



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Biotecnologia



Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica

**Potencial antioxidante e anti-Alzheimer do pólen da abelha sem  
ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí)**

**Aluna:** Natalia Carine Almeida Conceição

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

**UBERLÂNDIA – MG**

**2021**



**Universidade Federal de Uberlândia**  
**Instituto de Biotecnologia**  
**Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica**



**Potencial antioxidante e anti-Alzheimer do pólen da abelha sem  
ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí)**

**Aluna:** Natalia Carine Almeida Conceição

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

**Dissertação apresentada a Universidade  
Federal de Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
mestre em Genética e Bioquímica (Área:  
Genética)**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2021**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C744 2021	<p>Conceição, Natália Carine Almeida, 1997- Potencial antioxidante e anti-Alzheimer do pólen da abelha sem ferrão <i>Tetragonisca angustula</i> (Jataí) [recurso eletrônico] : Potencial biotecnológico anti- Alzheimer do pólen de Jataí / Natália Carine Almeida Conceição. - 2021.</p> <p>Orientadora: Carlos Ueira Vieira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.713">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.713</a> Inclui bibliografia.</p> <p>1. Genética. I. Vieira, Carlos Ueira, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Trinta e um de janeiro de dois mil e vinte e dois.	Hora de início:	10:40h	Hora de encerramento:	11:10h
Matrícula do Discente:	11922GBI008				
Nome do Discente:	Natália Carine Almeida Conceição				
Título do Trabalho:	Potencial antioxidante e anti-Alzheimer do pólen da abelha sem ferrão <i>Tetragonisca angustula</i> (Jataí).				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Genética, epigenética, biologia e melhoramento de plantas e animais.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Potencial Biotecnológico do microbioma de abelhas brasileiras.				

Aos trinta e um dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e dois, às 10:40 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Cisco Webex*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Carlos Ueira Vieira (Orientador), Esther Margarida Alves Ferreira Bastos e Enyara Rezende Moraes. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Carlos Ueira Vieira apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enyara Rezende Moraes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Esther Margarida Alves Ferreira Bastos, Usuário Externo**, em 31/01/2022, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3283968** e o código CRC **8EFEA6A9**.

**Potencial antioxidante e anti-Alzheimer do pólen da abelha sem  
ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí)**

**Aluna:** Natalia Carine Almeida Conceição

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira (Orientador)

**Examinadores:** Dr<sup>a</sup> Enyara Rezende Moraes

Dr<sup>a</sup> Esther Margarida Alves Ferreira Bastos

**Data da Defesa:** 31/01/2022

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas do PPGGB para o formato da Dissertação foram contemplados.

---

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

*“Yes, there are two paths you can go by  
But in the long run  
There's still time to change the road you're on”*

*Stairway to heaven – Led Zeppelin*

Dedico este trabalho aos meus pais **José Martins** e **Ana Lúcia** pelo exemplo de coragem e amor que me fizeram chegar até aqui.

Dedico também a **Rafael**, por todo apoio e amor na caminhada.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela coragem e resiliência que foram necessárias nos últimos tempos para que tudo isso fosse possível.

Aos meus pais, **Ana Lucia** e **José Martins**, que mesmo distantes foram e sempre serão minha inspiração para o crescimento e por todo amor que sempre nos uniu. Palavras nunca poderão traduzir meu sentimento de gratidão á vocês.

Ao meu melhor amigo (e por consequência namorado) **Rafael**, por toda a alegria que traz aos meus dias e pelos quase 6 anos de companheirismo e convivência. O caminho até aqui JAMAIS teria sido o mesmo sem você! For all time. Always.

Á minha segunda família: **Lucimar Martins**, **Paulo Roberto** e **Beatriz Oliveira**, por saber que posso sempre contar com vocês e por todo acolhimento e cuidado que sempre tiveram comigo. Amo todos vocês!

Á minha parte da família que transborda o amor mais lindo: **Lidiane** e **Alex**. Obrigada por trazerem ao mundo a parte mais doce do meu coração, **Alice** e **Mel**.

Ao meu grande amigo **Gustavo Henrique** pela compreensão da minha distância nos últimos tempos e por sempre me incentivar e apoiar. Que a amizade que nos une seja forte em qualquer adversidade.

Agradeço imensamente ao meu orientador **Carlos Ueira** pelo acolhimento em seu laboratório, pela sua empatia e por ser tão humano com os alunos. Apesar da pandemia ter nos tirado a oportunidade de conviver mais, tenho um carinho enorme por esse GRANDE pesquisador.

Ao **Laboratório de Genética**, em especial a **Matheus Henrique** e **Serena Malta**, por sempre terem sido uma mão estendida para ajudar. O futuro de vocês será brilhante!

Ao **PPGGB** e seus professores e colaboradores, por tudo o que me foi proporcionado em aprendizado técnico e teórico.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>Capítulo I – Fundamentação teórica .....</b>	<b>10</b>
1. Aspectos gerais da doença de Alzheimer .....	11
2. Estresse oxidativo na DA .....	13
3. Antioxidantes .....	14
4. <i>Drosophila melanogaster</i> e o sistema GAL4-UAS .....	15
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo II - Potencial antioxidante e anti-Alzheimer do pólen da abelha sem ferrão <i>Tetragonisca angustula</i> (Jataí) .....</b>	<b>22</b>
Resumo .....	23
Abstract .....	24
Introdução .....	25
Materiais e métodos .....	27
Resultados .....	33
Discussão .....	40
Referências .....	43

## APRESENTAÇÃO

Em todo o mundo, milhões de pessoas sofrem de demência ocasionada principalmente pela doença de Alzheimer (DA), algumas projeções demonstram que no Brasil a população tende ao aumento exponencial do número de idosos levando a mais indivíduos afetados pela DA. Com isso, explorar o potencial profilático e terapêutico de produtos naturais provenientes de nossa fauna e flora pode contribuir para a desaceleração no número de acometimentos da doença.

O Brasil possui uma vasta diversidade de abelhas nativas e com isso, a capacidade de obter produtos, como o pólen, com diferentes características físicas e químicas, tendo sido apontado na literatura como um derivado com grande potencial medicinal. Em vista da possibilidade de facilmente obter e manter *Drosophila melanogaster* em laboratório, o presente estudo buscou analisar os efeitos do pólen obtido da espécie *Tetragonisca angustula* popularmente conhecida como Jataí, em *Drosophila melanogaster* modelo da doença de Alzheimer.

**CAPITULO I**  
**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## 1. Aspectos gerais da Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência entre idosos, sendo responsável por cerca de até 70% dos casos e tendo o avanço da idade como o fator de risco mais considerável. O número de indivíduos com demência tende ao crescimento exponencial, uma vez que a expectativa de vida aumenta e o envelhecimento da população ocorre em todo o mundo (HAMPEL et al., 2018).

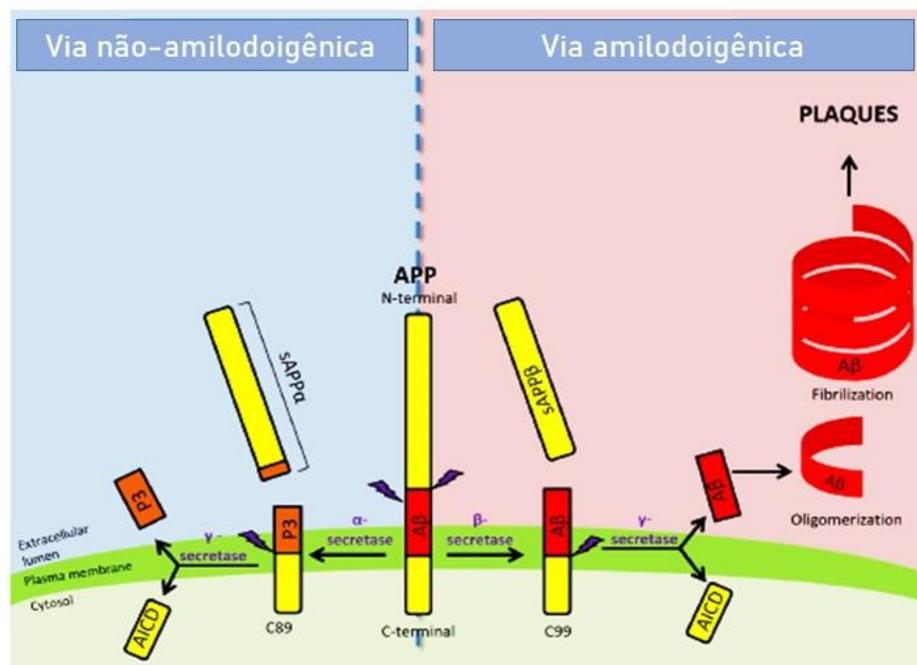
Em 2015, aproximadamente 47 milhões de pessoas viviam com demência e estima-se que até 2050 será cerca de 131,5 milhões, sendo a maior parte dos casos em países com renda média e baixa (PRINCE et al., 2015). Atualmente a DA pode ser diferenciada em duas formas: DA familiar e DA de início tardio. A DA familiar é caracterizada por ocorrer de forma mais precoce, geralmente antes dos 60 anos e envolver uma forte influência genética. Já a DA de início tardio ocorre após os 60 anos e é considerada a forma mais comum da doença (DE FALCO et al., 2016).

A característica mais marcante da doença de Alzheimer é a perda progressiva da memória, embora outros aspectos também sejam afetados, como as habilidades cognitivas e motoras que podem sofrer alterações precoces ou tardias durante a evolução da doença, que por sua vez, também pode ser acompanhada de outros males como alucinações, delírios e depressão, levando a um alto grau de incapacidade e dependência nos indivíduos afetados (BENNETT et al., 2015).

