

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIRADICALAR E ANTIMICROBIANA DO PÓLEN APÍCOLA DE FABACEAE**Francisco R. L. Caldas^a, Francisco Augusto Filho^b, Heberly T. Facundo^c, Rodolfo F. Alves^d, Francisco de A. R. dos Santos^d, Girliane R. da Silva^e, Celso A. Camara^e e Tania M. S. Silva^{e,*}**^aInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 63040-540 Juazeiro do Norte – CE, Brasil^bFaculdade de Medicina de Juazeiro do Norte, 63040-360 Juazeiro do Norte – CE, Brasil^cUniversidade Federal do Cariri, 63180-000 Barbalha – CE, Brasil^dDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil^eDepartamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife – PE, Brasil

Recebido em 03/06/2018; aceito em 25/10/2018; publicado na web em 07/11/2018

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIRADICALAR AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FABACEAE POLLEN BEE. The aim of this investigation was to analyze two samples of pollen collected by *Apis mellifera* bees in view of their chemical composition, antiradicalar and antimicrobial activities. Palynological analysis showed that the predominant pollen was Fabaceae species (42.3%, sample I and 50.6%, sample II). The characterization by ultra-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-DAD-QTOF-MS/MS) resulted in the identification of three derivatives of putrescine (di-4-coumaroylputrescine, coumaroyl-feruloyl-putrescine and di-feruloyl-putrescine), two spermidine derivatives (coumaroyl-di-cafeoyl-spermidine and tri-coumaroyl-spermidine) and four biflavonoids (2,3-di-hydroxy-amentoflavone, 2,3-dihydro-amentoflavone, amentoflavone and 2,3-dihydro-biapiogenin). The two samples showed antiradical and antimicrobial activities, probably due to the presence of these compounds.

Keywords: pollen bee; *Apis mellifera*; antioxidants; antimicrobials.**INTRODUÇÃO**

O pólen apícola é um dos mais ricos e puros suplementos alimentares naturais embalados por abelhas em grânulos e, posteriormente, colhidos a partir de colmeias por seres humanos.¹ É o resultado da aglutinação do pólen das flores, néctar e substâncias salivares das abelhas,² coletado por meio de uma grade de retenção denominado coletor de pólen. No final da coleta encontram-se reunidas as bolotas de grãos de coloração variável, indicando as diversas espécies botânicas colecionadas pelas abelhas, formando uma mistura conhecida por “mix” polínico, sendo esse material removido pelo apicultor para o beneficiamento, comercialização e consumo animal e humano.³

A apicultura é uma prática de grande potencial no Brasil devido a fatores favoráveis como o clima e a diversidade da flora.⁴ É uma das poucas atividades agropecuárias que atende aos três requisitos da sustentabilidade: o econômico, o social e o ecológico. Sendo assim, fornece renda para o apicultor, ocupa mão de obra familiar ou contratada e contribui para a preservação da flora nativa, pois é dela que são extraídos o néctar e o pólen, componentes essenciais para a vida das colméias.⁴ No nordeste brasileiro ainda predomina a obtenção de pólen apícola obtido da flora nativa.^{5,6} É uma das poucas regiões no mundo com o potencial para produzir produtos apícolas orgânicos em grande quantidade, devido à diversidade de espécies de plantas e microclimas, juntamente com vastas áreas de terras inexploradas, livre da atividade agrícola convencional.⁷

Em geral, os apicultores coletam o pólen misto (heterofloral ou multifloral), em virtude da diversidade da flora, no entanto, em determinadas épocas do ano pode ocorrer a predominância de uma espécie em floração em detrimento de outras, possibilitando a coleta do pólen unifloral ou monofloral, que apresentará uma alta frequência de pólenes de uma mesma espécie botânica. Sendo assim,

o pólen monofloral, que apresenta predominância do pólen de uma mesma espécie vegetal (maior que 45%), mantém as propriedades organolépticas e bioquímicas semelhantes às da planta inicial, ao passo que o pólen multifloral tem propriedades variáveis de mais do que duas plantas originais.^{8,9} Do ponto de vista da padronização, o pólen monofloral é importante porque somente este tipo de pólen tem composição constante e, portanto, pode ser usado com sucesso na nutrição e na medicina.^{1,9}

Os componentes majoritários do pólen apícola são açúcares (13-55%), fibras (0,3-20%), proteínas (10-40%) e lipídeos (1-10%).^{10,11} Outros componentes em menor quantidade são minerais (cálcio, manganês, magnésio, fósforo, selênio, zinco, cobre, ferro, potássio e sódio),⁷ vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido ascórbico, biotina, ácido fólico e tocoferol),¹² carotenoides, compostos fenólicos, em especial os flavonoides,^{6,11,13} esteroides e terpenos.¹

A composição química do pólen pode variar dependendo da origem vegetal e geográfica e o conjunto de outros fatores como condições climáticas, tipo de solo e das atividades do apicultor.^{1,10} Cada tipo de pólen tem suas próprias características específicas relacionadas com a genética das espécies de flores e plantações visitadas pelas abelhas e que podem influenciar nas propriedades biológicas.^{11,14} É provável que a composição do pólen apícola não se limite as proporções de diferentes flores no meio, mas sim, pelo menos até certo ponto, seja determinada pela preferência das abelhas.^{1,15}

O consumo de pólen apícola ou de seus produtos derivados, como um suplemento dietético por seres humanos, tem crescido rapidamente. Além disso, o interesse sobre o pólen vem aumentando, devido ao seu conteúdo nutricional e às atividades biológicas.^{1,11,16}

Além dos polens apícolas apresentarem potencial utilização na área farmacêutica, podem também ser agentes protetores eficientes para uso como antioxidantes naturais e antibacterianos em sistemas alimentícios, sendo estas atividades dependentes da composição química, que, por

*e-mail: sarmentosilva@gmail.com

sua vez, depende da diversidade geográfica e da origem botânica. Geralmente, as atividades antioxidantes e antimicrobianas do pólen apícola são atribuídas aos componentes fenólicos presentes.^{12,17-19}

Este trabalho é continuação dos estudos com os produtos apícolas e meliponícolas,^{6,20-27} sendo apresentadas as análises físico-químicas, químicas por Cromatografia a Líquido de Ultra-eficiência acoplada com detectores de Arranjo de Diodo e Espectrômetro de Massas tipo triploquadropolo e Tempo de Vôo (UPLC-DAD-qTOF-MS/MS), atividades antirradicalar e antimicrobiana da fração fenólica do pólen apícola de Fabaceae.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos e reagentes

Para os testes físico-químicos foram utilizados balança analítica (AW220, Shimadzu, Kyoto, Japan), balança de infravermelho (ID50, Marte, Pernambuco, Brasil), pHmetro (TEC-3MP, Tecnal, São Paulo, Brasil), mufla (1P 7000, Edgcon, São Paulo, Brasil), bloco digestor (TE-040/25GE, Tecnal, São Paulo, Brasil) e equipamento medidor da atividade de água (AquaLab 4TE, Decagon Devices, São Paulo, Brasil).

