

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Pólen e pão de abelha: estudo exploratório da composição proximal,  
capacidade de desativação de espécies reativas e bioacessibilidade**

**Leila Muriel de Souza Gallan**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra  
em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia  
de Alimentos

**Piracicaba  
2024**

**Leila Muriel de Souza Gallan**  
**Nutricionista – Bacharela**

**Pólen e pão de abelha: estudo exploratório da composição proximal, capacidade de  
desativação de espécies reativas e bioacessibilidade**  
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título  
de Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba**  
**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Gallan, Leila Muriel de Souza

Pólen e pão de abelha: estudo exploratório da composição proximal, capacidade de desativação de espécies reativas e bioacessibilidade / Leila Muriel de Souza Gallan -- versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2024

68 p.

Dissertação (Mestrado) -- USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Digestão *in vitro* 2. Composição proximal 3. Compostos fenólicos 4. Pólen apícola 5. *Apis mellifera* l. Título

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos, pela proteção e por sempre guiar meus passos;

À Nossa Senhora da Conceição Aparecida, por sua intercessão e sagrada proteção;

À toda a minha família, pelo incentivo, bons momentos, amor e sábios conselhos;

Ao meu marido Diego, pelos anos vividos, batalhas vencidas, companheirismo, amor, apoio e paciência;

À minha “filha de 4 patas” Amora, por ser sempre minha companheira;

Aos meus sogros, Betti e Walter, por toda ajuda, incentivo e carinho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, pela confiança na realização deste trabalho, por compartilhar seus conhecimentos e pela ajuda nos momentos necessários;

À Breyer (produtos das abelhas), por fornecer o pão de abelha e o pólen apícola para a realização do trabalho;

Aos amigos do Laboratório Multiusuário de Bioquímica, que me ajudaram na realização deste trabalho, que sempre estarão na memória e no coração, em especial à Sofia, Pollyanna, Larissa, José Eduardo e Regina;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, aos professores e funcionários do departamento de Agroindústrias, Alimentos e Nutrição;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 Abelhas.....	13
2.2 Pólen apícola .....	14
2.3 Pão de abelha .....	15
2.4 Processos oxidativos e espécies reativas.....	17
2.5 Radical peroxila (ROO•).....	18
2.6 Radical hipocloroso (HOCl) .....	19
2.7 Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	19
2.8 Compostos fenólicos .....	20
2.9 Flavonoides .....	22
2.10 Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	23
2.11 Bioacessibilidade e biodisponibilidade.....	25
2.12 Células Caco-2 .....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1 Coleta das amostras de pão de abelha e pólen apícola.....	31
3.2 Composição proximal .....	32
3.2.1 Cinzas.....	33
3.2.2 Umidade .....	33
3.2.3 Proteína bruta .....	34
3.2.4 Lipídeos totais .....	34
3.2.5 Açúcares redutores totais .....	35
3.3 Preparo de extrato etanólico das amostras .....	35
3.4 Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	36
3.5 Avaliação do transporte epitelial em sistema de células humanas Caco-2.....	37
3.5.1 Cultivo de células Caco-2 .....	37

3.5.2 Cultivo de células para ensaio de transporte .....	37
3.5.3 Teste de viabilidade celular (MTT) .....	38
3.5.4 Ensaio de transporte em células Caco-2 .....	39
3.6 Análises químicas dos extratos, fases da digestão e frações do transporte epitelial .....	39
3.6.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigênio) .....	39
3.6.2 Sequestro do radical ácido hipocloroso (HOCl).....	39
3.6.3 Sequestro do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	40
3.6.4 Teor de fenólicos totais .....	40
3.6.5 Teor de flavonoides totais .....	41
3.6 Análise estatística .....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
4.1 Composição proximal.....	43
4.2 Transporte epitelial do BB e BP em monocamadas de células Caco-2.....	44
4.3 Desativação do HOCl.....	45
4.5 Sequestro do radical peroxila (ROO•).....	46
4.6 Sequestro do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	48
4.7 Teor de fenólicos totais.....	49
4.8 Teor de flavonoides totais .....	52
5. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS .....	57

## RESUMO

### **Pólen e pão de abelha: estudo exploratório da composição proximal, capacidade de desativação de espécies reativas e bioacessibilidade**

