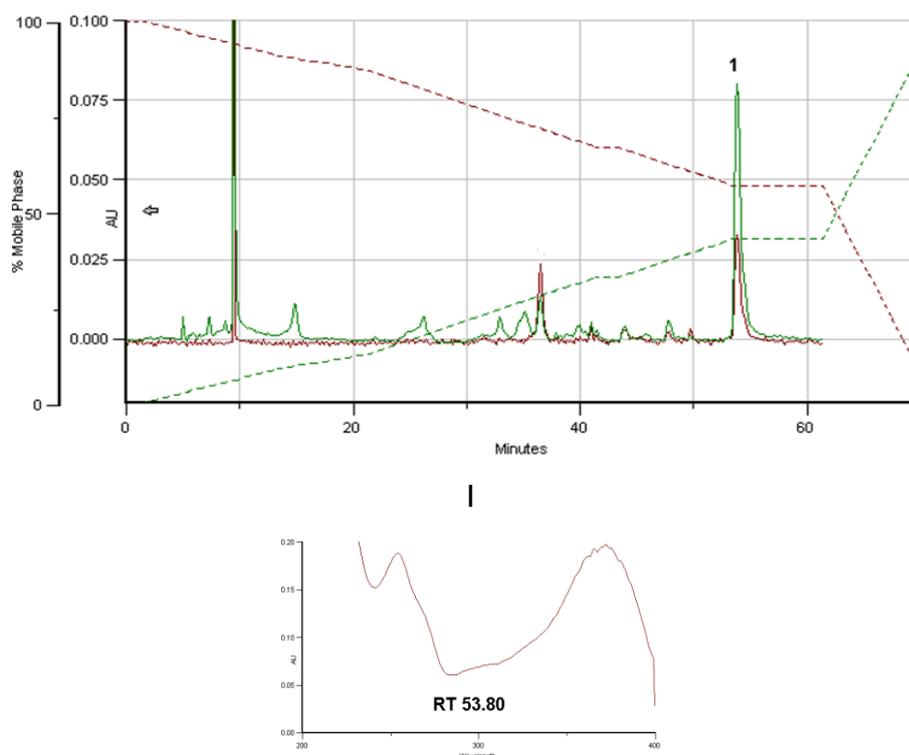
Espectro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:



**Figura 21** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Cocos nucifera*.

Os compostos I a 3 têm todos a mesma absorção UV e que é característico da isoramnetina, sendo que derivam entre eles no tipo de oses que os substituí em C3.

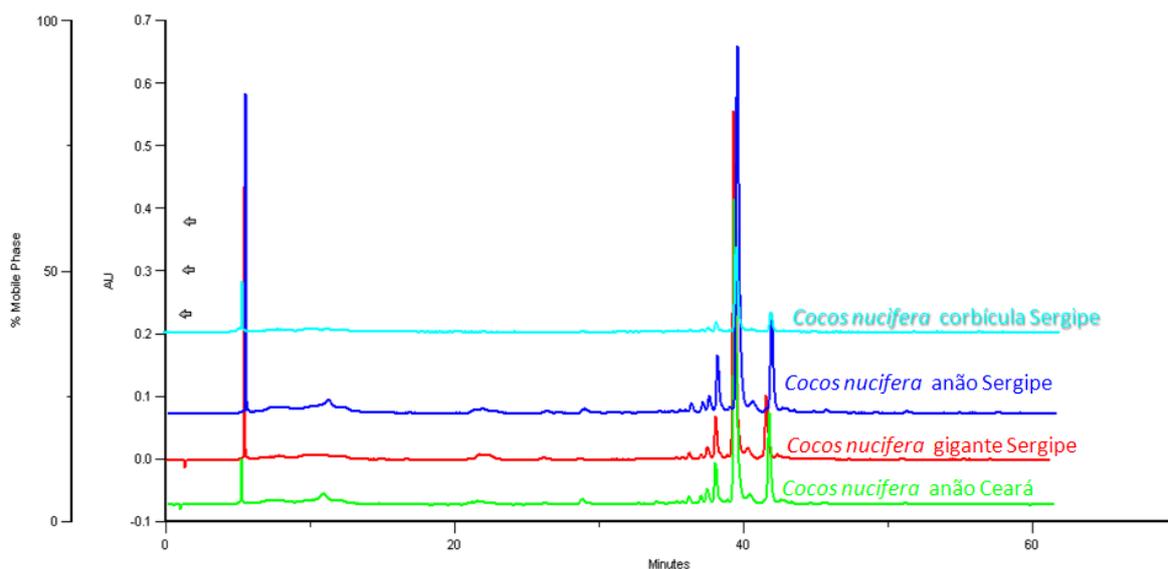
Para confirmar a estrutura dos três compostos predominantes fez-se a hidrólise ácida do extrato de flavonóides separados com acetato de etilo. Como se pode verificar na figura 22, resultou apenas num pico que se destaca, tratando-se da genina isoramnetina e tendo desaparecido totalmente os compostos com TR 37.87, 39.23, e a 41.58 (hidrólise total). As análises de LC-MS confirmam estas estruturas (BARRETO *et al.*, para publicação).



**Figura 22** – Cromatograma obtido por HPLC/DAD do *Cocos nucifera* hidrolisado e espectro UV do composto I que corresponde à isoramnetina.

O composto com TR 53.80 corresponde a isoramnetina (quercetina-3'-OCH<sub>3</sub>). Se fosse uma tamarixetina (OCH<sub>3</sub> em 4' e não em 3' como na isoramnetina) a banda I teria uma absorvância ligeiramente inferior à banda II (espectros I18 e I22 de CAMPOS e MARKHAM, 2007). A existência de uma glicosilação em C7 não interfere nesta zona do espectro.

Foram comparados ainda os *fingerprints* de várias espécies de *Cocos nucifera*, por exemplo coco anão do Ceará e Sergipe e coco gigante do Sergipe, Brasil (figura 23).



**Figura 23** – Comparação dos perfis cromatográficos da *Cocos nucifera*.

Como se pode ver, mantém-se os três principais compostos, mas será necessário um estudo mais aprofundado para avaliar a especificidade de cada um.

## ***Zea mays* L.**

(O material que abaixo se descreve integrou o artigo submetido CAMPOS *et al.*).

*Zea mays* L. é uma das culturas mais importantes do mundo. É uma planta da família *Poaceae*, que cresce rapidamente em terras férteis, podendo atingir facilmente até 2 metros de altura, na presença de água e em condições muito favoráveis pode chegar a cerca de 6 metros (SALAZAR-SOSA *et al.*, 2007).

Assim, ainda com o intuito de explorar os perfis flavonóide/fenólicos a partir do pólen de *Zea mays* L. como uma impressão digital para identificação da planta e também aplicado o método para amostras de pólen apícola, várias fontes de pólen de *Z. mays* L. foram analisadas, incluindo os híbridos de milho e amostras geneticamente modificadas colhidas em campos de cultura do Vale do Mondego, Coimbra, Portugal.