Para as análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizou-se o cromatógrafo (Shimadzu Prominence LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan), constituído por duas bombas LC-6AT, degaseificador DGU-20As, forno de coluna CTO-20AC, detector Índice de Refração RID-10A, injetor manual Rheodyne 7125i, com um loop 20 μL , ou autoinjeter (SIL-20A) e módulo de comunicação CBM-20A, controlado pelo software LcSolution. Foram usados filtros de membrana com poros de 0,45 μm de diâmetro (Supelco) para filtração das amostras e dos solventes: metanol, (J. T. Baker, Phillipsburger, EUA) e água Mili-Q (Millipore, EUA). A análise espectrofotométrica para determinação das atividades antirradicalares foi realizada no aparelho (Asys HiTech UVM 340, Biochrom, EUA), utilizando placa de 96 poços. Foram utilizados os seguintes reagentes: Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS [2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) sal de diamônio 98%], ácido gálico, ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha), carbonato de sódio e persulfato de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). As análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS foram realizadas utilizando espectrômetro de massas XEVO-G2XSQTOF (Waters, Manchester, UK) conectado ao sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, USA) via ionização por eletrospray (ESI) e detector analítico DAD (Waters Acquity), comprimento de onda 200-400 nm.

Coleta das amostras, determinação da origem botânica (análise palinológica) e extração

Duas amostras de pólen apícola desidratado de colméias de abelhas *Apis mellifera* foram coletadas no estado da Bahia, Nordeste do Brasil. As amostras foram moídas e armazenadas a $-4\text{ }^\circ\text{C}$. As análises palinológicas foram realizadas no Laboratório de Micromorfologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana. As análises seguiram a aplicação da acetólise de Erdtman (1960).²⁸ Os tipos polínicos foram identificados por comparação com lâminas depositadas na palinoteca do Laboratório de Micromorfologia Vegetal e com o auxílio dos catálogos polínicos disponíveis. Os tipos polínicos foram classificados como pólen dominante (>45%), pólen acessório ($\leq 45\% \geq 15\%$), pólen isolado importante ($\leq 15\% \geq 3\%$) e pólen isolado ocasional (< 3%).

Para a extração dos constituintes fenólicos, as amostras I (145,1 g) e II (180,6 g) foram extraídas com etanol. As soluções extrativas foram evaporadas em rotaevaporador fornecendo o extrato etanólico (amostra I= 80,7 g e amostra II=57,9 g). Para extração dos fenólicos,

10,0 g de cada amostra foram solubilizadas com metanol:água (1:1) e extraídas com hexano e acetato de etila. Os solventes foram evaporados e forneceram as frações hexânica (amostra I= 0,9 g e amostra II=0,8 g), acetato de etila rica em fenólicos (amostra I= 3,3 g e amostra II=1,5 g) e metanólica aquosa (amostra I= 5,5 g e amostra II=6,5 g).

Testes físico-químicos

A análise das características sensoriais foi realizada pelos métodos visual, olfativo e gustativo. Os testes foram realizados de acordo com o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pólen apícola.² A determinação da umidade foi feita pelo método da perda por dessecação, utilizando uma balança de infravermelho, à $105\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. A determinação potenciométrica do pH e da acidez livre foi realizada em pHmetro. A medida da acidez livre foi obtida pela titulação da suspensão com hidróxido de sódio 0,05 N até o ponto de equivalência (pH 8,5). O teor de cinzas foi determinado pelo método de resíduo por incineração, para o qual pesaram-se 2,0 g da amostra em uma cápsula de porcelana, que foram previamente carbonizados em chapa aquecedora e, em seguida, incinerados em mufla à $550\text{ }^\circ\text{C}$, por 4 horas ou até eliminação completa do carvão. A atividade de água (Aw) foi feita utilizando um equipamento medidor da atividade de água (AquaLab 4TE).

Determinação de açúcares por HPLC-RI

Para análises dos açúcares presentes no pólen apícola, as amostras foram extraídas com água e os extratos aquosos foram liofilizados. As soluções dos extratos aquosos foram preparadas na concentração de 40,0 mg mL^{-1} , diluídas com a fase móvel e filtradas. Utilizou-se uma coluna (Rezex RCM – Monosacarídeo Ca^{2+} (8%), 300 mm x 7,8 mm x 8 μm , Phenomenex), temperatura de $85\text{ }^\circ\text{C}$, fluxo de 0,6 mL min^{-1} e como fase móvel água com 5% de MeOH, em modo isocrático. Para quantificação, foi feita a curva de calibração dos padrões glicose e frutose nas concentrações 20,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,25 mg mL^{-1} . O volume injetado foi de 20 μL para padrão e amostras. A detecção foi feita com um detector de índice de refração.

Determinação do teor de fenólicos totais e atividade antirradicalar

O teor de fenólicos totais foi realizado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu.²⁹ Brevemente, 50 μL da fração AcOEt dos polens apícolas foram misturados com 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 500 μL de Na_2CO_3 (1,0 mg mL^{-1}) e deixados no escuro por uma hora. Após este tempo a absorbância foi lida em 760 nm. Foi construída uma curva com ácido gálico.

O teste com o DPPH foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al.*²⁰ As soluções das frações AcOEt foram preparadas na concentração de 5,0 g. mL^{-1} . Foram adicionadas concentrações apropriadas da solução de DPPH (23,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em EtOH) o volume foi completado com EtOH. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultrassom ao abrigo da luz, a quantidade de radicais de DPPH foi registrada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 517 nm. A percentagem da atividade sequestradora foi calculada pela equação: % AS= $100 \times \Delta\text{hx}/\text{hc}$, hc = absorbância controle, hx = absorbância teste, $\Delta\text{hx} = \text{hc} - \text{hx}$. Foi utilizado ácido ascórbico como controle positivo.