A patogenia da DA é complexa e envolve dois eventos principais: a aglomeração do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) formando placas amilóides, sendo este derivado da proteína precursora amiloide (APP); e a agregação da proteína tau hiperfosforilada que leva a formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, com isso, tanto o peptídeo  $\beta$ -amilóide, quanto a proteína tau são considerados biomarcadores da doença (BALDACCI et al., 2017; HAMPEL et al., 2018). O processamento proteolítico da APP através da enzima  $\beta$ -secretase gerando peptídeos  $\beta$ -amilóide é conhecido como via amiloidogênica, nesse processo, são produzidos peptídeos de tamanhos variados, porém aqueles

contendo quarenta e quatro e dois aminoácidos ( $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ ) são as principais isoformas produzidas (CHAKRABORTY et al., 2011; DE STROOPER; ANNAERT, 2000).

Na via amiloidogênica (Fig. 1), a enzima  $\beta$ -secretase cliva a APP gerando fragmentos N-terminal extracelulares, que também passam por clivagem pela enzima  $\gamma$ -secretase na região C-terminal, produzindo um peptídeo  $A\beta$  completo extracelular que irá se ligar a outros peptídeos e formar fibrilas, resultando na doença de Alzheimer (HARDY, 1997; TAN; AZZAM, 2017).



**Figura 1.** Processos envolvidos na formação da via não-amiloidogênica e via amiloidogênica. Adaptado de TAN & AZZAM (2017).

A formação de fibras e emaranhados por toda a extensão cerebral dificulta a montagem e organização de microtúbulos, podendo, em último caso, levar a morte neuronal (TAN; AZZAM, 2017). Além da própria formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares, outros aspectos podem contribuir negativamente para a patogênese da doença de Alzheimer, como a neuroinflamação e o estresse oxidativo (HENEKA et al., 2015). Embora esses eventos possam ser observados em cérebros de indivíduos não acometidos

pela doença, os sintomas não são observados conjuntamente e com mesma intensidade em indivíduos sem DA (DE FALCO et al., 2016).

## **2. Estresse oxidativo na DA**

No organismo, processos vitais como imunidade, apoptose, ativação de fatores transcricionais e fosforilação de proteínas, são dependentes de uma produção equilibrada de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, se não mantidas em níveis baixos, podem ter efeitos nocivos relacionados ao estresse oxidativo, em estruturas celulares importantes (PIZZINO et al., 2017; RAJENDRAN et al., 2014). O estresse oxidativo pode ser definido como uma consequência do desequilíbrio entre a formação e eliminação de radicais livres pelas células, que pode levar a prejuízos em diversos níveis celulares, sendo possível observar sua influência em doenças cardiovasculares, renais, respiratórias, neurológicas, câncer e diabetes (PIZZINO et al., 2017).

O estresse oxidativo está relacionado à patogênese da DA, envolvendo processos de oxidação proteica, lipídica, molecular e glicoxidação, e de acordo com a literatura, diversas evidências sugerem um amplo papel do estresse oxidativo na neurodegeneração da DA, sendo demonstrada a exposição do tecido cerebral ao estresse oxidativo durante o curso da doença. (GELLA; DURANY, 2009). A Glutathiona intracelular (GSH) é uma importante molécula envolvida na defesa das células contra o estresse oxidativo, sendo os níveis de GSH consideravelmente diminuídos com o avanço da idade, levando ao desequilíbrio entre a produção de EROs e defesa antioxidante (GELLA; DURANY, 2009; SASAKI et al., 2001; ZHU; CARVEY; LING, 2006).

Na doença de Alzheimer é possível observar a presença de vários produtos derivados de estresse oxidativo como: 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), acroleína, malondialdeído e F2-isoprostanos, sendo o HNE capaz de modificar proteínas e gerar diversos efeitos como a inibição de transportadores neuronais de glicose e glutamato (KELLER et al., 1997; TAMAGNO et al., 2003). Além disso, HNE está envolvido na peroxidação lipídica e é considerado um citotóxico neuronal sendo considerado um marcador característico de neurodegeneração na DA estando envolvido na progressão da doença (BARONE et al., 2017).

Sabe-se também que o DNA é vulnerável ao dano por estresse oxidativo, sendo o 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHD) importantes marcadores de dano molecular encontrados na doença de Alzheimer, bem como o aumento da quebra de fitas de DNA, que podem ser observadas em placas  $\beta$ -amilóide (FENG; WANG, 2012). A própria formação de placas  $\beta$ -amilóide pode levar a eventos de estresse oxidativo, sendo necessário o desenvolvimento de mais terapias com potencial de redução do estresse oxidativo e produção de peptídeos  $\beta$ -amilóide (BUTTERFIELD; SWOMLEY; SULTANA, 2013).

### **3. Antioxidantes**

Em 30 anos de pesquisa – de 1981 a 2010 – apenas 4 drogas direcionadas para a doença de Alzheimer foram aprovadas, sendo um número extremamente baixo quando comparado a aprovação de drogas direcionadas ao tratamento do câncer, antibacterianos e antivirais por exemplo. As terapias atuais para DA são capazes de aliviar sintomas, mas não fornecem a cura nem interrompem a progressão da doença (POHL; LIN, 2018).

Os antioxidantes são considerados promissores alvos terapêuticos para a DA, visto que podem ocorrer falhas no sistema antioxidante endógeno com o aumento da produção de radicais livres (UTTARA et al., 2009). Quando o sistema antioxidante interno não é capaz de superar o dano oxidativo é necessário que haja fornecimento externo de antioxidantes (antioxidantes exógenos), para redução do efeito acumulativo causado pelo estresse oxidativo (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001; POHL; LIN, 2018).

A dieta humana representa uma importante fonte exógena de antioxidantes e tem despertado interesse para a terapia da DA, havendo vários compostos naturais com resultados promissores em estudos pré-clínicos *in vivo*, além de outros já sendo estudados em ensaios clínicos (ANDRADE et al., 2019).

Há muitos anos os seres humanos utilizam produtos derivados de secreções glandulares de abelhas, sejam para fins nutricionais ou como medicamentos, entre esses produtos destacam-se a geleia real, própolis e pólen de abelha

(CORNARA et al., 2017). O pólen de abelha é considerado um suplemento natural, derivado do pólen de diversas plantas que são coletados pelas abelhas e misturados com suas secreções, sendo conhecido por melhorar as funções imunológicas, mas também tem sido atribuído a funções anti-inflamatórias, antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas, entre outras (CAMPOS et al., 2008; DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; LI et al., 2019).

As propriedades do pólen de abelha estão relacionadas a diversidade da flora local onde o pólen é coletado, mas também é sugerido na literatura que o pólen de abelha passa por um processo de enriquecimento através da atividade de microrganismos envolvidos na colmeia. Considerando a rica diversidade da fauna brasileira e das espécies de abelha sem ferrão presentes, o pólen de abelha brasileiro possui um grande potencial do ponto de vista bioquímico podendo auxiliar no tratamento e/ou prevenção de diversas patologias (DUARTE et al., 2018; MOHAMMAD; MAHMUD-AB-RASHID; ZAWAWI, 2021).

Carboidratos, enzimas, minerais e ácidos graxos são alguns dos componentes encontrados no pólen de abelha, o que o torna um produto natural de alto valor nutricional e medicinal (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015). Além disso, seus componentes flavonóides, alcalóides e fenolaminas o torna um importante alvo de estudo bioquímico (ZHANG; LIU; LU, 2020).

#### **4. *Drosophila melanogaster* e o sistema GAL4-UAS**

*Drosophila melanogaster* tem se destacado no estudo de diversas doenças humanas por representar um modelo biológico considerado quatro em um, pois possui um tempo de vida curto e seu desenvolvimento consiste em quatro estados morfológicos: embrião, larva, pupa e adulto, possibilitando diversas análises em cada fase de seu ciclo de vida (PANDEY; NICHOLS, 2011). É um modelo de fácil manutenção e baixo custo, com a importante característica de gerar grandes progênes em um único cruzamento (NGUYEN; MOEHRING, 2015; TAN; AZZAM, 2017). Além disso, possui aspectos comportamentais complexos e questões éticas menos rígidas para sua utilização em pesquisas (CHA et al., 2019).

Geneticamente, *Drosophila melanogaster* possui quatro pares de cromossomos, sendo três pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais (HALES et al., 2015). A partir do sequenciamento de seu genoma foi possível observar homologias genéticas e alta similaridade entre suas vias de biossíntese e de humanos (ADAMS et al., 2000). Sabe-se que, aproximadamente 75% dos genes humanos que estão ligados a doenças, possuem ao menos um homólogo em *D. melanogaster* (SANG; JACKSON, 2005). O amplo conhecimento acerca de sua genética tem grande influência em pesquisas moleculares avançadas e análises funcionais de genes ligados a doenças humanas, proporcionando análises em larga escala (BILEN; BONINI, 2005).

A descoberta de elementos transponíveis, os transposons, permitiu a construção de linhagens transgênicas de *D. melanogaster* com sistemas de expressão gênica direcionados, sistemas de deleção, inserção de elementos transponíveis e transgênicos *knock-down* (ROOTE; PROKOP, 2013). Pesquisas envolvendo doenças neurodegenerativas humanas, como por exemplo, Doença de Parkinson (DP), Doença de Alzheimer (DA) e Demência frontotemporal (DFT), tem utilizado *D. melanogaster* como organismo modelo, considerando sua complexidade cerebral importante para análises de distúrbios cerebrais e/ou comportamentais relacionados a doenças humanas (HIRTH, 2012). Assim, sua utilização na triagem de fármacos e compostos aumentam as chances de descoberta e sucesso de novas drogas (LEE et al., 2014).