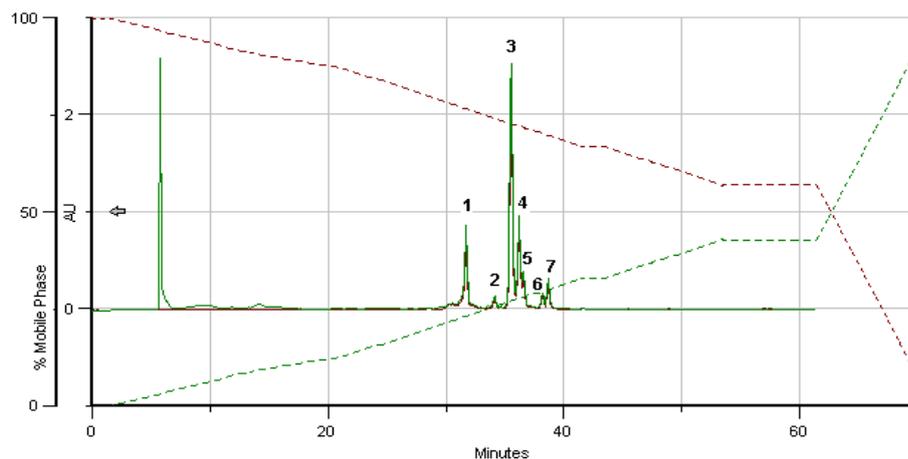
Os resultados mostraram, pela primeira vez, que a impressão digital (perfil de flavonóides/fenólico) para o pólen de *Z. mays* L. não muda ao longo do tempo de amostragem nem com a região de colheita. Mantêm-se a impressão digital, mesmo se a fonte for de diferentes países, híbridos e/ou plantas geneticamente modificadas.

O método de *fingerprint* descrito é fácil, rápido e preciso para a caracterização de amostras de pólen *Z. mays* L. independentes da origem e completa a análise microscópica, uma vez que é espécie-específico. Para completar o cenário, alguns outros dados são fornecidos para fazer a identificação (tipo de passaporte) do produto, que permite a pesquisa e/ou comercialização do produto com um melhor conhecimento de todo o potencial que pode ser explorado.

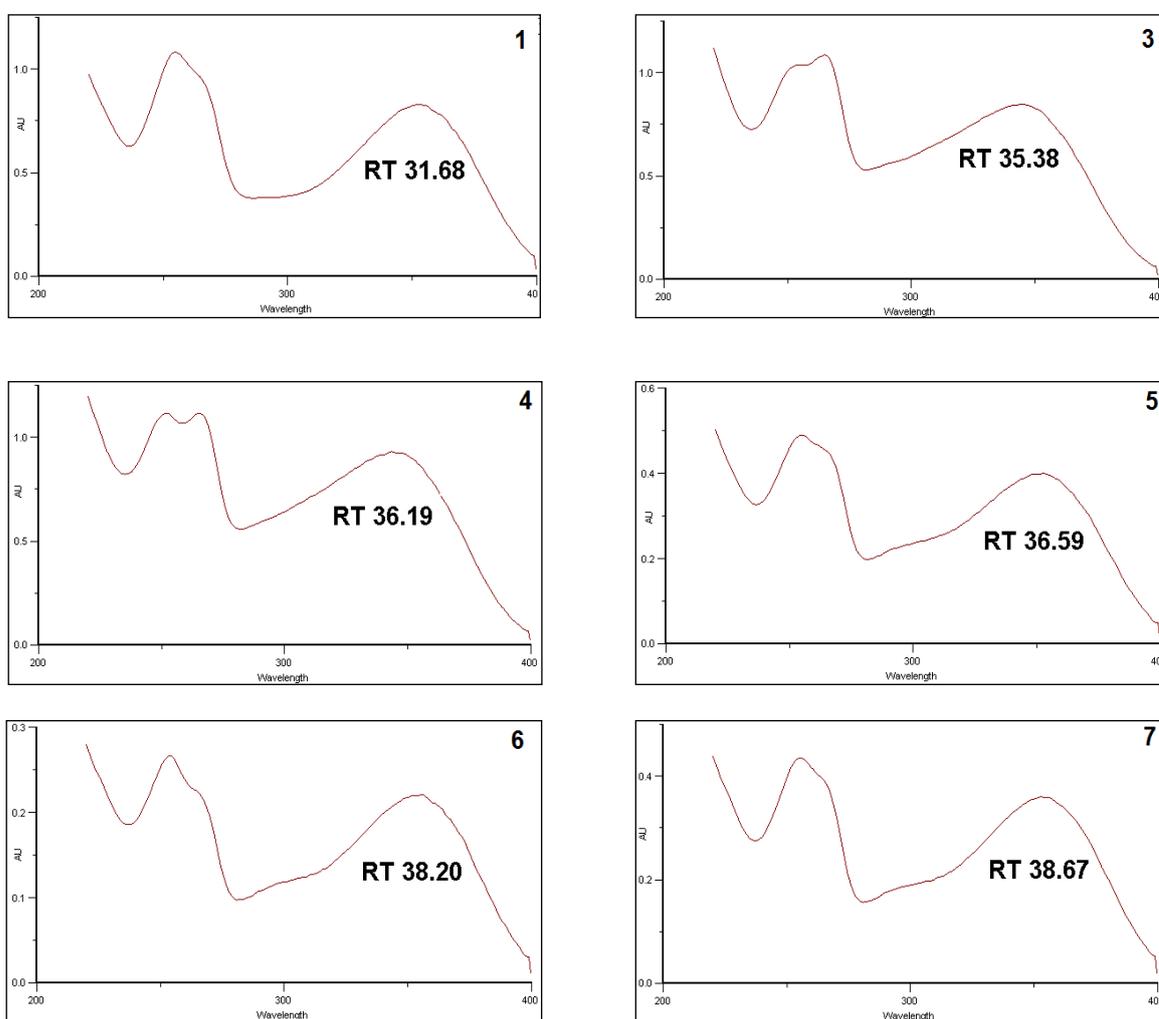
Os espectros e a estrutura dos compostos separados por HPLC/DAD são apresentados na figura 24 e corroboram os dados explicados acima com base nestes espectros UV e os resultados de RMN em comparação com a literatura sobre o pólen de milho.

Como foi discutido, esta matéria-prima, como outras de pólen e pólen apícola, pode ser explorada com diversos fins. Um deles pode ser relacionado com as aplicações terapêuticas.

A análise completa de todo o pólen de *Zea mays* L. de todas as fontes referidas (diferentes híbridos, transgênicos e amostras não-transgênicas, plantas de vários países de produção e em diferentes anos de colheita) confirma os dados da literatura que o baixo nível de variabilidade dos perfis fenólicos do pólen em todo o género de *Z. mays* L. apoia a proposta de que o milho é um grupo conspecífico, e indica que a composição fenólica do pólen é grandemente conservada nos diferentes taxa de *Zea mays* L. (Figura 25) (ALMARAZ-ABARCA *et al.*, 2013). Esta informação permitiu o uso do perfil como se mostra na figura 24 para a identificação do pólen apícola de *Zea mays* L. para fins industriais, como sugerido no início deste trabalho.



**Espetro de absorção no UV dos principais compostos constituintes:**



**Figura 24** – Informação síntese sobre o *fingerpint* de *Zea mays L.*

Os compostos 1 (TR 31,68 com  $\lambda$  max 254, 265sh, 350nm), 5 (TR 36,59) e 7 (TR 38,20) são quercetina-3-O-glicósidos. A absorção a  $\lambda$  max 254, 265sh, é um padrão típico de oxigenação no anel B em 3',4' e a banda I com um  $\lambda$  350nm e inferior, em seguida, a banda

II corresponde a 3-O-derivados. Contudo o composto I difere dos outros dois na ausência de absorção de sh entre  $\lambda$  280 - 310nm significando que C7 está substituído, o que corresponde, neste caso, a quercetina-3,7-di-O-glicosídeo.