O ensaio de descoloração do ABTS foi realizado de acordo com Silva *et al.*²⁰ O radical ABTS foi preparado adicionando 5 mL da solução de ABTS 7 mmol L^{-1} com 88 μL da solução de persulfato de potássio 140 mmol L^{-1} , reagindo durante 14 horas ao abrigo da

luz. Para o ensaio, 1 mL da solução do radical ABTS foi diluída em EtOH até obter uma absorbância $\pm 0,7$ a 734 nm. Foram preparadas soluções das amostras na concentração de 5,0 g mL⁻¹. Quantidades apropriadas foram misturadas com a solução de ABTS. Como controle positivo foi utilizado o trolox. Após 6 minutos de agitação em aparelho de ultrassom ao abrigo da luz a quantidade de radicais de ABTS foi registrada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 734 nm. A percentagem da atividade sequestradora foi calculada pela equação: % AS = 100 x Δh_x / hc, hc = absorbância controle, hx = absorbância teste, Δh_x = hc-hx.

Análises por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Acquity BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m, Waters, EUA) a 40 °C. A fase móvel binária consistiu de água com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi de 5,0 μ L. O gradiente de eluição utilizado foi: 0,0-8,0 min 10%-50% de B; 8,0-9,0 min, 50%-95% de B e em 9,1 min 10% de B, o monitoramento foi feito a 340 nm. O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo de ionização (ESI) no modo sensibilidade. A detecção foi realizada no modo centróide MS^E em uma faixa de massa escolhida entre os valores de m/z 50-1200 Da. Todas as análises foram realizadas utilizando o lockspray para garantir a precisão e reprodutibilidade dos valores de massas. Leucina-encefalina (10 ng mL⁻¹) foi utilizado como padrão/referência para calibração. A aquisição e análise dos dados foi realizada utilizando o software Waters MassLynx.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada a partir do método de microdiluição em caldo, modificado a partir do documento da CLSI/NCCLS M7-A6 para bactérias.³⁰ Foram utilizadas linhagens padrão (ATCC), sendo uma Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e Gram-negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922. Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas linhagens padrão provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), sendo avaliadas *Candida albicans* ATCC 36232, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 34135, *C. tropicalis* ATCC 13803. As leveduras foram cultivadas e mantidas em meio ágar Sabouraud. A atividade antifúngica dos extratos foi determinada através do método de microdiluição em caldo, conforme protocolo M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS).³⁰ As amostras foram testadas nas concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 μ g mL⁻¹, onde volumes de 100 μ L da suspensão leveduriforme foram inoculados em microplacas contendo 100 μ L Sabouraud, incubadas a 37 °C por 48 h, seguindo o processo de diluição seriada, foi retirada 100 μ L da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra.

Análises estatísticas

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão da média. Foi utilizado o programa Microsoft Excel software package (Microsoft Corp., Redmond, WA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises palinológicas para as duas amostras mostraram a predominância de pólen da família Fabaceae. A amostra

I apresentou percentual de 42,3% e a amostra II 50,6%, sendo essa última amostra considerada monofloral (pólen apícola com mais de 45% de grãos de pólen de uma mesma espécie botânica). Nove famílias de espécies vegetais apareceram nas duas amostras de pólen (Anacardiaceae, Aquifoliaceae, Arecaceae, Asteraceae, Dilleniaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malpighiaceae e Sapindaceae). O segundo pólen mais predominante nas duas amostras foi da Família Dilleniaceae (26,6 % para I e 14,3 % para II). O gráfico com a percentagem dos polens está na Figura 1.

Os dados sobre a origem botânica para o pólen apícola são muito importantes porque permitem o entendimento sobre as interações ecológicas entre as plantas e os polinizadores. A identificação taxonômica sobre as espécies que compõem a flora de uma determinada região fornece informações essenciais sobre os recursos naturais disponíveis e as características ecológicas de um determinado *habitat* ou ecossistema, além disso, a identificação das plantas apícolas é de extrema importância para os apicultores, pois indica as fontes alimentares utilizadas para a coleta de néctar e pólen pelas abelhas.³¹ É interessante notar que os produtos apícolas oriundos da caatinga apresentam em sua maioria a predominância de pólen de espécies de Fabaceae, pois espécies dessa família são comumente encontradas na região Nordeste, principalmente em regiões secas como a caatinga.³² Vinte e duas amostras da própolis produzida por *Apis mellifera* em uma região do semiárido no Estado da Bahia (Agreste de Alagoinhas), Brasil, foram analisadas palinologicamente e a família Fabaceae foi a mais representativa neste estudo com nove tipos de polens, sendo o tipo *Mimosa pudica* presentes em todas as amostras analisadas.³² Amostras de polens^{20,27} e méis²² coletados pelas abelhas sem ferrão jandaíra (*Melipona subnitida*) também apresentaram predominância de polens de espécies de Fabaceae, com preferência para espécies do gênero *Mimosa* (comumente conhecidas como “jurema”).³³

As análises físico-químicas dos polens apícolas são importantes para atestar os padrões de qualidade, principalmente para polens monoflorais. De acordo com a origem polínica, estação e a região de coleta, o pólen pode apresentar uma composição variável, como teor de lipídeos, proteínas, açúcares, etc. Para a regulamentação dos testes físico-químicos, no Brasil existe o Anexo V da Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001,² que é um regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pólen apícola. Para as duas amostras do pólen de Fabaceae foram realizados os testes físico-químicos e os resultados estão na Tabela 1. Na análise sensorial as amostras apresentaram grãos heterogêneos, de forma e tamanhos variados, tendendo a esféricos, cor amarelo claro, aroma característico e sabor doce, livres de impurezas como partes de abelha, cera, partículas de plantas ou outras matérias estranhas. Os parâmetros avaliados atendem às especificações exigidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com exceção da umidade, cujo teor é resultante do processo de secagem empregado nos apiários e passível de ajustes para adequação. O atendimento à norma do MAPA é o primeiro passo para comercialização do pólen apícola no mercado.

A análise e quantificação dos açúcares livres nas duas amostras do pólen apícola foi realizada por HPLC-IR. Os dois principais açúcares do pólen de Fabaceae são a glicose e frutose e a quantidade em miligramas por grama de pólen de glicose foi de 76,9 \pm 19,56 mg.g⁻¹, na amostra I e 104,6 \pm 6,40 mg.g⁻¹ na amostra II. Já a quantidade frutose foi de 76,9 \pm 19,79 mg.g⁻¹ na amostra I e 103,4 \pm 1,97 na amostra II (Tabela 2).