A expressão de genes humanos em *D. melanogaster*, tornando-a um modelo de DA, é possível graças ao sistema GAL4-UAS. O fator de transcrição GAL4, proveniente de leveduras, é ligado a um gene promotor tecido-específico e inserido na mosca, enquanto o gene ligado a doença de interesse é colocado sob o controle da sequência UAS (*Upstream Activator Sequence*) e será ativado na presença de GAL4 (FISCHER et al., 1988; TAN; AZZAM, 2017).

A sequência UAS (*responder*) é inserida juntamente com o gene de interesse em uma linhagem de *D. melanogaster*, enquanto GAL4 (*driver*) é inserida em outra. Assim, apenas a progênie descendente das linhagens parentais será uma linhagem GAL4-UAS e irá expressar a proteína humana em um tecido

específico, pois a sequência de DNA controlada por UAS só será ativamente transcrita nos tecidos que expressarem GAL4 (DE LAZZARI et al., 2020).

Dessa forma, a engenharia genética é capaz de produzir moscas modelo de DA que mimetizam a via amilodoigenica da doença, levando a produção do peptídeo  $\beta$ -amiloide. A presença do peptídeo A $\beta$  no sistema nervoso central de *D. melanogaster* pode levar a mimetização de algumas alterações comportamentais, patológicas e neuroanatômicas observadas em pacientes com a doença de Alzheimer, tornando o modelo interessante para a avaliação de respostas relacionadas a tratamentos (CHAKRABORTY et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D.; et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, 2000. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- ANDRADE, S.; et al. Natural compounds for alzheimer's disease therapy: A systematic review of preclinical and clinical studies. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20092313>
- BALDACCI, F.; et al. Two-level diagnostic classification using cerebrospinal fluid YKL-40 in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.01.021>
- BARONE, E.; et al. HNE-modified proteins in Down syndrome: Involvement in development of Alzheimer disease neuropathology. **Free Radical Biology and Medicine**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.508>
- BENNETT, D. A.; et al. Epigenomics of Alzheimer's disease. **Translational Research**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.006>
- BILEN, J.; BONINI, N. M.; *Drosophila* as a Model for Human Neurodegenerative Disease. **Annual Review of Genetics**, 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095804>
- BUTTERFIELD, D. A.; SWOMLEY, A. M.; SULTANA, R.; Amyloid  $\beta$ -Peptide (1-42)-induced oxidative stress in alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and progression. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 8, p. 823–835, 2013. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5027>
- CAMPOS, M. G. R.; et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, 2008. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
- CHA, S. J.; et al. The *Drosophila* model: Exploring novel therapeutic compounds against neurodegenerative diseases. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2019. <https://doi.org/10.3390/antiox8120623>
- CHAKRABORTY, R.; et al. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: Pharmacological rescue of cognitive defects. **PLoS ONE**, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020799>
- CORNARA, L.; et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412>
- DE FALCO, A.; et al. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 63–80, 2016. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150152>
- DE LAZZARI, F.; et al. Antioxidant therapy in Parkinson's disease: Insights from *Drosophila melanogaster*. **Antioxidants**, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9010052>

DE STROOPER, B.; ANNAERT, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. **Journal of Cell Science**, 2000. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1857>

DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. **Journal of the science of food and agriculture**, 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>

DUARTE, A. W. F.; et al. Honey and bee pollen produced by Meliponini (Apidae) in Alagoas, Brazil: Multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology**, 2018. <https://doi.org/10.1590/fst.09317>

FENG, Y.; WANG, X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/472932>

FISCHER, J. A.; et al. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. **Nature**, 1988. <https://doi.org/10.1038/332853a0>

GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adhesion and Migration**, 2009. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7402>

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00019-3)

HALES, K. G.; et al. Genetics on the fly: A primer on the *Drosophila* model system. **Genetics**, 2015. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>

HAMPEL, H.; et al. Revolution of Alzheimer Precision Neurology. Passageway of Systems Biology and Neurophysiology. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2018. <https://dx.doi.org/10.3233%2FJAD-179932>

HARDY, J.; Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. **Trends in Neurosciences**, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)01030-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01030-2)

HENEKA, M. T.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, 2015. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)70016-5)

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, 2012. <https://dx.doi.org/10.2174%2F187152710791556104>

KELLER, J. N.; et al. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid  $\beta$ -peptide: Role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 1, p. 273–284, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69010273.x>

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; et al. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>

- LEE, S.; et al. Evaluation of traditional medicines for neurodegenerative diseases using *Drosophila* models. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/967462>
- LI, Q.; et al. Bee Pollen Extracts Modulate Serum Metabolism in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Mice with Anti-Inflammatory Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03082>
- MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD-AB-RASHID, N. K.; ZAWAWI, N. Stingless bee-collected pollen (bee bread): Chemical and microbiology properties and health benefits. **Molecules**, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26040957>
- NGUYEN, T. T. X.; MOEHRING, A. J. Accurate alternative measurements for female lifetime reproductive success in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116679>
- PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, 2011. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- PIZZINO, G.; et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- POHL, F.; LIN, P. K. T. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: *In vitro*, *in vivo* and clinical trials. **Molecules**, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23123283>
- PRINCE, M.; et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease International**, 2015. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs13195-016-0188-8>
- RAJENDRAN, P.; et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- ROOTE, J.; PROKOP, A. How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for *Drosophila* Genetics. **G3: Genes|Genomes|Genetics**, 2013. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004820>
- SANG, T. K.; JACKSON, G. R. *Drosophila* models of neurodegenerative disease. **NeuroRx**, 2005. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.438>
- SASAKI, T.; et al. Age-related changes of glutathione content, glucose transport and metabolism, and mitochondrial electron transfer function in mouse brain. **Nuclear Medicine and Biology**, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(00\)00180-3](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(00)00180-3)
- TAMAGNO, E.; et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4-hydroxynonenal mediate amyloid  $\beta$ -induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. **Experimental Neurology**, v. 180, n. 2, p. 144–155, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(02\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(02)00059-6)

TAN, F. H. P.; AZZAM, G. *Drosophila melanogaster*: Deciphering Alzheimer's disease. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, 2017. <https://doi.org/10.21315/mjms2016.24.2.2>

UTTARA, B.; et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, 2009. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>

ZHANG, H.; LIU, R.; LU, Q. Separation and characterization of phenolamines and flavonoids from rape bee pollen, and comparison of their antioxidant activities and protective effects against oxidative stress. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25061264>

ZHU, Y.; CARVEY, P. M.; LING, Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. **Brain Research**, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.063>

## **CAPITULO II**

**Artigo: Potencial antioxidante e anti-Alzheimer do pólen da  
abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí)**

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a principal causa de demência em idosos no mundo, levando a perda progressiva de memória, comprometimento de habilidades cognitivas e motoras, gerando alto grau de incapacidade e dependência. O desenvolvimento da DA está relacionado ao acúmulo de placas senis no cérebro sendo causada pela via amiloidogênica da doença, onde diversos eventos estão genéticos e bioquímicos estão relacionados ao desenvolvimento da DA, sendo o estresse oxidativo um deles. Devido à escassez de drogas direcionadas para o tratamento da DA, compostos antioxidantes são cada vez mais estudados como alvos terapêuticos para a doença. Desse modo, exploramos neste trabalho o potencial antioxidante e anti-Alzheimer do extrato de pólen de *Tetragonisca angustula* em *Drosophila melanogaster*. Para isso, produzimos *Drosophila melanogaster* AD-like, um modelo que expressa genes relacionados a via amiloidogênica da doença de Alzheimer. Investigamos a origem floral do pólen coletado, realizamos a prospecção fitoquímica e avaliamos sua capacidade antioxidante *in vitro*. Para os experimentos *in vivo*, avaliamos em *D. melanogaster* a capacidade de sobrevivência e escalada com diferentes concentrações do extrato de pólen. Nossos resultados demonstraram que o extrato de pólen de *Tetragonisca angustula* possui uma considerável resposta antioxidante e alta concentrações de importante fitoquímicos como flavonoides e polifenóis, além disso, foi capaz de melhorar a sobrevivência de *D. melanogaster* e em todas as concentrações utilizadas melhorou a capacidade de escalada das moscas após 15 dias de tratamento. Desse modo, demonstramos a capacidade do pólen de *Tetragonisca angustula* como um importante produto a ser estudado visando o isolamento de moléculas com potencial alvo terapêutico para a doença de Alzheimer.

**Palavras-chave:** Pólen, *Tetragonisca angustula*, Doença de Alzheimer, *Drosophila melanogaster*, antioxidantes.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is considered the main cause of dementia in the elderly in the world, leading to progressive memory loss, impairment of cognitive and motor skills, generating a high degree of disability and dependence. The development of AD is related to the accumulation of senile plaques in the brain being caused by the amyloidoigenic pathway of the disease, where several genetic and biochemical events are related to the development of AD, with oxidative stress being one of them. Due to the scarcity of drugs aimed at the treatment of AD, antioxidant compounds are increasingly being studied as therapeutic targets for the disease. Thus, in this work, we explore the antioxidant and anti-Alzheimer potential of the *Tetragonisca angustula* pollen extract in *Drosophila melanogaster*. For this, we produced *Drosophila melanogaster* AD-like, a model that expresses genes related to the amyloidoigenic pathway of Alzheimer's disease. We investigated the floral origin of the collected pollen, carried out the phytochemical prospection and evaluated its antioxidant capacity *in vitro*. For the *in vivo* experiments, we evaluated in *D. melanogaster* the ability to survive and climb with different concentrations of the pollen extract. Our results showed that the pollen extract of *Tetragonisca angustula* has a considerable antioxidant response and high concentrations of important phytochemicals such as flavonoids and polyphenols, in addition, it was able to improve the survival of *D. melanogaster* and at all used concentrations it improved its ability to climbing of flies after 15 days of treatment. Thus, we demonstrate the capacity of *Tetragonisca angustula* pollen as an important product to be studied aiming at the isolation of molecules with a potential therapeutic target for Alzheimer's disease.