Os compostos 2 (TR 34,12) e 3 (TR 35,38), são também quercetina-3-O-glucósidos, mas com outras substituições, para além dos compostos acima mencionados. Mantêm-se os principais pontos de absorção de 254, 265, 350 nm, mas agora com uma inversão na intensidade na banda IIb e,  $\lambda$  max 254sh, 265, 350nm. Isto fornece informações da existência de que uma substituição em C6, C8 ou C3' pode ocorrer, sendo a principal diferença a diminuição da polaridade (aumento do RT) no resíduo de açúcar. De toda a análise realizada este composto foi identificado como quercetina-3-O-glicosídeo,3'-diglicosido.

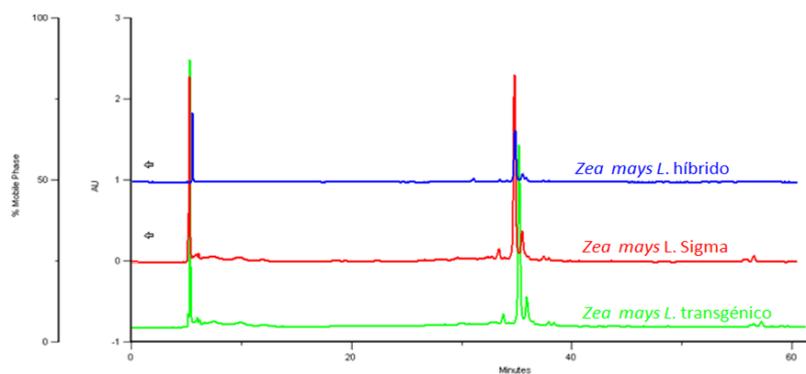
O composto 3 (TR 35,38) com um espectro ultravioleta de  $\lambda$  254sh, 265, 350 nm, foi identificado como o principal flavonóide em todos os extratos. A partir da leitura desses valores ficou claro que a diminuição da absorção de UV da banda I relacionada com a intensidade da banda II indica uma possível substituição em C3  $\lambda$  máx 350 nm, como já foi referido para o espectro anterior. O aparecimento de dois pontos de absorção na banda II (254sh, 265) é indicativo de que no anel B existe uma dupla substituição geralmente em 3' e 4'.

Os compostos 4 (TR 36.19)  $\lambda$  max 252.6, 265.5, 343.8nm, e 6 (RT 38.20)  $\lambda$  max 254, 265sh, 353nm, são isoramnetina 3-O-glicosídeos. O primeiro (composto 4) apresenta tanto  $\lambda$  max 252,6, 265.5nm com a mesma intensidade de absorção, no entanto, entre eles um vale intenso é observado e é geralmente indicativo de uma metoxi-substituição. O aumento da intensidade da banda IIa para o mesmo valor de banda IIb, é induzida pela substituição glicosídica em 4'. Neste caso, o composto é uma isoramnetina-3-O-glucósido-4'-O-diglicosilada. O composto 6 tem um espectro ultravioleta fácil, semelhante a muitos outros descritos na literatura para a isoramnetina-3-O-glicosídeo (CAMPOS e MARKHAM, 2007) e após a hidrólise ácida da aglicona revelou ser isoramnetina livre.

Os compostos 5 (TR 36,59) e 7 (TR 38,67) são quercetina-3-O-diglicosido e quercetina-3-O-glicosídeo, respetivamente, totalmente de acordo com a literatura (CESKA e STYLES, 1984) como o espectro ultravioleta apresenta a mesma forma corroborando o mesmo padrão oxigenado e substituição em C3 (CAMPOS e MARKHAM, 2007).

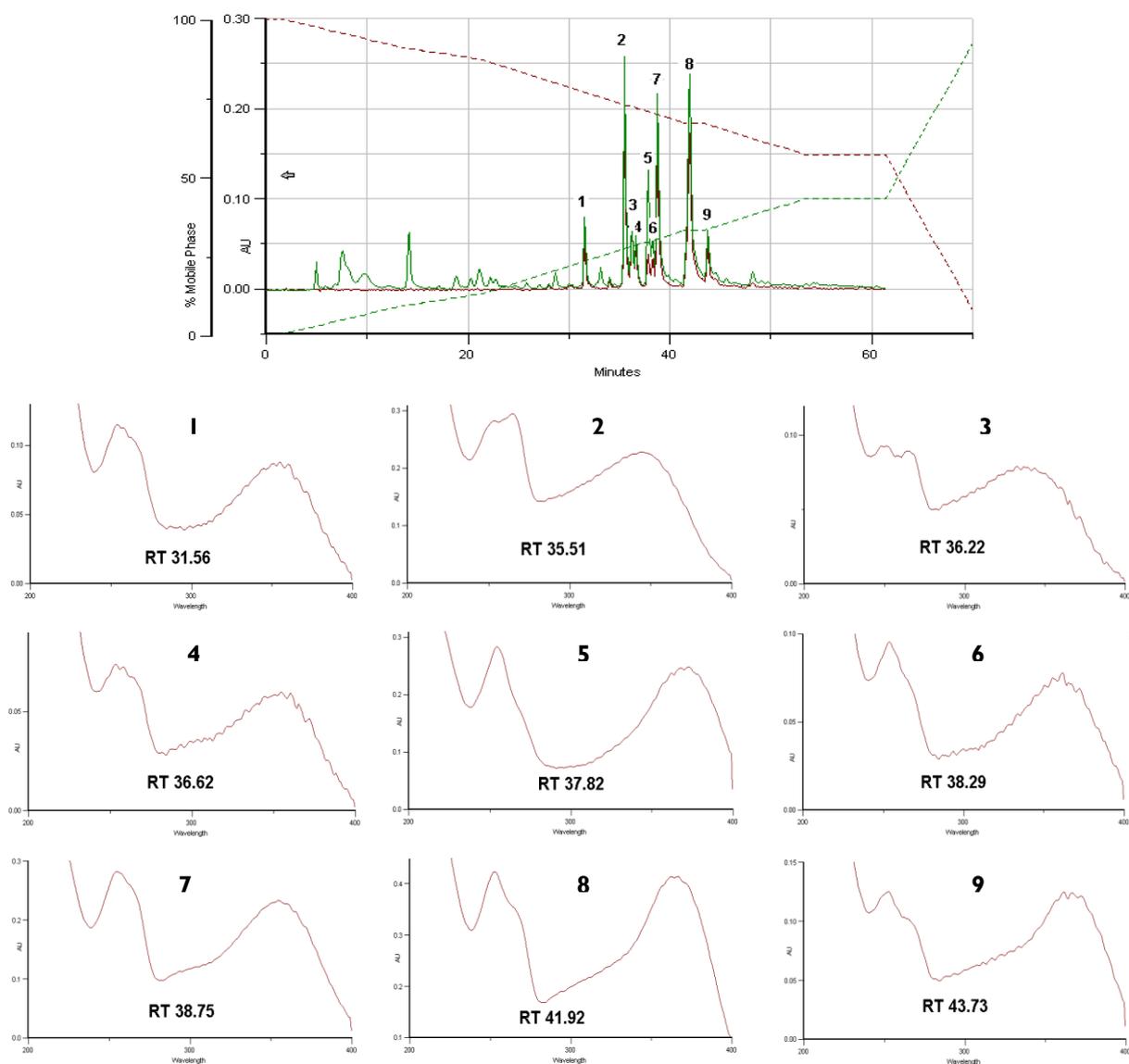
Os seis flavonóides que se mostram na figura 24 são usados como marcadores químicos para este pólen de *Z. mays* L. como relatado por CAMPOS *et al.*, submetido para publicação.