O pão de abelha, em inglês chamado *bee bread*, é um alimento natural produzido após várias reações bioquímicas do pólen apícola coletado por abelhas da espécie *Apis mellifera*, as quais acontecem ao decorrer de sete dias, incluindo a fermentação láctica. Por ser rico em aminoácidos essenciais, ácidos graxos, açúcares simples e proteínas, além de fortalecedor do sistema imunológico, é considerado um alimento funcional pois apresenta várias propriedades bioativas, como atividade antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo obter uma maior compreensão do potencial nutricional e bioativo do pão de abelha diante do pouco conhecimento existente. Avaliou a composição proximal de amostras de pão de abelha e de pólen apícola do Estado do Paraná, atividade antioxidante pela avaliação da capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio (ERO), composição fenólica, digestão *in vitro* e transporte epitelial de compostos fenólicos em células Caco-2. Na composição proximal o pão de abelha apresentou 53 % de açúcares redutores totais, 15 % de proteínas, 2 % de lipídeos, 19 % de umidade e 1 % de cinzas e o pólen apícola apresentou 49 % de açúcares redutores totais, 25 % de proteínas, 2 % de lipídeos, 18 % de umidade e 2 % de cinzas. Os teores de fenólicos totais do pão de abelha no extrato não digerido foi de 165 mg EAG/g, na fração digerida 146 mg EAG/g e na fração transportada 69 mg EAG/g e do pólen apícola no extrato não digerido 120 mg EAG/g, na fração digerida 114 mg EAG/g e na fração transportada 51 mg EAG/g. Verificou-se que o pão de abelha e o pólen apícola, apresentam características físico-químicas similares, porém, o pão de abelha apresentou grande valor nutricional e compostos bioativos, corroborando para a classificação de “alimentos funcionais” e contribuindo positivamente para a saúde humana.

Palavras-chave: Digestão *in vitro*, Composição proximal, Compostos fenólicos, Pólen apícola, *Apis mellifera*

## ABSTRACT

### **Pollen and bee bread: exploratory study of proximal composition, ability to deactivate reactive species and bioaccessibility**

Bee bread is a natural food produced after various biochemical reactions of bee-collected honeybee pollen from the *Apis mellifera* species, which occur over the course of seven days, including lactic fermentation. Rich in essential amino acids, fatty acids, simple sugars, and proteins, as well as immune system booster, it is considered a functional food because it presents several bioactive properties, such as antioxidant activity. The present study aimed to obtain a better understanding of the nutritional and bioactive potential of bee bread given the limited existing knowledge. It evaluated the proximate composition of Brazilian bee bread and honeybee pollen samples from the state of Paraná, antioxidant activity by assessing the ability to deactivate reactive oxygen species (ROS), phenolic composition, *in vitro* digestion, and epithelial transport of phenolic compounds in Caco-2 cells. In the proximate composition, bee bread presented 53% total reducing sugars, 15% proteins, 2% lipids, 19% moisture, and 1% ash, while honeybee pollen presented 49% total reducing sugars, 25% proteins, 2% lipids, 18% moisture, and 2% ash. The total phenolic content of bee bread in the undigested extract was 165 mg GAE/g, in the digested fraction 146 mg GAE/g, and in the transported fraction 69 mg GAE/g, and of honeybee pollen in the undigested extract 120 mg GAE/g, in the digested fraction 114 mg GAE/g, and in the transported fraction 51 mg GAE/g. It was found that bee bread and honeybee pollen have similar physicochemical characteristics; however, bee bread showed high nutritional value and bioactive compounds, supporting the classification as "functional foods" and positively contributing to human health.

Keywords: *In vitro* digestion, Proximal composition, Phenolic compounds, Bee pollen, *Apis mellifera*





## 1. INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais além de fornecerem nutrientes essenciais, contêm componentes biologicamente ativos que oferecem benefícios adicionais à saúde (COŞKUN, 2005; GIANNETTI; TESTANI; RECCHIA, 2009). Eles têm uma grande influência no bem-estar e na qualidade de vida humana, pois proporcionam não apenas nutrição, mas também benefícios específicos à saúde. Esses alimentos podem melhorar a saúde cardiovascular, promover a saúde digestiva, fortalecer o sistema imunológico e auxiliar no controle de peso. Incorporar alimentos funcionais em uma dieta equilibrada e estilo de vida saudável é importante para obter esses benefícios (ASHAOLU, 2020; FERGUSON, 2009).

Por apresentarem grande valor nutricional e compostos bioativos, o pólen coletado pelas abelhas e o pão de abelha (*bee bread* - BB), são considerados “alimentos funcionais”. Sendo ricos em aminoácidos essenciais, ácidos graxos, açúcares simples e proteínas, fortalecem a imunidade e contribuem positivamente para a saúde humana (BOBIŞ; MĂRGHITAŞ; DEZMIREAN; MORAR *et al.*, 2010).

O pólen de abelha (*bee pollen* - BP) é um produto natural, resultante da junção do pólen das flores com o néctar (ou mel) e glândulas segregadas das abelhas (CAMPOS; BOGDANOV; DE ALMEIDA-MURADIAN; SZCZESNA *et al.*, 2008). A quantidade de compostos bioativos, carboidratos, enzimas, vitaminas, ácidos graxos, carotenoides e aminoácidos essenciais dependem diretamente da origem botânica e geográfica das plantas fornecedoras de pólen. Com a presença desses nutrientes e minerais (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu), ele se torna um alimento de alto valor biológico (LINSKENS, 1999).

Ao longo do armazenamento no favo de mel, o pólen coletado pelas abelhas, juntamente com o mel, enzimas digestivas e a fermentação do ácido láctico por bactérias (*Pseudomonas* spp. e *Lactobacillus* spp.) e leveduras (*Saccharomyces* spp.) produzirão o BB. No decorrer dessa transformação, a acidez é aumentada enquanto o sitosterol e vitaminas (ácido ascórbico e piridoxina) podem sofrer alterações (URCAN; CRISTE; DEZMIREAN; MARGAOAN *et al.*, 2018).