**Keywords:** Pollen, *Tetragonisca angustula*, Alzheimer's Disease, *Drosophila melanogaster*, antioxidants.

## INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência entre idosos, sendo responsável por cerca de até 70% dos casos e tendo o avanço da idade como o fator de risco mais considerável, tendendo ao crescimento exponencial, uma vez que a expectativa de vida aumenta e o envelhecimento da população ocorre em todo o mundo (1). A característica mais marcante da doença de Alzheimer é a perda progressiva da memória, embora outros aspectos também sejam afetados, como as habilidades cognitivas e motoras que podem sofrer alterações precoces ou tardias durante a evolução da doença, que por sua vez, também pode ser acompanhada de outros males como alucinações, delírios e depressão, levando a um alto grau de incapacidade e dependência nos indivíduos afetados (2).

A patogênese da DA é complexa e envolve dois eventos principais: a aglomeração do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) formando placas amiloides, sendo este derivado da proteína precursora amiloide (APP) e a agregação da proteína tau hiperfosforilada que leva a formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, com isso, tanto o peptídeo  $\beta$ -amilóide, quanto a proteína tau são considerados biomarcadores da doença (3-4).

O estresse oxidativo está relacionado à patogênese da DA, envolvendo processos de oxidação proteica, lipídica, molecular e glicoxidação, e de acordo com a literatura, diversas evidências sugerem um amplo papel do estresse oxidativo na neurodegeneração da DA, sendo demonstrada a exposição do tecido cerebral ao estresse oxidativo durante o curso da doença (5). A própria formação de placas  $\beta$ -amilóide pode levar a eventos de estresse oxidativo, sendo necessário o desenvolvimento de cada vez mais terapias com potencial de redução do estresse oxidativo e de produção de peptídeos  $\beta$ -amilóide (6).

Em 30 anos de pesquisa – de 1981 a 2010 – apenas 4 drogas direcionadas para a doença de Alzheimer foram aprovadas, sendo um número extremamente baixo quando comparado a aprovação de drogas direcionadas ao tratamento do câncer, antibacterianos e antivirais por exemplo. As terapias atuais para DA são capazes de aliviar sintomas, mas não fornecem a cura nem interrompem a

progressão da doença (7). A dieta humana representa uma importante fonte exógena de antioxidantes e tem despertado interesse para a terapia da DA, havendo vários compostos naturais com resultados promissores em estudos pré-clínicos *in vivo*, além de outros já sendo estudados em ensaios clínicos (8).

O pólen de abelha é considerado um suplemento natural, sendo derivado do pólen de diversas plantas que são coletados pelas abelhas e misturados com suas secreções e é conhecido por melhorar as funções imunológicas, mas também tem sido atribuído a funções anti-inflamatórias, antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas, entre outras (9-11). Carboidratos, enzimas, minerais e ácidos graxos são alguns dos componentes encontrados no pólen de abelha, o que o torna um produto natural de alto valor nutricional e medicinal (12-13). Além disso, seus componentes flavonóides, alcalóides e fenolaminas o torna um importante alvo de estudo bioquímico (14).

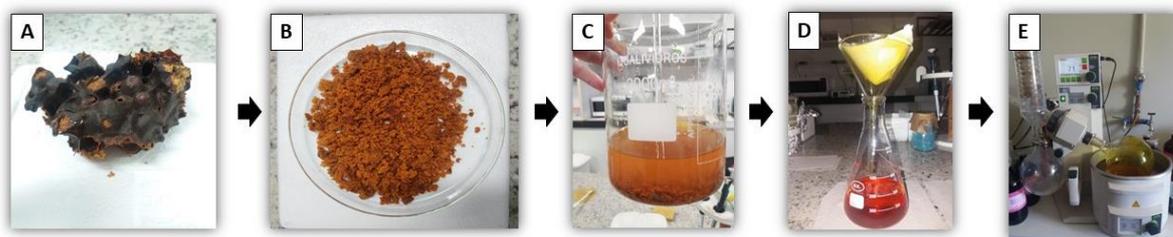
Pesquisas envolvendo doenças neurodegenerativas humanas, como por exemplo, Doença de Parkinson (DP), Doença de Alzheimer (DA) e Demência frontotemporal (DFT), tem utilizado *D. melanogaster* como organismo modelo, considerando sua complexidade cerebral importante para análises de distúrbios cerebrais e/ou comportamentais relacionados a doenças humanas (15). Assim, sua utilização na triagem de fármacos e compostos aumentam as chances de descoberta e sucesso de novas drogas (16). A presença do peptídeo A $\beta$  no sistema nervoso central de *D. melanogaster* pode levar a mimetização de algumas alterações comportamentais, patológicas e neuroanatômicas observadas em pacientes com a doença de Alzheimer, tornando o modelo interessante para a avaliação de respostas relacionadas a tratamentos (17).

Desse modo, o presente estudo buscou avaliar as propriedades bioquímicas antioxidante e o potencial anti-alzheimer do pólen de *Tetragonisca angustula* em *Drosophila melanogaster* modelo da doença de Alzheimer.

## Materiais e métodos

### 1. Preparação do extrato

Foram obtidos 83g de pólen retirado de colmeias de *Tetragonisca angustula* localizadas no meliponário da Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Após a pesagem, o pólen foi colocado em um béquer juntamente com 581 mL de metanol absoluto (1/7) e agitado por 30 minutos. Após 88 horas sem contato com a luz e em temperatura ambiente o líquido resultante foi filtrado e submetido a um rotoevaporador (Figura 1). O extrato obtido foi liofilizado e congelado, obtendo-se 11g de extrato bruto.



**Figura 1.** Processo de obtenção do extrato de pólen. (A) Potes onde são armazenados o pólen de abelha. (B) Pólen de *Tetragonisca angustula* após a retirada dos potes. (C) Mistura entre pólen e metanol absoluto no processo de extração. (D) Filtração para separação da parte líquida e sólida. (E) Liofilização para separação do extrato do pólen e metanol absoluto. Fonte: Autoria própria.

### 2. Lâminas palinológicas

As amostras de pólen bruto *in natura* foram acetolizadas (Erdtman, 1960) e montadas em lâminas microscópicas, segundo Louveaux et al. (1978). Os tipos polínicos foram identificados com base na literatura (Salgado-Labouriau, 1973), coleção de lâminas (Funed-Pol) disponível na rede de espécies (<http://www.splink.org.br>), exemplares de referência presentes no Laboratório de Morfologia, Microscopia e Imagem Vegetal (LAMOVI) - UFU e também de acordo com as plantas do entorno da colméia das abelhas.

### 3. Prospecção fitoquímica

Para a determinação das concentrações totais de polifenóis, taninos condensados e flavonoides no extrato utilizou-se como base o método de ZOU et al. (2011) modificado por FRANCO et al. (2020) em microplacas de 96 poços. O

extrato foi diluído em metanol na concentração de 10 mg/mL. Todas as análises foram feitas em triplicata.

### 3.1 Determinação da concentração de polifenóis

Para a determinação de fenóis totais, utilizou-se o reagente Folin Ciocalteu na qual envolve a redução do reagente de Folin (mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico) pelos compostos fenólicos. O ensaio foi iniciado com a adição de 5 µL da amostra, 25 µL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu e 195 µL de água milli-Q em cada poço e depois incubado por 6 min à 25°C. Após a incubação, adicionou-se 75 µL de carbonato de cálcio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) e a placa foi novamente incubada por 2h à 25°C na ausência de luz.

A determinação foi feita pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 5 µL de metanol para obtenção do branco. O conteúdo de fenóis totais foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico, nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g).

### 3.2 Determinação da concentração de taninos Condensados

O conteúdo de proantocianidinas foi determinado utilizando vanilina. O mecanismo da reação que ocorre entre a vanilina e o tanino condensado em HCl é do tipo substituição eletrofílica no anel aromático. Essa metodologia não identifica os taninos hidrolisáveis, pois conforme as suas estruturas de ressonância, os carbonos na posição orto em relação à carbonila apresentam densidade de carga positiva para os taninos hidrolisáveis, o que impede que ocorra uma substituição eletrofílica no anel aromático. Em cada poço, foram adicionados 10 µL da amostra, 200 µL de solução metanólica de vanilina (4%) e 100 µL de HCl concentrado e, sequencialmente, incubou-se por 15 min à 25°C. A determinação foi feita pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando 10 µL de metanol para obtenção do branco. O conteúdo de fenóis totais foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de catequina (CE), nas concentrações de 31,25;

62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de catequina por grama de amostra (mg CE/g).

### 3.3 Determinação da concentração de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado utilizando-se como complexante o cloreto de alumínio. Nessa análise, o cátion alumínio ( $Al^{3+}$ ) forma complexos estáveis com os flavonoides, que apresentam absorção em comprimento de onda maior do que o flavonoide não complexado. Em cada poço, foram adicionados 30 µL da amostra, 180 µL de água milli-Q e 10 µL de solução 5% de  $NaNO_2$  e então, deixou-se a placa sob incubação por 6 min à 25°C e na ausência de luz.

Após, adicionou-se 20 µL de solução de  $AlCl_3$  (10%) e deixou-se em repouso por mais 6 min à 25°C e na ausência de Luz. A determinação foi feita pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 30 µL de metanol para obtenção do branco. O conteúdo de flavonoides foi obtido utilizando uma curva analítica construída com quercetina isolada, nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg QE/g).

## **4. Atividade antioxidante**

Para os ensaios antioxidantes, o extrato de pólen e o flavonoide quercetina foram solubilizados em metanol e o ascorbato (controle positivo) em água, todos na concentração de 1 mg/mL para o método FRAP (Capacidade de redução do Ferro) e 100 µg/mL para o método ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio). Para o método de eliminação do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), as amostras foram diluídas em série a partir da concentração de 1 mg/mL para a determinação do valor de  $IC_{50}$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem (%) de capacidade antioxidante para ensaio de DPPH, com  $IC_{50}$  dado como µg/mL, e equivalentes de trolox (µmol Trolox/g) para ensaios FRAP e ORAC.