Na figura 25 podem ver-se comparativamente os *fingerprints* de *Zea mays* L.



**Figura 25** – Comparação dos perfis cromatográficos da *Zea mays* L.

Depois de hidrolisado, das frações de acetato de etilo dos flavonóides de *Zea mays* L, obtiveram-se vários subprodutos (figura 26).



**Figura 26** – Cromatograma obtido por HPLC/DAD do *Zea mays* L. hidrolisado e espectros UV.

O composto com TR 31.56, correspondente ao pico I do cromatograma, é uma quercetina-3,7-O-diglucose. Da sua hidrólise resulta o composto com TR 37.82 correspondente ao pico 3, que é uma quercetina-7-O-glucose (a ose neste caso pode não ser a glucose).

O composto com TR 41.92 (pico 8) é uma isoramnetina substituída em C3 por OH. A isoramnetina livre, isto é sem a substituição OH em C3 tem um TR 54.30 (espectro UV nº 118 de CAMPOS e MARKHAM, 2007).

### **4.3. Determinação da humidade**

O método DPPH e os perfis cromatográficos não foram afetados pelo processo de secagem por infra-vermelho. Contrariamente, permitiu diminuir o tempo de secagem e o custo económico desta operação.

Também verificou-se boa reprodutibilidade.

Como já confirmado por FRIGERIO (2009), não houve influência na bioatividade.

### **4.4. Determinação da atividade anti-radicalar**

A atividade anti-radicalar de uma substância não pode ser medida diretamente mas sim através do seu efeito em um substrato ou sistema que possa ser controlado.

No caso dos pólenes é específica da espécie, independentemente do local de colheita, isto é, dos fatores exógenos, embora diminua com o envelhecimento do pólen, aproximadamente 50% no primeiro ano, é, portanto dependente do tempo (CAMPOS *et al.* 2003.). Este fato é de suma importância na avaliação do grau de degradação do material analisado (caso exista) constituindo-se uma ferramenta de análise do estado de frescura da amostra que se torna útil para a aplicação de um controlo de qualidade adequado, levando a uma monitorização das condições de armazenamento para que as mesmas sejam ideais. A finalidade da utilização do método também deveu-se à importância de determinação da validade do produto. Se o valor inicial da medição da atividade anti-radicalar se mantiver no final do processo, há garantia de que não houve alteração do produto durante as manipulações e/ou tempo de armazenamento.

Assim, para as espécies constantes na tabela 3 apenas foi possível fazer a identificação microscópica complementar do HPLC/DAD, e para as espécies *Camellia sinensis*, *Cocos*

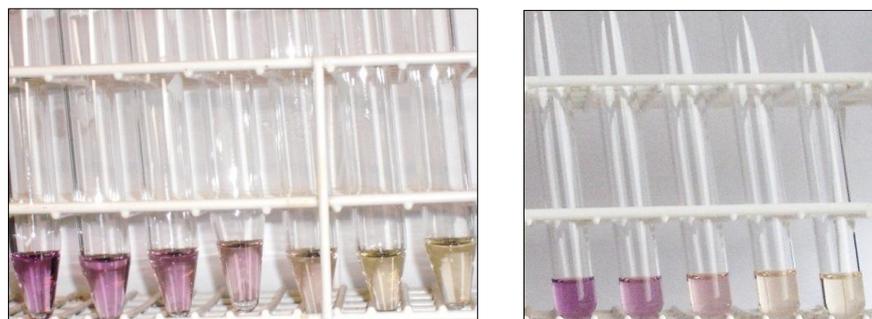
*nucifera* e *Zea mays* L. também se fez DPPH de modo a contribuir com informação relevante na identificação do material vegetal e da sua conservação segundo CAMPOS *et al.*, 2003. Estes dados servem apenas como referência preliminar uma vez que as amostras nem sempre eram frescas.

A avaliação da atividade anti-radicalar foi feita por meio da monitorização do despêndio do radical livre DPPH pelas alíquotas de ensaio das amostras, através da avaliação do decréscimo das respetivas medidas de absorvância que foram realizadas em espectrofotómetro UV-Vis.

Foram realizados dois ensaios brancos, um no início e outro no fim de maneira a verificar a consistência dos resultados e estabilidade da solução. Aos mesmos correspondem, portanto, 100% de absorvância e 0% de atividade anti-radicalar. Ao longo, da adição do extrato etanólico, verifica-se um decréscimo de absorvância e um aumento de atividade anti-radicalar, o que corresponde à presença e aumento da concentração dos compostos fenólicos.

O ensaio em branco foi realizado apenas com solução de DPPH (1 mL). A solução do radical tem uma coloração roxa.

As quantidades em  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico adicionadas para a realização do ensaio foram estabelecidas de acordo com a verificação ocular da variação de cor apresentada pelas soluções com os ensaios preliminares de modo a se estabelecer um intervalo aonde se verificasse a presença, ainda que residual, de DPPH em solução. A variação de cor percorreu desde o roxo, cor característica da solução de DPPH, a um amarelo ligeiro representativo do extrato etanólico da matriz vegetal. Os radicais livres de DPPH, que originalmente ostentam cor roxa por possuírem um eletrão livre, dissiparam esta cor quando um radical hidrogénio foi doado por uma molécula antioxidante à molécula de DPPH, reduzindo-se, assim, a absorvância.

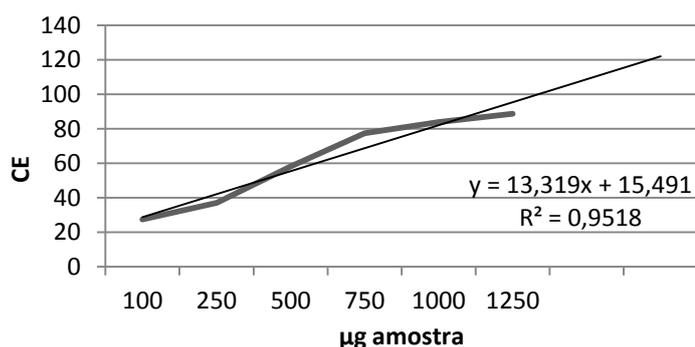


**Figura 27** – Gradação de cor de acordo com o aumento de concentração em compostos fenólicos da amostra *Camellia sinensis* e *Zea mays* L. respetivamente no ensaio de DPPH.

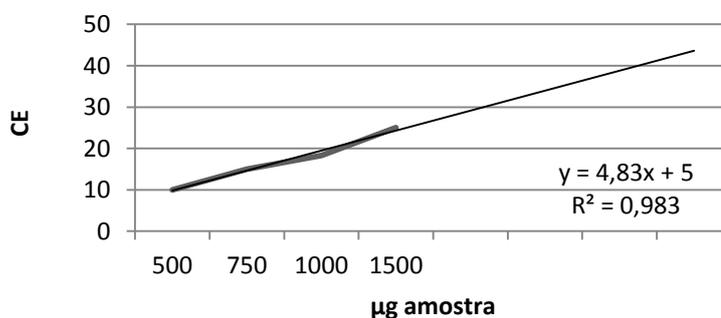
A concentração de flavonóides nas amostras é representada graficamente para se determinar, por meio da regressão linear, a concentração eficaz a 50% (CE<sub>50</sub>), isto é, a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH.