Os açúcares correspondem em média a 35% da composição do pólen apícola, sendo o maior contribuinte para o valor energético total. O néctar é a fonte principal de açúcares na dieta das abelhas, mas o pólen das flores também contém açúcares solúveis simples constituídos predominantemente por mono e dissacarídeos.³⁴ Nossos

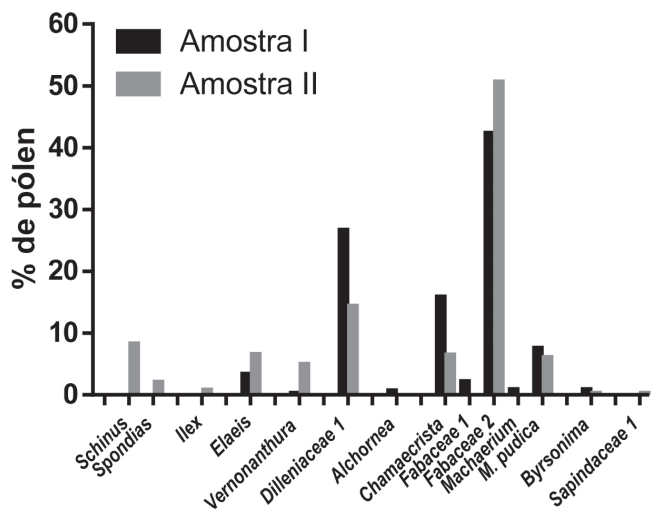


Figura 1. Espécies vegetais encontradas nas amostras de pólen através das análises palinológicas

resultados estão em conformidade com a literatura, cujos estudos demonstram que frutose e glicose são os açúcares livres presentes em maiores concentrações no pólen apícola (*Apis mellifera*), enquanto a sacarose pode estar presente em menores quantidades. Possivelmente, a hidrólise enzimática da sacarose realizada pelas abelhas contribui para o elevado teor de monossacarídeos.³⁵ A composição dos carboidratos foi analisada em 28 amostras de pólen apícolas da Slovenia, destas, 10 amostras foram classificadas como monoflorais. Os monossacarídeos representaram 96% da fração de açúcares, com uma variação de 13,2-27,8 g por 100 g do peso seco para frutose e 10,6-28,5 g por 100 g do peso seco para glicose.³⁶

Os compostos fenólicos foram tentativamente identificados no pólen apícola de Fabaceae por UPLC-DAD-ESI-QTOF/MS/MS. As duas amostras apresentaram um perfil químico semelhante. Na Tabela 3 estão dispostos os dados obtidos pela análise dos espectros dos íons produtos de cada substância. Os espectros de massas das substâncias estão nas Figuras 1S a 10S. Foram identificados 9 compostos fenólicos, sendo três derivados da putrescina (**1**, **2** e **3**), dois derivados da espermidina (**4** e **6**) e quatro biflavonoides (**5**, **7**, **8** e **9**). Os compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **6** mostraram absorções típicas no UV indicativos de derivados de ácidos cinâmicos (Tabela 3). O composto **1** (tR 3,90 min, $\lambda_{\text{max}} = 293$ nm) apresentou o pico da molécula desprotonada em m/z 379,1661 [M-H]⁻ em ESI no modo negativo com o íon produto em m/z 162,0560 [M-H-coumaroil-C₄H₇N]⁻ característico de um derivado de ácido cinâmico. Baseado nestes dados e com os valores dos íons produtos em 259,1336 [M-H-(4-etenil-fenol)]⁻, 233,1336

[M-H-coumaroil]⁻ foi possível identificar **1** como sendo um conjugado de ácido cinâmico com a putrescina, di-4-coumaroilputrescina.³⁷ Os compostos **2** (tR 4,10 min, $\lambda_{\text{max}} = 308$ nm) e **3** (tR 4,27 min, $\lambda_{\text{max}} = 317$ nm) apresentaram os picos das moléculas desprotonadas em m/z 409,1764 [M-H]⁻ e m/z 439,1874 [M-H]⁻. Quando comparados com a substância **1** (di-4-coumaroil-putrescina), apresentam diferença de m/z 30 Da e 60 Da a mais. Estes dados permitem atribuir aos compostos **2** e **3** a presença adicional de uma e duas metoxilas, respectivamente. Os íons produtos característicos para **2** em m/z 289,1184 [M-H-(4-etenil-fenol)]⁻, m/z 259,1081 [M-H-(5-etenil-metoxi-fenol)]⁻, m/z 274,0939 [M-H-CH₃-(4-etenil-fenol)]⁻ e m/z 162,8399 [M-H-feruloil-C₄H₇N]⁻ permite identificar **2** como sendo o conjugado coumaroil-feruloil-putrescina. O composto **3** foi identificado como di-feruloil-putrescina e apresentou os íons produtos m/z 289,1184 [M-H-(5-etenil-metoxi-fenol)]⁻ e m/z 149,0597 [M-H-feruloil-putrescina-CO-CH₃]⁻.

Os picos **4** e **6** apresentaram os picos em m/z 614,2501 [M-H]⁻ e m/z 582,2607 [M-H]⁻, respectivamente. Os padrões de fragmentação destes compostos (Tabela 3) são característicos de espermidina ligada a derivados de ácidos cinâmicos. O composto **4** apresentou o íon produto em m/z 358,1376 [M-H]⁻, que indica a presença de dois grupos cafeoil (2x179 Da), e o composto **6** mostrou o íon produto em m/z 162,8391 [M-H]⁻, característico de um grupo coumaroil. Com estes dados a substância **4** foi identificada como coumaroil-di-cafeoil espermidina e o **6** como N¹,N⁵,N¹⁰-tricoumaroil espermidina.