### 4.1 Capacidade de redução de ferro (FRAP)

A análise da capacidade antioxidante pelo método FRAP foi baseado em BENZIE; STRAIN (1996). Neste ensaio, os antioxidantes presentes nas amostras

reduzem  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , o qual é quelado pelo composto TPTZ (2,4,6-tri (2piridil) -s-triazina) formando o complexo  $\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$ , de coloração azulada (BENZIE; STRAIN, 1996). Inicialmente, incubou-se 250  $\mu\text{L}$  do reagente de FRAP, constituído por 10 volumes de tampão acetato de sódio (0,3 mol/L e pH 3,6), 1 volume de solução ácida de TPTZ (10 mmol/L) e 1 volume de solução aquosa de cloreto férrico (20 mmol/L), com 10  $\mu\text{L}$  de extrato/partição e 25  $\mu\text{L}$  de água milli-Q durante 6 min a 37° C. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 593 nm e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). O tampão acetato de sódio foi utilizado como branco.

#### 4.2 Capacidade de sequestro do radical peroxil (ORAC)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC foi baseada em PRIOR et al. (2003). Neste ensaio, todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato a 75 mmol/L e pH 7.4. Inicialmente, 25  $\mu\text{L}$  de extrato/partição foram misturados a 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (0,085 nmo/L) e incubados à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  da solução de Azobis para dar início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nmex/ 528 nmem) foi medida em espectrofluorímetro e foi verificada a cada 1 min e 30s durante 90 min. O branco foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão fosfato. A perda de fluorescência da fluoresceína foi medida utilizando o cálculo da área sob a curva e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico).

#### 4.3 Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O método de DPPH foi baseado no método descrito por SHARMA; BHAT (2009) e adaptado por FRANCO et al. (2019). As amostras foram incubadas com uma solução metanólica de 60 mM de DPPH a 30 ° C por 20 min, na ausência de luz. O ensaio foi iniciado com 250  $\mu\text{L}$  de extrato/partição solubilizado em 750  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de DPPH (0,06 mmol/L). A mistura contendo extrato/partição e o ácido ascórbico foi incubada a 30° C, na ausência de luz, por 20 min. A redução na absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 517 nm.

## **5. Cultivo de *Drosophila melanogaster***

O estoque de moscas foi obtido do Bloomington Stock Center:  $w^{1118}$  (BL #3605), UAS-BACE-1, UAS-APP (33797) e elav-GAL4 (5146). As moscas utilizadas foram mantidas em meio fubá padrão (soja em pó 0,01%, glicose 7,2%, ágar 0,6%, fubá 0,073%, fermento 0,018%, nipagin 0,06% e solução ácida 0,05% m/v) e mantidas em incubadora com ciclo claro/escuro à 25°C.

## **6. Moscas AD-like**

Para produzir moscas AD-like, foram realizados cruzamentos utilizando fêmeas virgens da linhagem Elav-Gal4 e machos da linhagem UAS-BACE; UAS-APP. Ainda no estágio de pupa a geração F1 resultante foi selecionada de acordo com o fenótipo, onde as pupas do tipo *tubby* foram descartadas e as alongadas (fenótipo selvagem) selecionadas como o modelo DA (Elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+).

## **7. Tratamentos**

Para os tratamentos de ensaio *in vivo*, foram determinadas 4 concentrações do extrato: 0.1 mg/mL, 0.04 mg/mL, 0.02 mg/mL e 0.004 mg/mL. Para a diluição dessas concentrações utilizou-se Tween 0,01% (Sigma) como veículo. As diferentes concentrações do extrato foram adicionadas em 5g de meio purê enriquecido (75% de purê instantâneo de batata, 15% de extrato de levedura, 9,3% de glicose e 0,07% nipagin). As moscas foram submetidas ao tratamento de 0-3 dias pós-eclosão, sendo o meio trocado a cada 2 dias. Além dos grupos de moscas testadas para cada concentração (N=90), também foram testados grupos submetidos a água (Controle) e Tween 0,01% (Veículo).

## **8. Ensaio de sobrevivência**

Para avaliar a taxa de sobrevivência, foram utilizadas 90 moscas AD-like machos e fêmeas submetidas aos tratamentos como descrito anteriormente. Foi realizada a troca de tratamento e contagem de moscas mortas a cada 2 dias durante um período de aproximadamente 50 dias.

## **9. Ensaio Rapid iterative negative geotaxis (RING)**

Para ensaios de escalada, foram utilizadas apenas moscas AD-like machos, os testes foram realizados em triplicata sendo 30 em cada vial. As moscas foram colocadas em um suporte adequado com capacidade de alocar 12 vials. No pré-teste (aclimatação), as moscas foram submetidas a luz e ambiente silencioso por 20 minutos. O suporte com os frascos foi “batido” contra a bancada por 3 vezes e então foi analisada a escalada das moscas até 5cm em 4s. Esse procedimento foi repetido e gravado por 5 vezes com 1 minuto de pausa entre cada repetição. A capacidade de escalada das moscas foi testada 5, 10 e 15 dias após o tratamento. A análise dos vídeos foi realizada pelo software QuickTime Player 7.7.9.

## **10. Análise estatística**

Para o teste de prospecção fitoquímica e os ensaios de atividade antioxidante, as análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 8.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Nos ensaios de atividade antioxidante os resultados foram submetidos ao One-Way ANOVA com teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias das amostras. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

Para os demais experimentos foi avaliado se os resultados apresentavam distribuição normal (paramétrico ou não-paramétrico) através do teste D'Agostino & Pearson. A comparação entre grupos foi feita através do teste t com nível de significância de  $P < 0.05$ . As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.

## Resultados

### Palinologia

Através da análise palinológica, foram identificados 13 diferentes tipos de pólen, sendo possível identificar as espécies *Anarcadium occidentale*, *Corymbia citriodora*, *Delonix regia*, *Cenostigma pluviosum*, *Malpighia emarginata* e *Everroa carambola*. A nível de gênero identificamos os tipos *Mondevilla*, *Solanum*, *Spagneticola*, *Eugenia*, *Galinsaga* e *Sp2* (Figura 2).



**Figura 2.** Lâminas de identificação de pólen. 1) *Cenostigma pluviosum*, 2) *Anarcadium occidentale*, 3) Tipo Galinsaga, 4) Tipo Solanum, 5) Tipo sp2, 6) *Corymbia citriodora*, 7) Tipo Eugenia, 8) *Delonix regia*, 9) *Spagneticola*, 10) Tipo *Mondevilla*, 11) *Malpighia emarginata*, 12) *Everrhoa carambola*.

### Prospecção fitoquímica

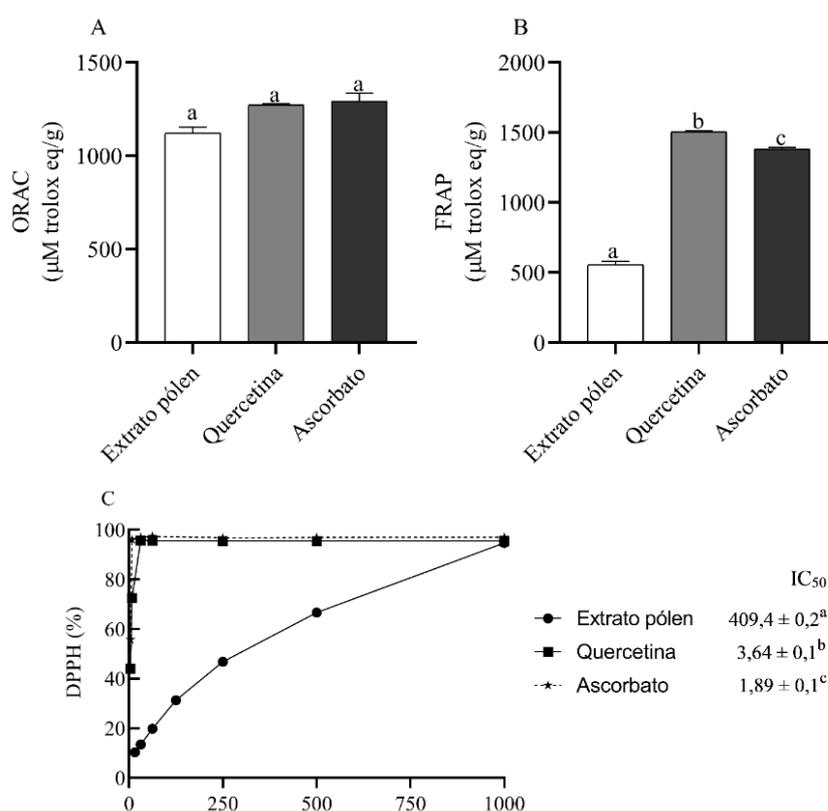
De acordo com os resultados obtidos em ensaios de prospecção fitoquímica (Tabela 1), foi possível obter valores de polifenóis, tatinos condensados e flavonóides no pólen coletado de *Tetragonisca angustula*. Nessa análise observamos que a concentração de polifenóis foi maior em relação aos tatinos condensados e flavonoides.

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica. Valores expressos com média  $\pm$  erro padrão

Polifenóis (mg GAE/g)	Taninos condensados (mg CE/g)	Flavonoides (mg QE/g)
357,5 $\pm$ 2,4	207,6 $\pm$ 5,1	277,6 $\pm$ 1,5

### Atividade antioxidante: ORAC, FRAP e DPPH

Foram realizados testes bioquímicos para avaliar o potencial antioxidante do extrato metanólico do pólen de *Tetragonisca angustula* (Figura 3). Através do teste ORAC observou-se que o extrato de pólen apresentou alta capacidade de atividade antioxidante, semelhante a quercetina, utilizada como controle positivo e ao ascorbato, utilizado como controle do método (Figura 3A). Este método fundamenta-se na inibição da oxidação da fluoresceína pelo radical peroxil, iniciado pela decomposição térmica do composto Azobis (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloro); a fluoresceína é utilizada como indicadora e a perda de sua fluorescência é avaliada ao longo do tempo, na ausência e na presença de antioxidantes.