Verifica-se que o conteúdo de flavonóides está intimamente relacionado a atividade anti-radicalar do pólen.

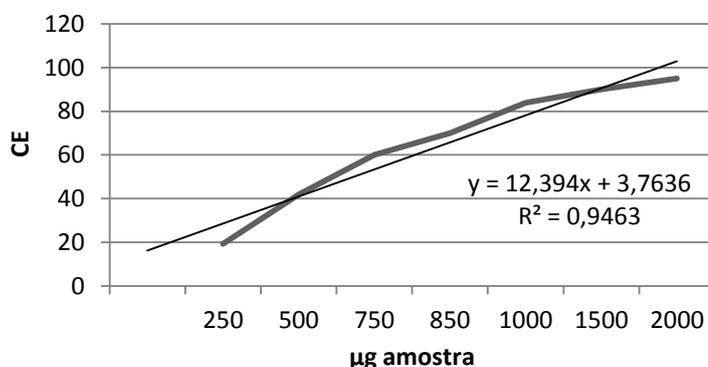
Atendo a que as amostras em estudo já não eram frescas os valores de CE<sub>50</sub> são superiores a 500 µg/mL tal como seria de esperar segundo os dados prévios de CAMPOS et al. (2003).



**Figura 28** – Atividade anti-radicalar do pólen apícola de *Camellia sinensis*.



**Figura 29** – Atividade anti-radicalar do pólen apícola de *Cocos nucifera*.



**Figura 30** – Atividade anti-radicalar do pólen apícola de *Zea mays* L.

O padrão utilizado, ácido ascórbico, assistiu a determinação da conformidade do método, uma vez que para a validação do mesmo é necessária a determinação da atividade anti-radicalar de uma substância com atividade conhecida. O protocolo seguido foi o mesmo procedendo apenas a substituição da amostra pelo mesmo.

Ao padrão de ácido ascórbico a  $3,75 \times 10^{-3} \text{M}$  utilizado na forma de solução etanólica a 50% corresponde um valor de  $CE_{50} = 2,7 \text{ mg/mL} = 1,64 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $R^2 = 0.9993$ .

A absorção da solução resultante no UV é feita a 517nm uma vez que é o comprimento de onda aonde não se verifica absorção concomitante com a dos flavonóides. O DPPH também apresenta um pico de absorção no UV aproximado aos 300nm, no entanto, o intervalo entre  $\pm 220\text{-}400\text{nm}$  corresponde ao de absorção dos compostos fenólicos, o que compreende um dos picos de absorção do DPPH, daí a escolha de manter fixo o comprimento de onda a 517nm.

Apesar de haver vários métodos para a determinação da atividade antioxidante de matérias vegetais, o método do DPPH foi escolhido para a determinação da atividade anti-radicalar das amostras em estudo pois é comparável a atividade antioxidante mas claramente mais rápido e económico do que os outros métodos funcionando como um meio de *screening*.

É ainda importante caso haja a necessidade de um transporte demorado de uma matéria vegetal que a escolha da bioatividade não dependa da atividade antioxidante uma vez que esta diminui consideravelmente com o tempo. Neste sentido, a bioatividade escolhida para este estudo, antibacteriana e antiprotozoária, não depende da atividade antioxidante possibilitando o uso de matéria que não seja fresca.

# CAPÍTULO 2

## I. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Várias têm sido as abordagens à biotividade do pólen (CAMPOS e FRIGERIO, 2010). Neste trabalho selecionamos a atividade antibacteriana com *Pseudomonas aeruginosa* devido a estudos prévios que apontam para a ação inibitória dos compostos polifenólicos contra esta estirpe e também a atividade antiprotozoária dado que não foram encontrados trabalhos com estas espécies de pólen.

### I.1 Atividade antibacteriana

De maneira geral, desde há muito que os flavonóides são relatados como tendo atividade antibacteriana.

CUSHINIE e LAMB (2005) descrevem a propriedade antimicrobiana de amostras de própolis devido ao seu elevado conteúdo flavonóico e identifica compostos como luteolina, 3-O-metilquercetina, apigenina, chalcona, etc. com propriedades contra bactérias.

Durante os últimos anos tem sido descrita a atividade antibacteriana *in vitro* do pólen atribuída aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural (GEBARA *et al.*, 2002).

CARPES *et al.* (2007) com o objetivo de estudar os compostos fenólicos, determinaram a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de pólen. A bactéria *Staphylococcus aureus* foi inibida pelo extrato etanólico do pólen de Alagoas, e o extrato etanólico a 60%, no pólen do Paraná, inibiu *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* sp., e *Pseudomonas aeruginosa*.

A estrutura dos flavonóides está estreitamente relacionada com as suas propriedades biológicas. Assim, a atividade antibacteriana dos flavonóides é determinada pelas suas características estruturais, como por exemplo substituições de grupos metil (CH<sub>3</sub>) nos anéis A nas posições 7' e 8' e B nas posições 4' e 5'. No entanto, a estrutura do anel A pode ser de menor importância para a atividade antibacteriana do que o anel B. Um artigo de CUSHINIE e LAMB (2005) menciona também a importância de um grupo hidroxilo na posição 2' dos flavonóides para a atividade antibacteriana.

Contudo, tem havido um grande impacto clínico e económico em decorrência da presença de estirpes de patogénicos resistentes, particularmente em ambiente hospitalar,

como de *Pseudomonas aeruginosa* (FUENTEFRIA, 2008). Esta, trata-se de uma bactéria móvel, em forma de bastonete, medindo cerca de 0,6 x 2,0mm, Gram-negativa e ocorre como bactéria isolada, em pares e, em certas ocasiões, em cadeias curtas. É um organismo saprófito difundido na natureza, particularmente em ambientes húmidos (SIQUEIRA, 2002). De acordo com CAMPOS (1997b) a pioverdina é um dos pigmentos produzidos por essa estirpe e normalmente usado na sua identificação. Este pigmento é o principal composto orgânico captador de ferro, produzido pela *P. aeruginosa* e a sua ausência em culturas de mutantes pioverdina-deficientes pode retirar-lhes a virulência, que pode ser restabelecida adicionando à “infecção” a pioverdina isolada da estirpe original.

As infecções causadas por estes patógenos são particularmente um desafio clínico, uma vez que é caracterizado pela suscetibilidade natural a um número limitado de agentes antimicrobianos e elevadas taxas de resistência adquirida a vários fármacos disponíveis (KOBAYASHI, 2009), sendo um perigo para as práticas médicas. Isto faz com que, que o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos seja uma necessidade urgente (WOZNICKA, 2013).

De modo a procurar novos compostos que possam ser utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, este trabalho apresenta a determinação da atividade antibacteriana *in vitro* de flavonóides metilados de ocorrência natural.

## **1.2. Atividade antiprotozoária em *Giardia lamblia***

A giardiose é uma infecção do intestino delgado relacionada com a absorção inadequada de nutrientes que é produzida por um protozoário flagelado chamado *Giardia lamblia* que se encontra no lúmen intestinal na forma de trofozoíto binucleado ou na forma de quisto tetranucleado sem mobilidade. Este parasita utiliza como via de transmissão a sua forma quística a qual resiste durante longos períodos em água fria e ao processo de cloração (RAMÍREZ *et al.*, 2010).