Os fenólicos **5**, **7**, **8** e **9** foram tentativamente identificados como biflavonoides. O pico **8** em m/z 537,0827 [M-H]⁻ produziu os íons produtos em m/z 443,0394 [M-H-C₇H₆O₃]⁻, m/z 417,0592 [M-H-C₇H₆O₃]⁻, m/z 375,0483 [M-H-C₁₀H₆O₅]⁻, m/z 309,0384. O íon m/z 443,0394 é o resultado da perda neutra do fenol da parte II do flavonoide (Espectro e fragmentos iônicos demonstrado na Figura 9S-A e B). O íon produto em m/z 375,0483 [M-H-C₁₀H₆O₅]⁻ é devido a retrociclicação envolvendo a parte II do flavonoide (Figura 9S-B). Os dados de massas estão de acordo com Yao et al.³⁸ e permitem identificar o biflavonoide **8** como sendo a amentoflavona. Os biflavonoides **5** e **7** são derivados da amentoflavona, sendo que o **5** m/z 555,0934 [M-H]⁻ apresentou uma hidroxila adicional e o **7** m/z 539,0994 [M-H]⁻ dois hidrogênios a mais que amentoflavona (**8**). Os espectros de massas estão nas Figuras 8S (A e B) e 10S (A e B), respectivamente. O biflavonoide **7** é o composto mais abundante na fração acetato de etila do pólen apícola de Fabaceae e foi tentativamente identificado como sendo 2,3-dihidro-amentoflavona. A posição da ligação dihidro entre os carbonos 2 e 3 dos dois biflavonoides (**5** e **7**) podem estar localizadas tanto na unidade do flavonoide I (2 e 3) quanto em II (2'' e 3'') que constituem os biflavonoides, não sendo possível definir a posição certa somente com os dados obtidos por massas. Os biflavonoides 5''-hidroxiaamentoflavona, 2,3-dihidroamentoflavona e amentoflavona já foram isolados e identificados nos grãos de pólen de *Cryptomeria japonica*.³⁹

Tabela 1. Análises físico-químicas das amostras de pólen apícolas (Média ± D.P)

Amostras	Umidade	Cinzas	Atividade de Água	pH	Índice de acidez
	Máx 4% ^a	Máx 4% ^a	-	4 a 6 ^a	Máx 300 mEq/kg ^a
Amostra I	6,5 ± 0,04	1,5 ± 0,44	0,3 ± 0,00	5,2 ± 0,02	146,6 ± 0,64
Amostra II	6,5 ± 0,35	2,0 ± 0,35	0,3 ± 0,00	5,1 ± 0,01	143,1 ± 0,64

Tabela 2. Análise de açúcares no pólen apícola de Fabaceae

Amostras	Glicose		Frutose		G+F mg g ⁻¹	F/G
	mg g ⁻¹	%	mg g ⁻¹	%		
Amostra I	76,9±19,56	7,7±1,96	76,9±19,79	7,7±1,98	153,8	1,0
Amostra II	104,6±6,40	10,5±0,64	103,4±1,97	10,3±0,20	208,0	1,0

O biflavonóide **9** m/z 539,0980 [M-H]⁻ é um isômero de **7**. Os fragmentos iônicos permitem tentativamente identificar **9** como sendo 2,3-dihidro-biapiigenina. Possivelmente a ligação pode ser do tipo IC3'-IIC3'''. Esta afirmação é suportada pelos fragmentos iônicos obtidos quando comparados com o mesmo composto reportado por Yao *et al.*³⁸ Os íons produtos em m/z 413,0647 e m/z 387,0857 são devido a ruptura da ligação por Retro-Diels-Alder (RDA) comum em flavonoides (Figura 10S-B). Estes dados estão de acordo com Yao *et al.*³⁸ De forma semelhante que os compostos **5** e **7**, a posição da ligação dihidro (2,3 ou 2'',3'') não pode ser definida com os dados somente de massas para o composto **9**.

Os compostos do tipo acil (derivados do ácido cinâmico) conjugados com esperminas e espermidinas já foram relatados em pólen apícola. Os derivados N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-coumaroil espermidina,⁴⁰ N^1, N^5, N^{10}, N^{14} -tetra-*p*-coumaroil espermina e monocafeoil-tri-*p*-coumaroil espermina foram isolados de pólen apícola brasileira.⁴¹ Já os derivados de acil-espermidinas: N', N'', N''' -tris-cafeoil espermidina, N', N'' -dicafeoil, N''' -coumaroil espermidina N', N'' -dicafeoil, N''' -feruloil espermidina, N' -cafeoil- N'' -feruloil, N''' -coumaroil espermidina N' -cafeoil- N'' , N''' -dicoumaroil espermidina, N', N'', N''' -tris-*p*-coumaroil espermidina, N', N'', N''' -tris-*p*-feruloil espermidina⁴² foram identificados em uma amostra de pólen apícola de coqueiro coletado na cidade de Canavieiras, Bahia.

Espécies da família Fabaceae são conhecidas por apresentarem, além de flavonoides, biflavonoides e bichalconas. Em relação à presença de biflavonoides em Fabaceae de ocorrência na região

semiárida do Nordeste brasileiro, recentemente foram isolados novos biflavonóides das raízes do caule de *Poincianella pyramidalis*, uma espécie endêmica da caatinga⁴³ e das folhas de *Caesalpinia pyramidalis*.⁴⁴

Os métodos utilizados para a medida da atividade antiradicalar foram com os radicais livres ABTS e DPPH, considerados sensíveis e precisos- pois o sistema de reação envolve apenas o radical e o antioxidante e são bastante utilizados para determinar a atividade antioxidante em alimentos e amostras biológicas.⁴⁵ Na Tabela 4 os resultados obtidos demonstram que a amostra II apresentou maior potencial antioxidante, apresentando maior teor de fenólicos e menor CE₅₀ no ensaio DPPH e ABTS.

O pólen de abelha e outros produtos como mel e geoprópolis tem tido o seu potencial antioxidante atribuído a quantidade de conteúdo fenólico, principalmente flavonoides, cuja variação é relacionada com a origem das espécies botânicas que caracterizam estes produtos.^{24,46-50} Meneses *et al.*⁵¹ estudaram a neutralização do radical DPPH de amostras pólen apícola do tipo *Mimosa pudica* apresentando significativa atividade sequestrante de radicais. Moreira *et al.*⁵² demonstraram que a concentração de fenólicos totais na própolis portuguesa apresentou uma forte correlação com a atividade antioxidante. Fatrcová-Šramková *et al.*,⁵³ comparando pólen apícola de papoula com pólen de abelha de girassol, relataram que o de papoula, com maior teor de polifenóis, apresentou maior atividade antibacteriana. Carpes *et al.*,⁴⁹ analisando amostras de pólen coletadas nas cidades de Contagem (MG), Saúde (BA),

Tabela 3. Caracterização dos compostos do pólen apícola de Fabaceae por UHPLC-DAD-QTOF-MS-MS