**Figura 3:** Avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos (A) ORAC, (B) FRAP e (C) DPPH. O extrato de pólen e o flavonóide quercetina foram diluídos em metanol, enquanto que o ascorbato foi diluído em água. As amostras foram diluídas a 1 mg/mL para o ensaio FRAP e diluídas serialmente a partir dessa concentração para o ensaio DPPH. Para o método ORAC, as amostras foram diluídas a 100 µg/mL. Os valores foram expressos como porcentagem de inibição (%) para o método DPPH, com IC<sub>50</sub> dado como µg/mL, e como equivalentes de µmol de trolox/g de amostra para ORAC e FRAP. Valores expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença não significativa quando comparada ao controle (ascorbato) (P<0.05).

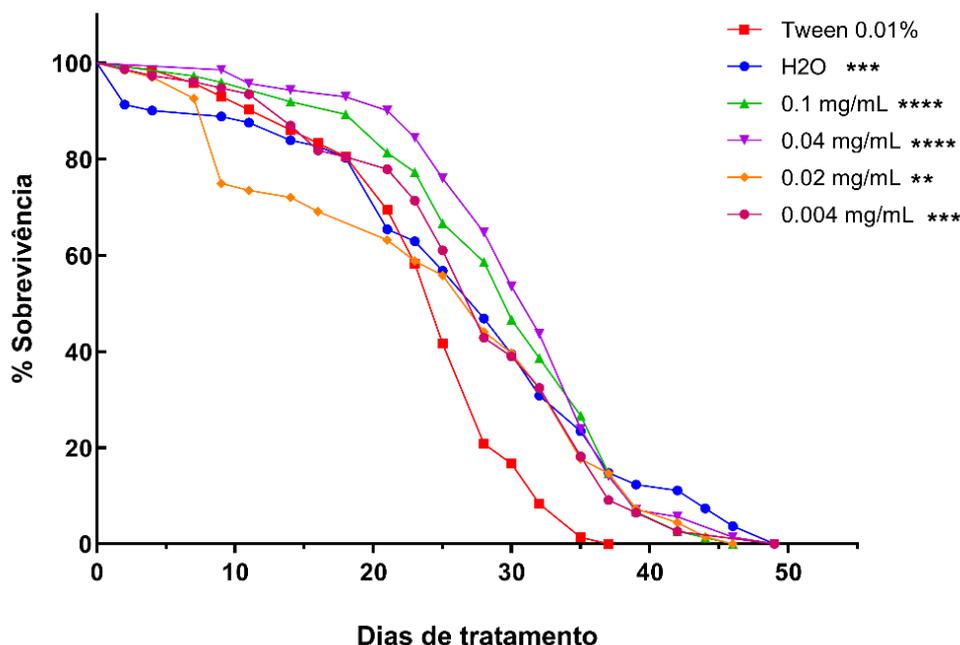
O teste FRAP foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante através da capacidade de redução férrica (Figura 3B). Nessa análise, caso tenhamos compostos antioxidantes na amostra, teremos a redução do íon Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. O resultado obtido mostra que a capacidade de redução férrica pela ação antioxidante do extrato de pólen foi consideravelmente menor em relação aos controles positivos quercetina e ascorbato.

Na análise da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH (Figura 3C), os resultados foram expressos na forma de IC<sub>50</sub>, sendo notável que a concentração mínima de amostra capaz de atingir 50% de atividade foi maior para o extrato de pólen quando comparado com os valores expressos pela quercetina e ascorbato.

### **Extrato metanólico de pólen aumenta a sobrevivência de *D. melanogaster* modelo de Alzheimer (AD-like)**

Avaliamos os efeitos do pólen de *Tetragonisca angustula* na sobrevivência das moscas e os resultados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre moscas não tratadas (controle) e aquelas tratadas apenas com o veículo, sendo possível observar um decaimento significativo na sobrevivência dessas moscas a partir do 20<sup>o</sup> dia de tratamento com veículo, indicando que o Tween 0.01% não tem potencial de melhorar a capacidade de sobrevivência de moscas DA-like. Para os tratamentos com pólen, observamos que a concentração de 0.1 mg/mL e 0.04 mg/mL tiveram o melhor desempenho, especialmente considerando o intervalo entre o 10<sup>o</sup> e o 30<sup>o</sup> dia de

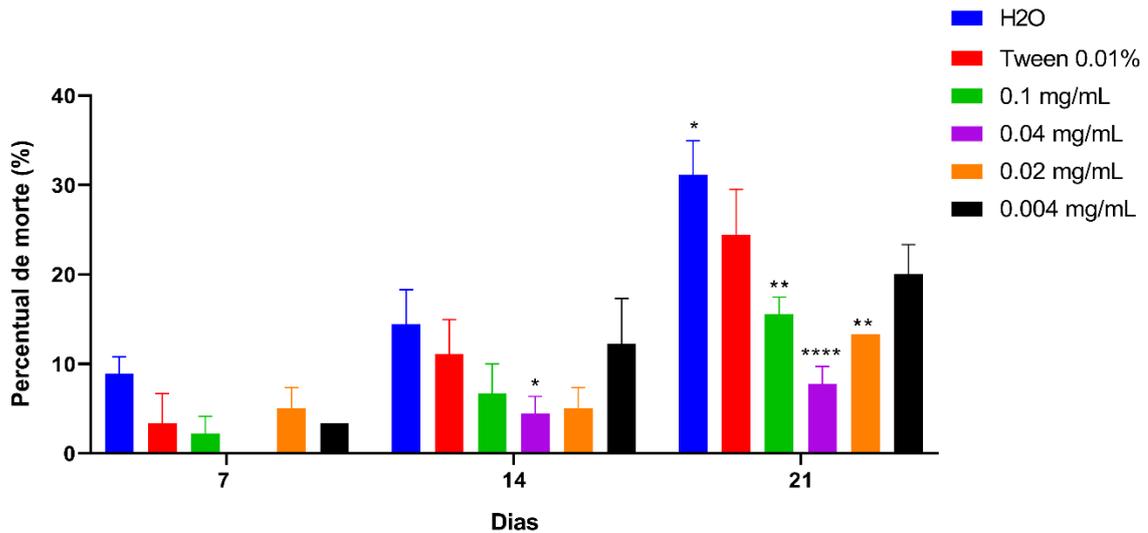
tratamento (Figura 4). Todas as moscas morreram após aproximadamente 50 dias de tratamento. Entre as concentrações utilizadas, 0.02 mg/mL e 0.004 mg/mL apresentaram os menores índices de significância estatística quando comparadas ao controle.



**Figura 4.** Taxa de sobrevivência de moscas AD-like tratadas com pólen 0.1 mg/mL, 0.04 mg/mL, 0.02 mg/mL e 0.004 mg/mL, tratadas com veículo e não tratadas (N = 90 para cada grupo). Significância estatística: (\*\*)  $P < 0.01$ , (\*\*\*)  $P < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$  (log-rank teste de Mantel-Cox).

Para melhor avaliação desse resultado, analisamos o percentual de morte (Figura 5) para cada tratamento nos intervalos de 7, 14 e 21 dias. Diante do resultado dessa análise é possível confirmar de forma geral, que nos tratamentos de 0.1 mg/mL e 0.04 mg/mL o percentual de morte foi consideravelmente mais baixo em relação aos demais tratamentos, ao grupo não tratado e ao veículo.

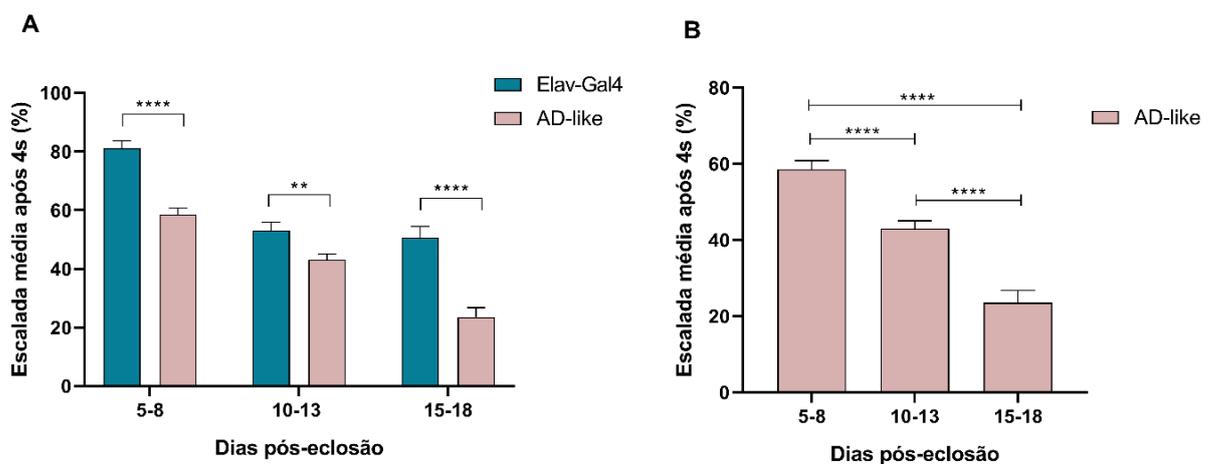
De acordo com a análise estatística, o tratamento de 0.04mg/mL apresentou diferença significativa em relação ao veículo com 14 dias de tratamento (\*)  $P < 0.05$ . Com 21 dias de tratamento, além do grupo não tratado (H<sub>2</sub>O), os tratamentos com 0.1mg/mL, 0.04mg/mL e 0.02mg/mL apresentaram valores significativamente baixos no índice de morte das moscas.