Devido às várias limitações desta doença e dos fármacos atuais, a caracterização dos flavonóides como componentes chave na atividade anti-giardial tem sido feita. Pesquisas sobre a atividade de flavonóides contra protozoários causadores de doenças humanas têm sido realizadas com o intuito de fornecer maior informação à sociedade e conduzir ao desenvolvimento de medicamentos farmacologicamente mais ativos e menos tóxicos que os fármacos que atualmente são utilizados.

Neste sentido BARBOSA *et al.* (2007) verificaram a ação de alguns flavonóides, como derivados do caemferol e epicatequina, contra o protozoário *G. lamblia* em uma infecção induzida experimentalmente em ratos, em que foram por vezes mais ativos que o metronidazol, fármaco de uso clássico. Também flavonóis glucosilados mostraram ação com *G. lamblia*.

BAUTISTA *et al.* (2011) isolaram 8 flavonóides das folhas e flores da *Mimosa tenuiflora*, entre eles 6-metoxicaemferol e 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona, que mostraram atividade inibidora contra *G. lamblia*.

Os dados de AMARAL *et al.*, (2006) mostram que diversos flavonóides, como por exemplo a rutina, isolados de diferentes espécies de plantas, exibiram atividade giardicida demonstrada em ensaio *in vitro* de citotoxicidade contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Como estas estruturas são todas comuns nos pólen estudados, selecionaram-se os extratos de *Camellia sinensis* e *Zea mays L.* que contém derivados da herbacetina e da quercetina respetivamente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação dos extratos

Foram utilizados para a determinação da atividade antibacteriana extratos de *Brassica napus*, *Camellia sinensis L.*, *Cocos nucifera* e *Zea mays L.* e ainda um composto isolado deste último.

Os extratos aquosos de *Brassica napus* e *Camellia sinensis* foram preparados com 100 mg de pólen adicionado de 1 mL de água, homogeneizado em vortex e extraído com recurso a ultrassons durante 30 minutos, centrifugação a 4800 rpm a 20 °C durante 5 minutos. Usou-se o sobrenadante como matriz em análise.

O extrato etanólico concentrado de *Camellia sinensis L.*, foi preparado adicionando 25 mL de EtOH 96% a 5g de pólen seguido de 1h de ultrassons, filtração em papel de filtro e evaporação a resíduo quase seco do filtrado etanólico.

Foi utilizado o extrato hidrolisado do *Cocos nucifera* recuperado em EtOH 96%. Também foi aplicado o extrato etanólico do *Zea mays L.* em EtOH 50% na proporção 60 mg de pólen para 1 mL de solvente utilizando-se a mesma técnica da preparação dos extratos de *Brassica napus* e *Camellia sinensis*.

O extrato aquoso do *Zea mays* L. foi obtido aquando do seu isolamento, na fase final de purificação.

## **2.2 Isolamento do composto maioritário do pólen de *Camellia sinensis* e de *Zea mays* L.**

O isolamento de flavonóides foi realizado com amostras de pólen apícola. Aliquotas de pólen de *Camellia sinensis* e de *Zea mays* L. foram extraídas em EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1) com ultrassons. Os extratos foram submetidos a centrifugação prévia e separados por TLC (papel Whatman 3 mm de cromatografia para separação). Como solvente de eluição foi utilizado ácido acético aquoso a 15%. O composto foi purificado numa coluna sep-pack C-18, coluna de fase reversa, usando água e metanol e verificado quanto à pureza por HPLC/DAD, de acordo com MARKHAM e CAMPOS (1996).

## **2.3 Determinação da atividade antibacteriana em *Pseudomonas aeruginosa***

Selecionaram-se 8 estirpes jovens de isolados clínicos hospitalares (3/12, 4/12, 5/12, 6/12, 7/12, 8/12, 9/12 e 10/12) obtidos a partir de culturas puras, provenientes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que foram cultivados em tripticase soja. Apenas 4 deles desenvolveram pigmentação, respetivamente as estirpes 3/12, 6/12, 7/12 e 9/12 e desses 4 apenas 2 foram selecionados para a determinação da atividade antibacteriana: no primeiro ensaio as estirpes 3/12 e 9/12 e para o segundo ensaio as estirpes 3/12 e 6/12 (Figura 31), correspondendo aos que continham pioverdina (isto é, desenvolveram pigmento). A escolha pretendia aproximar-se o mais possível à reprodução dos ensaios previamente executados por CAMPOS (1997b).

Para a avaliação do potencial antibacteriano do pólen utilizaram-se os extratos de pólen de *Brassica napus*, *Camellia sinensis*, *Cocos nucifera* e *Zea mays* L em culturas de três estirpes de isolados clínicos hospitalares do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*.

Foi preparada uma suspensão de três estirpes jovens da bactéria de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* em soro fisiológico (0,9%) com uma turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland. Com o auxílio de uma ansa, a suspensão foi semeada pelo método em toalha em gelose Mueller-Hinton e de seguida foram colocados os discos de papel de filtro

esterilizado com 6 mm de diâmetro embebidos com 10 µL de cada extrato de pólen. As placas foram mantidas em repouso durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos, e depois incubadas em estufa a 37°C durante 24h. Os ensaios foram realizados em duplicado.

A leitura deverá ser feita pela medição de halos de inibição em mm.

## **2.4 Determinação da atividade antiprotozoária em *Giardia lamblia***

Para esta atividade e face ao que foi citado na introdução relativamente aos estudos prévios, selecionou-se apenas as amostras de *Camellia sinensis* e de *Zea mays* L.

### **2.4.1 Cultura**

As culturas de *Giardia lamblia* foram estabelecidas a partir da estirpe WB [ATCC 30957]. Os trofozoítos foram mantidos em cultura pura a 37 °C em tubos de rosca de cultura de células (Nunc. ref. 156758) com 10 mL de meio de Diamond TYI-S-33, modificado por Keister (KEISTER, 1983).

Nos estudos de suscetibilidade foram utilizados os trofozoítos aderentes de culturas em fase exponencial (2 dias de incubação) com uma viabilidade celular medida pela mobilidade flagelar e pela tomada de azul de tripano, superior a 95% (SOUSA *et al.*, 2001). Assim, os meios de cultura de *Giardia lamblia* foram depois rejeitados, e adicionou-se meio fresco e os trofozoítos aderentes foram destacados das paredes do tubo de cultura por arrefecimento (4 minutos/15°C). Posteriormente, os trofozoítos foram sedimentados por centrifugação (1500 rpm durante 5 minutos), lavados por três vezes e, em seguida, procedeu-se à contagem dos trofozoítos em câmara de Neubauer. Estas células foram utilizadas para estudar os efeitos do pólen de *Camellia sinensis* e *Zea mays* L. e dos seus compostos no crescimento de trofozoítos de *Giardia lamblia*.

### **2.4.2 Crescimento *in vitro***

A suscetibilidade de *Giardia lamblia* aos extratos do pólen, foi determinada pela medição do crescimento *in vitro* (EDLIND, *et al.*, 1990; SOUSA, 1999). Os trofozoítos em

fase exponencial (2 dias de incubação) foram sedimentados e lavados, segundo a metodologia descrita anteriormente. Posteriormente, os trofozoítos de *Giardia lamblia* ( $5 \times 10^4$  células), foram incubados a  $37^\circ \text{C}$  por 48 h em meio de cultura fresco (TYI-S-33), suplementado com soro bovino (SB) (Biochrom K.G.) e na presença do extrato e composto puro de *Camellia sinensis* e *Zea mays* L., que foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical) numa concentração de  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  e em água numa concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  e, em seguida, em meio TYI-S-33 de forma a obter uma gama de concentrações de ensaio de  $10\text{-}400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Os ensaios controlo foram realizados nas mesmas condições, substituindo os extratos de *Camellia sinensis* e *Zea mays* L. por DMSO ou água nas concentrações utilizadas nos ensaios.