	TR	λ_{\max}	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻ calculado	Erro (ppm)	MS/MS	Identificação
1	3,90	293	379,1661	379,1663	0,5	259,1336 [M-H-(4-etenil-fenol)] ⁻ ; 233,1336 [M-H-coumaroil] ⁻ ; 162,0560 [M-H-coumaroil- ^c ₄ H ₇ N] ⁻	Di-4-coumaroil-putrescina
2	4,10	308	409,1764	409,1768	0,9	289,1184 [M-H-(4-etenil-fenol)] ⁻ ; 274,0939 [M-H-CH ₃ -(4-etenil-fenol)] ⁻ ; 259,1081 [M-H-(4-etenil-metoxi-fenol)] ⁻ ; 162,8399 [M-H-feruloil- ^c ₄ H ₇ N] ⁻	Coumaroil-feruloil-putrescina
3	4,27	317	439,1870	439,1874	0,9	289,1184 [M-H-(4-etenil-metoxi-fenol)] ⁻ ; 149,0597 [M-H-feruloil-putrescina-CO-CH ₃] ⁻	Di-feruloil-putrescina
4	4,30	314	614,2501	614,2507	0,9	478,1979 [M-H-(4-etenil-hidroxi-fenol)] ⁻ ; 452,2225 [M-H-cafeoil] ⁻ ; 289,1162 [M-H-dicafeoil] ⁻	Coumaroil-dicafeoil-espermidina
5	4,93	296,326	555,0934	555,0932	-0,3	527,1017 [M-H-CO] ⁻ ; 469,0927 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻ ; 351,0493 [M-H-CO ₂ -3C ₂ 4H ₂ O] ⁻ ; 309,0396	2,3-dihidro-hidroxi-amentoflavona
6	5,02	294	582,2607	582,2609	0,5	462,2025 [M-H-(4-etenil-fenol)] ⁻ ; 342,1445 [M-H-2x(4-etenil-fenol)] ⁻	Tricoumaroil-espermidina
7	5,92	293	539,0994	539,0983	-2,0	495,1044 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 453,0262 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻ ; 351,0491 [M-H-CO ₂ -3C ₂ 4H ₂ O] ⁻	2,3-dihidro-amentoflavone
8	6,08	267, 336	537,0827	537,0827	0,0	443,0394 [M-H-C ₇ H ₆ O ₃] ⁻ ; 417,0592 [M-H-C ₇ H ₆ O ₃] ⁻ ; 375,0483 [M-H-C ₁₀ H ₆ O ₅] ⁻ ; 309,0384	Amentoflavona
9	6,35	284, 328	539,0980	539,0983	0,5	413,0647 (fragmento RDA); 387,0857 (fragmento RDA)	2,3-dihidro-biapiigenina

São Cristóvão (SE) e Maceió (AL), relacionaram que compostos bioativos além dos flavonoides são responsáveis pela atividade antioxidante.

Tabela 4. Teor de fenólicos totais e atividade sequestradora de radicais livres

	Fenólicos totais (mg GAE g ⁻¹ extrato)	DPPH CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	ABTS CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)
Amostra I	625,67 ± 11,20	979,3 ± 3,90	65,95 ± 1,20
Amostra II	858,00 ± 16,17	120,80 ± 1,23	36,63 ± 1,27
Ácido ascórbico		45,6 ± 1,81	
Trolox			0,735 ± 0,151

As amostras dos polens apícolas de Fabaceae apresentam em sua composição química a presença de flavonóides e conjugados acil-aminas. Os biflavonoides como a amentoflavona têm exibido uma ampla variedade de atividades biológicas, principalmente características sequestrantes de radicais livres, antiinflamatória e antimicrobiana.^{50,54-56} Li *et al.*⁵⁷ sugerem que a amentoflavona pode efetivamente proteger contra o dano oxidativo ao DNA (ácido desoxirribonucleico), tendo seu efeito protetor atribuído principalmente a sua capacidade antioxidante devido a porção fenólica. Para as poliaminas presentes têm-se atribuído propriedades antioxidantes, agindo sobre espécies envolvidas na peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados.^{58,59} Drolet *et al.*⁶⁰ também observaram que espermina, espermidina, putrescina e cadaverina são eficientes sequestradores de radicais livres gerados em vários sistemas químicos e enzimáticos *in vitro*. Os compostos derivados de ácidos cinâmicos conjugados com espermidinas isolados do pólen apícola brasileiro já são conhecidos por apresentar atividades antiradicalar e antioxidante.⁴⁰ Os compostos monocateoil-espermina mostrou alta atividade antiradicalar e tri-*p*-coumaroil-espermidina apresentou forte atividade antioxidante.⁴¹

O estudo da atividade antimicrobiana de pólen apícola tem despertado interesse. Amostras de pólen de *Castanea sativa* coletadas na região do Mar Negro, Turquia, apresentaram atividade antimicrobiana seletiva e eficaz contra as cepas bacterianas e de leveduras avaliadas.⁶¹ Basim *et al.*⁶² avaliaram a atividade antibacteriana do pólen da Turquia contra diferentes bactérias patogênicas que causam doenças a frutas e vegetais, propondo o uso do pólen como agente protetor no manejo de culturas na agricultura.⁶² Morais *et al.*,¹⁹ analisando pólen apícola heterofloral na região de Portugal, concluíram que não houve relação entre conteúdos fenólicos e atividade antimicrobiana.

A Tabela 5 mostra os resultados que demonstram que a fração AcOEt do pólen apícola de Fabaceae apresenta atividade frente à cepas de bactérias e fungos. A amostra II, com maior conteúdo fenólico e maior atividade sequestrante de radicais, também apresentou os

melhores resultados frente às bactérias. Nossos resultados corroboram aos encontrados por Carpes *et al.*,⁶³ nos quais extratos de polens em diferentes concentrações etanólicas exibiram diferentes atividades antioxidantes e antibacterianas, o que foi relacionado com o diferente conteúdo fenólico extraído. Alguns estudos também têm sugerido a relação da atividade antimicrobiana com o total de compostos fenólicos presentes.^{47,52} A atividade antimicrobiana encontrada pode ser justificada pela presença de poliaminas conjugadas com derivados de ácidos cinâmicos e biflavonoides. Nayaka *et al.*,⁶⁴ avaliando a atividade antimicrobiana da apigenina, constataram que o flavonoide foi mais ativo contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas, atribuindo essa diferença a diversas razões tais como complexidade da parede celular ou a presença de enzimas no espaço periplasmático. Morimoto *et al.*⁶⁵ indicam a apigenina como um novo antibiótico capaz de ser alternativa a resistência a quinolonas. As poliaminas biológicas, como a espermidina e putrescina, têm tido comprovada eficácia contra vários microorganismos,^{66,67} embora estudos sugiram que também estejam envolvidos em algumas rotas de defesa dos próprios microorganismos contra antibióticos.^{68,69}