**Figura 5.** Percentual de morte de moscas AD-like tratadas com pólen 0.1 mg/mL, 0.04 mg/mL, 0.02 mg/mL e 0.004 mg/mL, tratadas com veículo e não tratadas (N = 90 para cada grupo) em intervalo de tempo de 7, 14 e 21 dias. Significância estatística: P<0.05 (\*), (\*\*) P<0.01 e P<0.001 (\*\*\*).

### Ensaio Rapid iterative negative geotaxis (RING)

O teste RING foi realizado para avaliar a capacidade motora de moscas AD-like em comparação com o genótipo controle elav-Gal4 nos intervalos de tempo 5-8, 10-13 e 15-18 dias pós eclosão (Figura 6). Pode-se observar que o genótipo elav-Gal4 (controle) apresenta declínio em sua taxa de escalada, especialmente nas moscas com idade 10-13 dias pós eclosão. Já o genótipo AD-like apresenta um declínio considerável em 5-8, 10-13 e 15-18 dias, diferenças significativas em comparação com elav-Gal4 (Figura 6A). O declínio na taxa de escalada entre as diferentes idades das moscas também foi avaliado (Figura 6B), sendo evidente o declínio da capacidade de escalada das moscas AD-like conforme avança seu envelhecimento. Portanto, o modelo AD-like foi validado.

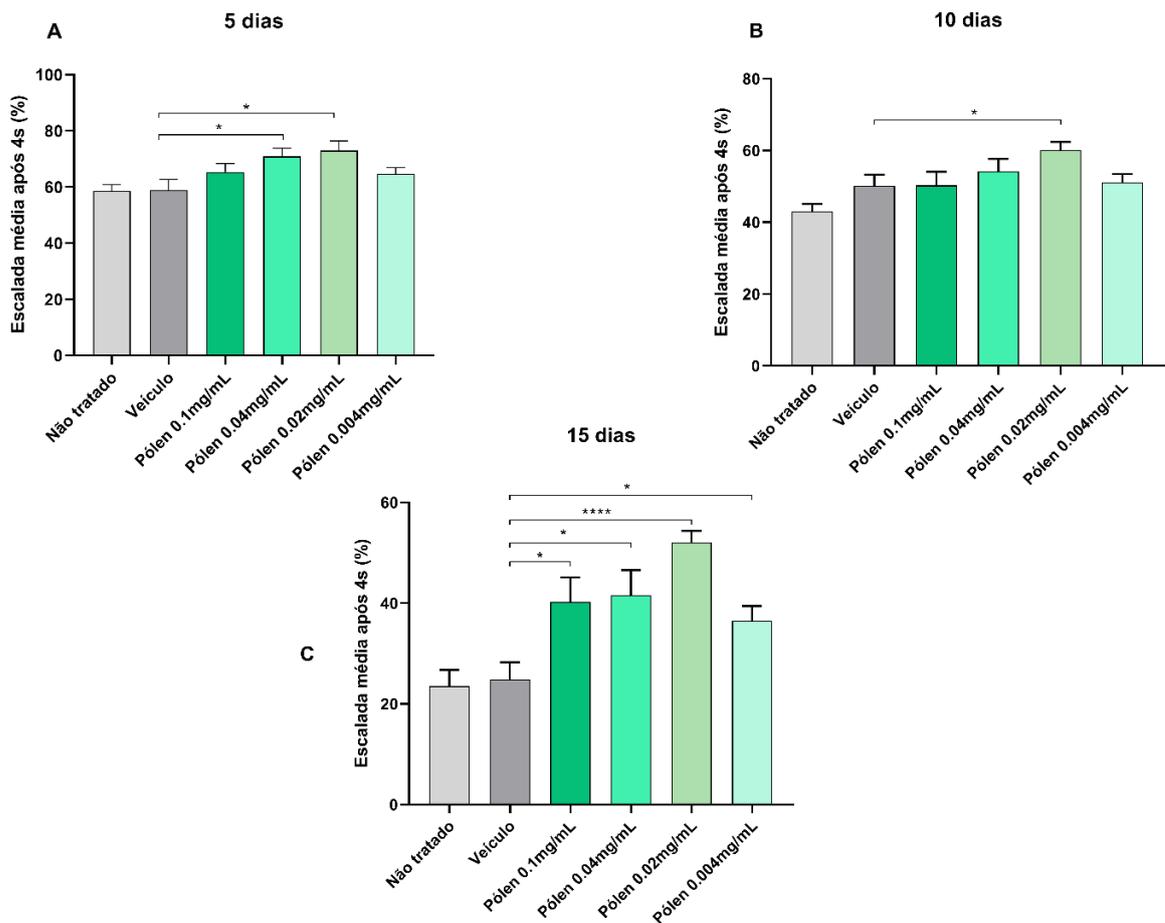


**Figura 6.** (A) Comparação da habilidade de escalada entre os genótipos Elav-Gal4 e AD-like em 5-8, 10-13 e 15-18 dias pós eclosão. (B) Comparação da habilidade de escada entre o genótipo AD-like em 5-8, 10-13 e 15-18 dias pós eclosão. Dados apresentados com média  $\pm$  S.E.M.  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) e  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*) Unpaired two-tailed t-test.

### Extrato metanólico do pólen promove melhoria no teste comportamental para avaliação de neurodegeneração em moscas AD-like

Após 5 dias de tratamento com pólen, as moscas AD-like apresentaram diferença estatisticamente significativa em sua escalada nas concentrações de 0.04 mg/mL e 0.02 mg/mL ( $P < 0.05$ ) em comparação com o veículo (Figura 7A). Os resultados obtidos para o teste de escada após 10 dias de tratamento (Figura 7B), indicaram que apenas a concentração de 0.02 mg/mL forneceu melhor capacidade de escalada no teste em comparação com o veículo ( $P < 0.05$ ).

Após 15 dias de tratamento, foi possível observar que todas as concentrações testadas foram capazes de melhorar a capacidade de escalada das moscas AD-like (Figura 7C). A concentração de 0.02 mg/mL apresentou o melhor desempenho de acordo com a análise estatística ( $P < 0.0001$ ), já as demais concentrações: 0.1 mg/mL, 0.04 mg/mL e 0.004 mg/mL, proporcionaram melhora no desempenho de escalada, porém com menor índice de significância ( $P < 0.05$ ).



**Figura 7.** Capacidade de escalada de moscas AD-like após tratamento com pólen utilizando Tween 0.01% como veículo. (A) 5 dias de tratamento com 0.1 mg/mL, 0.04 mg/mL, 0.02 mg/mL e 0.004 mg/mL. (B) 10 dias de tratamento (C) 15 dias de tratamento. Dados apresentados com média  $\pm$  S.E.M.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) Unpaired two-tailed t-test.

## Discussão

Abelhas sem ferrão são consideradas polinizadoras extremamente eficazes e essenciais para a biodiversidade e garantia da manutenção de espécies de plantas nativas e exóticas de cada região. *Tetragonisca angustula* (Jataí) se destaca no Brasil como uma popular espécie de abelha sem ferrão com hábito generalista e, portanto, com grande contribuição na polinização da flora tropical (12). Através da análise palinológica do nosso estudo, identificamos a presença de diversas famílias botânicas onde é possível observar através de outros estudos a diversidade floral específica de acordo com cada região onde o pólen é coletado por *Tetragonisca angustula* (27-30).

Além disso, o pólen apresenta diferentes características do ponto de vista bioquímico dependendo da flora local onde ocorre sua coleta, podendo também ter suas propriedades influenciadas pela ação de bactérias fermentativas presentes nos alvéolos onde as abelhas armazenam o pólen. De acordo com a literatura, esse processo se dá para aumentar o valor nutricional do pólen, havendo diversas espécies de bactérias relatadas em colmeias de abelhas sem ferrão, sendo estas divididas em bactérias fermentativas, bactérias de ácido láctico e bactérias de ácido não láctico. Entre esses tipos, são exemplificadas em diversos estudos as espécies: *Lactobacillus musae*, *Lactobacillus crustorium*, *Lactobacillus mindesis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Fructobacillus fructosus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus punilus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus safensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Starmarella meliponinorum*, sendo esta última classificada como fermentativa e isolada especificamente de *Tetragonisca angustula* no Brasil (31-36).

A relação entre bactérias e colmeias indica que há interações mutualísticas entre os organismos envolvidos podendo ser uma relação positiva do ponto de vista nutricional do pólen de abelha, agregando ainda mais valor em conjunto com as características florais do ambiente. Em relação as características bioquímicas, os compostos fenólicos compõem um grupo amplamente estudado, reconhecidos especialmente por seu potencial antioxidante (37), havendo diversos estudos que demonstram sua presença abundante no pólen de abelha extraído de diversas

localidades (38). Através dos nossos resultados *in vitro*, observamos que o pólen coletado de *Tetragonisca angustula* possui alta concentração de polifenóis sendo seguido de flavonoides, que compõe um grupo de metabólitos secundários, sendo estes compostos altamente presentes na dieta e nutrição humana (39). Esse perfil, é demonstrado em outros estudos conduzidos com abelhas sem ferrão analisando as propriedades do mel, onde também são identificados diversos flavonoides como a quercetina, kaempferol, derivados de isorhamnetina e hesperitina, sendo a maioria desses compostos relatados não apenas como antioxidantes, mas também como anticancerígenos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (42).