Após a incubação, procedeu-se à contagem do número total de trofozoítos (aderentes e não aderentes) em câmara de Neubauer sob microscópio de luz (Nikon Eclipse E100). Os tubos foram arrefecidos a  $4^\circ\text{C}$ , homogeneizados e uma alíquota ( $50$  a  $100 \text{ }\mu\text{l}$ ) foi fixada com formalina a 1%.

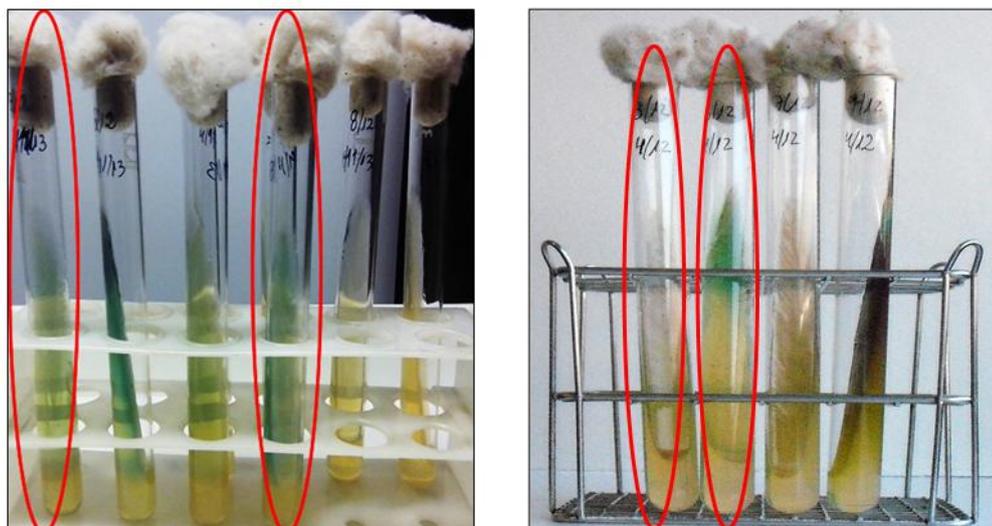
Os resultados foram expressos em percentagem do número total de células desenvolvidas após 48h de incubação, relativamente aos ensaios realizados na ausência dos extratos de *Camellia sinensis* e *Zea mays* L. e na presença do veículo de dissolução, DMSO ou água (controlo). Todas as experiências foram realizadas em duplicado e em pelo menos três ensaios independentes.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Atividade antibacteriana**

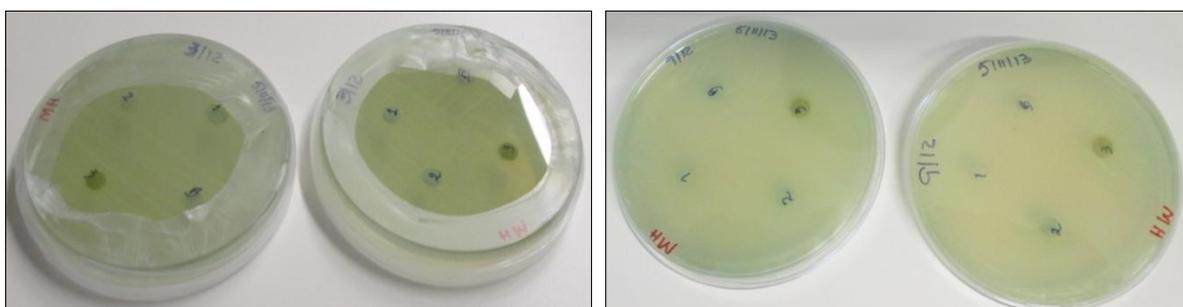
A escolha da *Pseudomonas aeruginosa* foi feita devido aos ensaios preliminares de CAMPOS (1997b) terem sido positivos para a 7,8-O-dimetil herbacetina-3-O-soforósido, uma vez que a amostra de *Camellia sinensis* continha um derivado da herbacetina e poderia vir a ser explorada com este potencial embora faltassem dois metilos nos hidroxilos em C7 e C8. Resultados similares foram mais tarde obtidos por outros autores como referimos na introdução.

A avaliação do seu potencial antibacteriano foi executada recorrendo a um ensaio preliminar em culturas de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figura 31** – Seleção das estirpes de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentaram desenvolvimento do pigmento pioverdina.

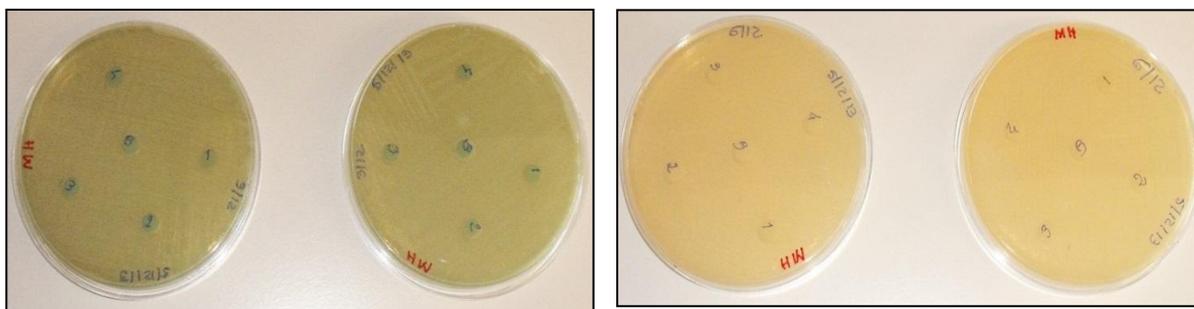
Após um período de inoculação de 24 h em estufa a 37°C foi possível observar a ausência de halos de inibição de crescimento nas placas de Petri. Todas as culturas apresentaram desenvolvimento de pigmento ainda que o meio de cultura 9/12-A tenha desenvolvido em menor intensidade em relação aos outros.



**Figura 32** – Determinação da atividade antibacteriana em *P. aeruginosa* das estirpes 3/12 e 9/12 do dia 4/11/13, respetivamente.

**Legenda:**

- 1 – Extrato aquoso de *Camellia sinensis*
- 2 – Extrato aquoso de *Brassica napus*
- 3 – Extrato etanólico concentrado de *Camellia sinensis*
- B – Branco – água



**Figura 33** – Determinação da atividade antibacteriana em *P. aeruginosa* das estirpes 3/12 e 6/12 do dia 6/11/13, respetivamente.