CONCLUSÃO

As análises palinológicas mostraram que a origem botânica predominante nas duas amostras de polens são da família Fabaceae. Pela análise de UPLC-DAD-qTOF-MS/MS foi possível identificar nove principais substâncias, sendo três derivados da putrescina (di-4-coumaroil-putrescina, coumaroil-feruloil-putrescina e di-feruloil-putrescina), dois derivados da espermidina (coumaroil-dicafeoil-espermidina e tricoumaroil-espermidina e quatro biflavonoides (2,3-dihidro-hidroxi-amentoflavona, 2,3-dihidro-amentoflavone, amentoflavona, 2,3-dihidro-biapigenina). As duas amostras apresentaram atividades antiradicalares e antimicrobianas, provavelmente devido à presença destes compostos. O pólen apícola já considerado alimento funcional apresenta potencial para a produção de produtos tecnológicos com valor nutricional, rico em antioxidantes e com capacidade antimicrobiana, uma matriz importante para a indústria alimentícia e farmacêutica.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Cromatogramas e espectros de massas MS/MS das análises (Figuras 1S-A e B a 10S-A e B,) estão disponíveis em <http://www.quimicanova.s bq.org.br>, em formato PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Este projeto foi financiado pelo CNPq-Renorbio-Pindorama (Processo número 407659/2013-7) e FACEPE-PRONEM (Processo número 0741.1.06/14). Os autores agradecem ainda à CAPES e ao CENAPESQ-UFRPE.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana das frações acetato de etila do pólen apícola de Fabaceae

Microorganismo	Concentração Inibitória Mínima (CIM, µg/mL)			
	Fabaceae I	Fabaceae II	Cetoconazol	Meropenem
<i>C. albicans</i> ATCC 36232	512	512	≤ 16	-
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	>1024	1024	≤ 16	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1024	>1024	≤ 16	-
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	256	512	≤ 16	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	128	64	-	4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	128	64	-	4