O ácido gálico e ácido p-cumárico também são fortemente relatados na literatura por suas propriedades antioxidantes, sendo demonstrado em estudos acerca do mel de *Apis mellifera* no Brasil, que também reforça a origem floral como um determinante nas propriedades dos produtos alimentares derivados de abelhas (43). Além disso, nosso estudo identificou concentrações expressivas de polifenóis e flavonoides quando comparado a um outro estudo utilizando extrato de própolis de *Tetragonisca angustula*, onde foram quantificados  $1.26 \pm 0.17$  mg GAE/g e  $0.15 \pm 0.02$  mg QE/g de polifenóis e flavonoides respectivamente. Esse estudo também identificou por HPLC-DAD a presença do ácido gálico no extrato de própolis (44).

Avaliamos também o potencial antioxidante do pólen de abelha através dos testes bioquímicos FRAP, ORAC e DPPH. Através destes testes observamos o potencial antioxidante presente no extrato metanólico de pólen, onde através do teste ORAC revelou-se que o pólen de *Tetragonisca angustula* apresenta atividade antioxidante semelhante a quercetina e ao ascorbato, sendo este um resultado interessante do ponto de vista bioquímico uma vez que os testes foram conduzidos com extrato bruto. Já para o teste FRAP e DPPH os resultados indicaram uma menor performance do extrato de pólen em relação aos controles positivos, o que pode também ser justificado pela utilização do extrato bruto, uma vez que esses testes apresentam melhores resultados quando utiliza-se compostos isolados, tendo como um importante exemplo os controles utilizados. Outros estudos demonstram através desses testes que o pólen possui ótima atividade antioxidante

*in vitro*, podendo ser maior que de algumas frutas ou partes de frutas já relatadas na literatura com alta capacidade antioxidante (45-49).

O pólen de abelha tem sido sugerido como um agente útil no tratamento de doenças neurodegenerativas, porém há escassez de trabalhos publicados sobre efeitos do pólen de abelha em doenças com comprometimento das funções cognitivas. Um trabalho publicado recentemente identificou que o extrato de pólen de abelha foi capaz de diminuir o comprometimento e melhorar as funções cognitivas em ratos a longo prazo, sendo apontado como um importante agente terapêutico no tratamento do comprometimento cognitivo leve ou por disfunção colinérgica (50). Dentre os compostos bioativos presentes no pólen de abelha, os flavonoides se destacam em estudos sobre declínio cognitivo, onde os estudos pré-clínicos que envolvem a doença de Alzheimer tendo foco em modelos com aumento da produção de  $\beta$ -amilóide sugerem que estes podem atrasar o início e/ou retardar a progressão da doença (51-53).

Através dos resultados encontrados em nosso estudo, evidenciamos que o extrato metanólico do pólen de *Tetragonisca angustula* foi eficaz no melhoramento das manifestações da doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*, demonstrando o potencial biotecnológico presente na biodiversidade brasileira e em produtos coletados de colmeias de abelhas nativas. Nosso estudo se mostrou promissor para avanços em testes com cultura de células, bem como a avaliação em modelos murinos, além de testes bioquímicos que serão necessários para identificação e isolamento de compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS

1. HAMPEL, H.; et al. Revolution of Alzheimer Precision Neurology. Passageway of Systems Biology and Neurophysiology. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2018. <https://dx.doi.org/10.3233%2FJAD-179932>
2. BENNETT, D. A.; et al. Epigenomics of Alzheimer's disease. **Translational Research**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.006>
3. BALDACCI, F.; et al. Two-level diagnostic classification using cerebrospinal fluid YKL-40 in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.01.021>
4. DE STROOPER, B.; ANNAERT, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. **Journal of Cell Science**, 2000. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1857>
5. GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adhesion and Migration**, 2009. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7402>
6. BUTTERFIELD, D. A.; SWOMLEY, A. M.; SULTANA, R.; Amyloid  $\beta$ -Peptide (1-42)-induced oxidative stress in alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and progression. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 8, p. 823–835, 2013. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5027>
7. POHL, F.; LIN, P. K. T. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: *In vitro*, *in vivo* and clinical trials. **Molecules**, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23123283>
8. ANDRADE, S.; et al. Natural compounds for alzheimer's disease therapy: A systematic review of preclinical and clinical studies. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20092313>
9. CAMPOS, M. G. R.; et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, 2008. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
10. DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. **Journal of the science of food and agriculture**, 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>
11. LI, Q.; et al. Bee Pollen Extracts Modulate Serum Metabolism in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Mice with Anti-Inflammatory Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03082>

12. MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD-AB-RASHID, N. K.; ZAWAWI, N. Stingless bee-collected pollen (bee bread): Chemical and microbiology properties and health benefits. **Molecules**, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26040957>
13. KOMOSINSKA-VASSEV, K.; et al. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
14. ZHANG, H.; LIU, R.; LU, Q. Separation and characterization of phenolamines and flavonoids from rape bee pollen, and comparison of their antioxidant activities and protective effects against oxidative stress. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25061264>
15. HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, 2012. <https://dx.doi.org/10.2174%2F187152710791556104>
16. LEE, S.; et al. Evaluation of traditional medicines for neurodegenerative diseases using *Drosophila* models. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/967462>
17. CHAKRABORTY, R.; et al. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: Pharmacological rescue of cognitive defects. **PLoS ONE**, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020799>
18. ERDTMAN, G. The acetolysis method-a revised description. **Sven Bot Tidskr**, v. 54, p. 516-564, 1960.
19. LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology. **Bee world**, v. 59, p. 139-157, 1978. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097714>
20. SALGADO-LABOURIAU, M. L. Contribuição à palinologia dos cerrados. **Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências**, P. 154-158, 1973.
21. ZOU, Y.; et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268-2276, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104640k>
22. FRANCO, R. R.; ALVES, V. H. M.; ZABISKY, L. F. R.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M. M.; SARAIVA, A. L.; ESPINDOLA, F. S. Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and

- antiglycation properties. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 123, p. 109798, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>
23. BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
24. PRIOR, R. L.; et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf0262256>
25. SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
26. FRANCO, R. R.; et al. Phytoscreening of *Vochysiaceae* species: Molecular identification by HPLC-ESI-MS/MS and evaluating of their antioxidant activity and inhibitory potential against human  $\alpha$ -amylase and protein glycation. **Bioorganic chemistry**, v. 91, p. 103122, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103122>
27. BASTOS, B.P.; et al. Pollen Sources Used by *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini) in the Atlantic Forest, Northern Coast of Bahia. **Sociobiology**, v. 67, n. 4, p. 535-544, 2020. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v67i4.5596>
28. GIANNINI, T. C.; et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, n. 2, p. 209-223, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
29. MORGADO, L. N.; et al. Pollen used by *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae: Meliponina). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 4, p. 932-934, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000400021>
30. NOVAIS, J. S.; ABSY, M. L.; SANTOS, F. A. R. Pollen types collected by *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae) in dry vegetation in Northeastern Brazil. **Eur. J. Entomol**, v.111, p. 25-34, 2014. <https://doi.org/10.14411/eje.2014.004>
31. MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD-AB-RASHID, N-K.; ZAWAWI, N. Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 1, p. 172-187, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152>
32. BELINA-ALDEMITA, M. D.; et al. Safety aspects of stingless bee pot-pollen

- from the Philippines. **Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment**, v. 71, n. 2, p. 87-100, 2020. <https://doi.org/10.2478/boku-2020-0009>
33. ROSA, C. A.; et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271-275, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00173-9)
34. TEIXEIRA, A. C. P.; et al. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 339-343, 2003. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02262-0>
35. DANIEL, H-M.; et al. *Starmerella neotropicalis* fa, sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt\_10, p. 3896-3903, 2013. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.055897-0>
36. MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD-AB-RASHID, N-K.; ZAWAWI, N. Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 957, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26040957>
37. ARES, A. M.; et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009>
38. KHALIFA, S. A. M.; et al. Bee pollen: Current status and therapeutic potential. **Nutrients**, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13061876>
39. TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E.; LIEW, W. P. P. **Nutrients and oxidative stress: Friend or foe? Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9719584>
40. ÁVILA, S.; et al. Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.068>
41. GHELDOF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human

- serum samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3050-3055, 2002. <https://doi.org/10.1021/jf0114637>
42. GHELDOF, N.; WANG, X-H.; ENGESETH, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5870-5877, 2002. <https://doi.org/10.1021/jf0256135>
43. DO NASCIMENTO, K. S.; et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. **LWT**, v. 91, p. 85-94, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.016>
44. TORRES, A. R.; et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, 2018. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187118>
45. REBELO, K. S.; et al. Nutritional composition and bioactive compounds of *Melipona seminigra* pot-pollen from Amazonas, Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2021. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11134>
46. BELINA-ALDEMITA, M. D.; SCHREINER, M.; D'AMICO, S. Characterization of phenolic compounds and antioxidative potential of pot-pollen produced by stingless bees (*Tetragonula biroi* Friese) from the Philippines. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 1, p. e13102, 2020. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13102>
47. DOMENICI, V.; et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, p. 248-259, 2015. <http://dx.doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v191>
48. EHLENFELDT, M. K.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2222-2227, 2001. <https://doi.org/10.1021/jf0013656>
49. LENQUISTE, S. A.; et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, p. 162-170, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.023>

50. LIAO, Y.; et al. The ameliorating effects of bee pollen on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 379-388, 2019. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00552>
51. VAUZOUR, D. Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1042-1056, 2014. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6473>
52. SHIF, O.; GILLETTE, K.; DAMKAOUTIS, C. M.; CARRANO, C.; ROBBINS, S. J.; HOFFMAN, J. R. Effects of *Ginkgo biloba* administered after spatial learning on water maze and radial arm maze performance in young adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, p. 17–25, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.04.003>
53. HOFFMAN, J. R.; DONATO, A.; ROBBINS, S. J. *Ginkgo biloba* promotes shortterm retention of spatialmemory in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, p. 533-539, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.12.006>