**Legenda:**

- 1 – Composto maioritário isolado de *Zea mays* L.
- 2 – Extrato etanólico de *Zea mays* L.
- 3 – Extrato aquoso do isolamento do *Zea mays* L.
- 4 – Extrato etanólico hidrolisado do *Cocos nucifera*
- B** – Branco: AcOEt

Apesar dos extratos de pólen utilizados apresentarem elevado conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides com reconhecidas atividades biológicas, estes não foram capazes de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* pelo método utilizado. Isso pode dever-se ao fato de as estirpes utilizadas apresentarem já alterações e/ou resistências tendo em conta que se trata de isolados clínicos hospitalares. A concentração utilizada no ensaio também pode ter sido influente uma vez que estudos de PEITZ *et al.* (2003) demonstraram a inibição do crescimento de *P. aeruginosa* apenas através do emprego de elevadíssimas concentrações de um extrato bruto rico em flavonóides. Embora o uso de concentrações muito elevadas possam ser consideradas extremas no emprego nos discos, extratos brutos e suas frações possuem quantidades elevadas de metabólitos, o que pode diminuir o efeito das substâncias ativas.

Embora CUSHNIE *et al.* (2005) listem vários flavonóides com ação antibacteriana não indicam todavia as concentrações utilizadas além de não serem específicos para os flavonóides do pólen. Além disso, estudos de KOBAYASHI *et al.* (2009) tem descrito a resistência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* evidenciando a dificuldade de se estabelecer opções de antimicrobianos para o tratamento de infeções graves causadas por este patógeno. FUKAI (2002), entre outros estudos, também já havia descrito a não inibição do desenvolvimento de *P. aeruginosa* por flavonóides.

O método de difusão é considerado um teste com carácter qualitativo, isso porque se deve considerar a probabilidade de que tanto o processo como o solvente utilizado na extração possam concentrar os compostos apolares de interesse do pólen e estes, por sua vez, podem não se difundir por completo no meio de cultura em causa. A menor sensibilidade das gram-negativas em detrimento das gram-positivas face aos flavonóides deve-se provavelmente às diferenças na constituição química da parede celular destas bactérias (CARPES, 2009).

Estudos de BOURATOUA *et al.* (2013) descrevem a ação antibacteriana *in vitro* de derivados de isoramnetina contra *P. aeruginosa*, no entanto não se trata da mesma isoramnetina presente no extrato de *Cocos nucifera* devido às substituições no primeiro caso. Assim como a ação do caemferol já está demonstrada contra a *P. aeruginosa*, não está, porém, especificada para o caemferol-3-O-derivado do pólen de *Brassica napus* neste trabalho estudado (TATSIMO, 2012). BOGDANOV (2012) verificou a inibição de *P. aeruginosa* por ação do flavonóide herbacetina, contudo, a herbacetina estudada presente no pólen de *Camellia sinensis* é 3-O-substituída pelo que esta substituição *in vitro* pode influenciar o mecanismo de ação da mesma. A quercetina também está marcada como agente que inibe o crescimento de *P. aeruginosa* (KOSTECKA, 2012) todavia, não está especificada a mesma ação relativamente a quercetina-3-O-glicósido,3'-diglicósido presente no pólen de *Zea mays* L.

### **3.2 Atividade antiprotozoária em *Giardia lamblia***

A atividade anti-*Giardia* foi determinada utilizando-se os extratos brutos e compostos isolados de *Zea mays* L. e compostos isolados de *Camellia sinensis*.

Os trofozoitos foram expostos a concentrações crescentes dos extratos e compostos e após a incubação (48h, 37°C) o número total de células foi determinado em câmara Neubauer e a inibição do crescimento foi calculada (tabela 5).

Verificou-se que o extrato e os compostos isolados não inibiram significativamente o crescimento do parasita. O composto isolado de *Camellia sinensis* (herbacetina-3-O-substituída) foi menos ativo do que o extrato e o composto isolado de *Zea mays* L. e a sua atividade não foi dependente da dose. Verificou-se que tanto o extrato aquoso como o composto isolado de *Zea mays* L tiveram percentagens de inibição aproximadas para a mesma concentração (200 µg/mL). Atendendo a que o composto maioritário de *Zea mays* L

(quercetina-3-O-glicosídeo,3'-diglicosido) está presente a 47% no extrato bruto, ao perfil de inibição do composto isolado e à inibição do extrato bruto, pode-se concluir que quercetina-3-O-glicosídeo,3'-diglicosido do pólen apícola de *Zea mays* L é o responsável pela ação antiparasitária.

As concentrações a partir das quais os agentes fitoquímicos são considerados ativos e com potencial terapêutico com interesse para a indústria farmacêutica ainda não estão bem definidas. Alguns autores classificam os agentes fitoquímicos como antimicrobianos quando as concentrações inibitórias a 50% variam entre 100 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (SIMÕES *et al.*, 2009). Todavia, é aceite que aqueles cuja atividade é inferior a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para compostos puros ou isolados e até 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para misturas são os que apresentam maior interesse para o desenvolvimento de novos fármacos. Por isso concentrações superiores de *Camellia sinensis* e *Zea mays* L. não foram testadas uma vez que não foi atingida inibição a 50% para as concentrações em estudo.

Estudos revelem a ação de flavonóides contra a *G. lamblia* (BARBOSA, 2007; BAUTISTA, 2011), no entanto não há referência aos flavonóides utilizados neste trabalho assim como do pólen das espécies aqui estudadas. Embora esteja descrita a atividade de quercetina em *Giardia lamblia* (AMARAL, 2006) a quercetina-3-O-glicosídeo,3'-diglicosido, composto isolado de *Zea mays* L., possui diferenças estruturais relativamente à quercetina, nomeadamente a presença de oses nas posições 3 e 3' que podem justificar a sua baixa atividade *in vitro*. Contudo, os flavonóides *in vivo* são hidrolisados no intestino, sendo por isso expectável que a quercetina-3-O-glicosídeo,3'-diglicosido sofra hidrólise e se converta em quercetina. Assim, atendendo à facilidade de obtenção do pólen desta espécie poderá ter interesse, a nível industrial, o isolamento do composto a partir do *Zea mays* L.

**Tabela 5** – Efeito de *Camellia sinensis* e *Zea mays* L. no crescimento de *Giardia lamblia*.

| Extratos                                     | Inibição do crescimento (% do controlo) |                             |                             |
|--|---|-----------------------------|-----------------------------|
|  | 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$              | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Composto isolado de <i>Camellia sinensis</i> | 15,44                                   | 5,96                        | 11,60                       |
| Extrato bruto aquoso de <i>Zea mays</i> L.   | -                                       | -                           | 25,82                       |
| Composto isolado de <i>Zea mays</i> L.       | 20                                      | 15,70                       | 27,59                       |

# CAPÍTULO 3

## CONCLUSÃO

O pólen é uma matriz vegetal ainda pouco estudada como matéria-prima de exploração industrial para desenvolvimento de medicamentos.

Neste trabalho fez-se a análise dos flavonóides de 21 amostras provenientes de várias espécies florais de 7 países.

Selecionaram-se aquelas que poderiam conter compostos mais interessantes a nível da sua potencial bioatividade e que também podem ser adquiridas em grande quantidade. Em Portugal a espécie *Brassica napus*, no Brasil a espécie *Cocos nucifera*, na China a espécie *Camellia sinensis*, e no México a espécie *Zea mays* L.

Os compostos selecionados para atividade antibacteriana embora derivados da quercetina, do caemferol e da isoramnetina não demonstraram atividade nas condições do ensaio como era previsto.

Os flavonóides são reconhecidamente marcadores quimio-taxonómicos de plantas, em geral, sendo também verdade para os flavonóides do pólen, o que se comprovou com as amostras estudadas em análise por HPLC/DAD dos pólenes de *Cocos nucifera* e *Zea mays* L. onde se fizeram avaliações comparativas de material transgénico e híbrido.