REFERÊNCIAS

1. Bogdanov, S.; *Pollen: Production, Nutrition and Health – A Review*; Bee Product Science, www.bee-hexagon.net, 2017.
2. Instrução Normativa N° 3, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, 19 de janeiro de 2001, publicado no Diário Oficial da União em 23 de janeiro de 2001.
3. Barreto, L. M. C.; Funari, S. R. C.; Orsi, R. O.; *Bol. Ind. Anim.* **2005**, *62*, 167.
4. Paula-Neto, F. L.; Almeida-Neto, R. M. A.; *Apicultura nordestina: principais mercados, riscos e oportunidades*, Série Documentos do ETENE n. 12, Banco do Nordeste do Brasil: Fortaleza, 2006.
5. Novais, J. S.; Lima, L. C. L.; Santos, F. A. R.; *Grana* **2009**, *48*, 224.
6. Freire, K. R. L.; Lins, A. C.; Dórea, M. C.; Santos, F. A.; Camara, C. A.; Silva, T. M. S.; *Molecules* **2012**, *17*, 1652.
7. Morgano, M. A.; Martins, M. C. T.; Rabonato, L. C.; Milani, R. F.; Yotsuyanagi, K.; Rodriguez-Amaya, D. B.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 727.
8. Yang, L.; Yan, Q. H.; Ma, J. Y.; Wang, Q.; Zhang, J. W.; Xi, G. X.; *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 771.
9. Silva, G. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, 2014.
10. Feás, X.; Vázquez-Tato, M. P.; Estevinho, L.; Seijas, J. A.; Iglesias, A.; *Molecules* **2012**, *17*, 8359.
11. Komosinska-Vassev, K.; Olczyk, P.; Kazmierczak, J.; Mencner, L.; Olczyk, K.; *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, ID 297425.
12. Arruda, V. A. S. A.; Pereira, A. A. S.; Freitas, A. S.; Barth, O. M. B.; Almeida-Muradian, L. B.; *J. Food Comp. Anal.* **2013**, *29*, 100.
13. Campos, M. G. R.; Bogdanov, S.; Almeida-Muradian, L. B.; Szczesna, T.; Manceo, Y.; Frigerio, C.; Ferreira, F.; *J. Apic. Res.* **2008**, *47*, 154.
14. Carpes, S. T.; Alencar, S. M.; Beghini, R.; De Alencar, M. S.; Masson, M. L.; *Ciênc. Agropec.* **2007**, *31*, 1818.
15. Carpes, S. T.; Alencar, S. M.; Cabral, I. S. R.; Oldoni, T. L. C.; Mourão, G. B.; Haminiuk, C. W. I.; Luz, C. F. P.; Masson, M. L.; *CyTA--J. Food* **2013**, *11*, 150.
16. Ulusoy, E.; Kolayli, S.; *J. Food Biochem.* **2013**, *38*, 73.
17. Mohdaly, A. A. A.; Mahmoud, A. A.; Roby, M. H. H.; Smetanska, I.; Ramadan, M. F.; *J. Food Biochem.* **2015**, *39*, 538.
18. Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X.; Estevinho, L. M.; *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *63*, 233.
19. Morais, M.; Moreira, L.; Estevinho, L. M.; *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1096.
20. Silva, T. M. S.; Camara, C. A.; Da Silva, L. A.; Barbosa-Filho, J. M.; Da Silva, E. M. S.; Freitas, B.; Santos, F. A. R.; *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 507.
21. Silva, T. M. S.; Camara, C. A.; Lins, A. C.; Agra, M. F.; Silva, E. M. S.; Reis, I. T.; Freitas, B. M.; *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2009**, *81*, 173.
22. Silva, T. M. S.; Santos, F. P.; Rodrigues, A.; Silva, E. M. S.; Silva, G. S.; Novais, J. S.; Santos, F. A. R.; Camara, C. A.; *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *29*, 10.
23. Da Silva, I. A. A.; Silva, T. M. S.; Camara, C. A.; Queiroz, N. M. M.; De Novais, J. S.; Soledade, L. E. B.; Lima, E. O.; De Souza, A. L.; De Souza, A. G.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 3552.
24. Souza, S. A.; Camara, C. A.; Silva, E. M. S.; Silva, T. M. S.; *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, ID 801383.
25. Alves de Souza, S.; Silva, T. M. G.; Camara, C. A.; Silva, E. M. S.; Silva, T. M. S.; *Phytochem. Anal.* **2018**, *29*, 1.
26. Silva, T. M. S.; Souza, S. A.; Dias, T. L. M.; Camara, C. A.; *Sociobiology* **2014**, *61*, 560.
27. Silva, G. R.; Natividade, T. M.; Camara, C. A.; Da Silva, E. M. S.; Santos, F. A. R.; Silva, T. M. S.; *Food Nutr. Sci.* **2014**, *5*, 1015.
28. Erdtman, G.; *Sven. Bot. Tidskr.* **1960**, *54*, 561.
29. Singleton, V. L.; Joseph, A.; Rossi, J.; *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144.
30. *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005, p. 23.
31. Menezes, J. D. S.; Maciel, L. F.; Miranda, M. S.; Druzian, J. I.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* **2010**, *69*, 233.
32. Fabaceae in Flora do Brasil 2020, under construction, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>, acessado em Setembro 2018.
33. Matos, V. R.; Alencar, S. M.; Santos, F. A. R.; *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2014**, *86*, 407.
34. Anderson, G. J.; Bernardello, G.; Stuessy, T. F.; Crawford, D. J.; *Am. J. Bot.* **2001**, *88*, 220.
35. Cane, J. H.; Gardner, D. R.; Harrison, P. A.; *Apidologie.* **2011**, *42*, 401.
36. Bertoneclj, J.; Polak, T.; Pucihar, T.; Lilek, N.; Kandolf, B.; Korosec, M.; *Int. J. Food Sci. Technol.* *53*, 1880.
37. Elejalde-Palmett, C.; Bernonville, T. D.; Glevarec, G.; Papon, O. P. N.; Courdavault, V.; St-Pierre, B.; Lanoue, N. G. A.; Besseau, S.; *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 7271.
38. Yao, H.; Chen, B.; Zhang, Y.; Ou, H.; Li, Y.; Li, S.; Shi, P.; Lin, X.; *Molecules* **2017**, *22*, 325.
39. Ohmoto, T.; Yoshida, O.; *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 919.
40. Negri, G.; Teixeira, E. W.; Alves, M. L. T. M. F.; Moreti, A. A. C. C.; Otsuk, P. I.; Borguini, R. G.; Salatino, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5516.
41. Ohta, H.; Fujimaktz, T.; Uyz, M. M.; Yanaix, M.; Yuki-yoshi, A.; Hirata, T.; *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21*, 726.
42. Negri, G.; Barreto, L. V. R. C.; Sper, F. L.; Carvalho, C.; Campos, M. G. R.; *Braz. J. Food Technol.* **2018**, e2016176.
43. Oliveira, J. C.; David, J. P.; David, J. M.; *Phytochem. Lett.* **2016**, *18*.
44. Bahia, M. V.; Santos, J. B.; David, J. P.; David, J. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1402.
45. Boylan, F.; Menezes, S.; Leita, G. G.; *Phytother. Res.* **2015**, *130*, 27.
46. Souza, S. A.; Silva, T. M. G.; Camara, C. A.; Silva, E. M. S.; Silva, T. M. S.; *Phytochem. Anal.* **2018**, *29*, 1.
47. Araújo, J. S.; Chambó, E. D.; Costa, M. A. P. C.; Cavalcante, S. S. M. P.; Lopes, C. C. A.; Estevinho, L.; *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 921.
48. Da Cunha, M. G.; Franchin, M.; Galvão, L. C.; De Ruiz, A. L.; De Carvalho, J. E.; *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 242.
49. Carpes, S. T.; De Alencar, M. S.; Masson, M. L.; *Braz. J. Food Technol.* **2009**, *12*, 220.
50. Ferreira, R. O.; De Carvalho, M. G.; Silva, T. M. S.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2271.
51. Menezes, J. D. D. S.; Maciel, L. F.; Miranda, M. S.; Druzian, J. L.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2010**, *69*, 233.
52. Moreira, L.; Dias, L. G.; Pereira, J. A.; Estevinho, L.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 3482.
53. Fatrová-Šramková, K.; Nůžková, J.; Kačániová, M.; Máriássyová, M.; Rovná, K.; Stričík, M.; *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2013**, *48*, 133.
54. González-Gallego, J.; Sánchez-Campos, S.; Tunon, M.; *J. Nutr. Hosp.* **2007**, *22*, 287.
55. Kim, H. P.; Son, K. H.; Chang, h.W.; Kang, S. S.; *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 229.
56. Lima, R. R.; Costa, A. M. R.; Souza, R. D.; Gomes-Leal, W.; *Rev. Para. Med.* **2007**, *21*, 29.
57. Li, X. Li.; Wang, L.; Han, W.; Mai, W.; Chen, D.; *Turk J. Biochem.* **2014**, *39*, 30.
58. Lovaas, E.; Carlin, G.; *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 455.
59. Stevanato, R.; Bertelle, M.; Fabris, S.; *Pharmacol. Pharm.* **2013**, *4*, 696.
60. Drolet, G.; Dumbrof, E. B.; Legge, R. L.; Thompson, J. E.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 367.
61. Avsar, C.; Ozler, H.; Berber, I. Civek, S.; *Int. Food Res. J.* **2016**, *23*, 1711.
62. Basim, E.; Basim H.; Özcan M.; *J. Food. Eng.* **2006**, *77*, 992.

63. Carpes, S. T.; Beghini, R.; Alencar, S. M.; Masson, M. L.; *Ciênc. Agrotec. Lavras*. **2008**, *31*, 1818.
64. Nayaka, H. B.; Londonkar, R. L.; Umesh, M. K.; Tukappa, A.; *Int. J. Bacteriol.* **2014**, *2014*, 175851.
65. Morimoto, Y.; Baba, T.; Sasaki, T.; Hiramatsu, K.; *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2015**, *46*, 666.
66. Grossowicz, N.; Razin, S.; Rozansky, R.; *J. Gen. Microbiol.* **1955**, *13*, 436.
67. Rayavarapu, S.; Kadiri, S.; Basha, M.; Mangarao, N.; Tadikondal, L.; Sastry, N.; Vidavalur, S.; *Med. Chem.* **2014**, *4*, 367.
68. El-Halfawy, O. M.; Valvano, M. A.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 4162.
69. Johnson, L.; Mulcahy, H.; Kanevets, U.; Shi, Y.; Lewenza, S.; *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 813.