Assim, a transformação de BP para BB é concluída após sete dias de diversos estágios bioquímicos que incluem, crescimento de microrganismos no primeiro dia (bactérias e leveduras), queda no pH, redução da carga de *Streptococcus* e desenvolvimento de *Lactobacillus*, e por último ocorre a morte de bactérias lácticas e algumas leveduras (KHALIFA; ELSHAFIEY; SHETAIA; EL-WAHED *et al.*, 2021).

A quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) presentes no BB é importante para as abelhas e os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) são relevantes tanto para as abelhas quanto para a nutrição humana, tornando este produto natural uma boa fonte desses lipídeos (KAPLAN; KARAOĞLU; SILICI, 2019; MARGAOAN; MARGHITAS; DEZMIREAN; DULF *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm sido realizados com o BP e BB, avaliando os valores nutricionais e os compostos bioativos. No entanto, poucos estudos abordam o conteúdo nutricional e fitoquímico de BP e BB após a digestão. Tópicos como alterações no trato digestivo, bioacessibilidade pós-digestiva, quantificação de absorção de tecidos e o grau de presença no sistema circulatório de fitoquímicos, que fornecem fortes propriedades biológicas para BP e BB devem ser levados em consideração para a identificação do real valor nutritivo e bioativos deles (AYLANC; FALCÃO; ERTOSUN; VILAS-BOAS, 2021).

Os processos oxidativos ocorrem naturalmente no organismo como resultado do metabolismo celular normal. Durante esses processos, moléculas chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidas. Essas espécies são reativas e podem causar danos às células (KAPOOR; SINGH; KUMAR; ROMERO *et al.*, 2019). As EROs incluem radicais livres, como o radical hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ), o radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), enquanto as ERNs incluem o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (OZCAN; OGUN, 2015).

O estresse oxidativo está associado a várias condições de saúde (doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, envelhecimento e outras doenças crônicas). As espécies reativas podem danificar as células e contribuir para a inflamação, danos ao DNA e disfunção celular (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008). É importante manter um bom equilíbrio entre a produção de espécies reativas e os mecanismos antioxidantes no organismo. Uma alimentação rica em antioxidantes (frutas, vegetais e alimentos funcionais) pode ajudar a reduzir os efeitos negativos das espécies reativas e promover o bem-estar geral.

A biodisponibilidade e a bioacessibilidade de alimentos são conceitos relacionados à disponibilidade e absorção de nutrientes e compostos bioativos presentes nos alimentos (PARADA; AGUILERA, 2007). A biodisponibilidade refere-se à quantidade de nutrientes que é absorvida e se torna disponível para utilização pelo organismo, levando em consideração fatores como a digestão, absorção e metabolismo. Já a bioacessibilidade refere-se à quantidade de nutrientes e compostos bioativos que são liberados do alimento durante a digestão e estão disponíveis para interagir com as células do organismo (REIN; RENOUF;

CRUZ-HERNANDEZ; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2013). Esses conceitos são importantes para avaliar o potencial nutricional e os benefícios à saúde de diferentes alimentos, ajudando a entender como os nutrientes são absorvidos e utilizados pelo corpo humano.

A digestão gastrointestinal *in vitro* é um método de laboratório que simula o processo de digestão que ocorre no trato gastrointestinal humano. Esse método é usado para estudar a quebra de alimentos, a liberação de nutrientes e a avaliação da disponibilidade e absorção de nutrientes, sendo uma ferramenta importante na pesquisa de alimentos e nutrição (GIANNIS; KOLTER, 1993).

As células Caco-2 são uma linhagem de células epiteliais derivadas de um carcinoma colorretal humano. Elas são amplamente utilizadas como um modelo *in vitro* para estudar a absorção e o transporte de substâncias através da barreira intestinal (HIDALGO; RAUB; BORCHARDT, 1989). Elas desenvolvem características semelhantes às células intestinais (polaridade, expressão de transportadores e enzimas digestivas). Esse modelo celular permite avaliar a permeabilidade de compostos, a interação entre fármacos e nutrientes com as células intestinais, e o estudo da absorção oral de substâncias (SAMBUY; DE ANGELIS; RANALDI; SCARINO *et al.*, 2005).

Diante do pouco conhecimento relacionado com o potencial nutricional e bioativo do BB, uma maior compreensão deste produto poderá propiciar o desenvolvimento de novos alimentos e dietas com benefícios para a saúde humana, além de promover a atividade apícola nacional.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Abelhas

Os produtos derivados das abelhas, como mel, própolis, pólen e geleia real, são amplamente utilizados na medicina popular devido às suas propriedades e ao conteúdo de moléculas bioativas que possuem (HELEN; ROBERTS; COOPER; JENKINS, 2016).

As abelhas *Apis mellifera* são originárias da Europa, África e Oriente Médio, mas foram introduzidas em várias partes do mundo devido ao seu valor econômico como polinizadoras e produtoras de mel (LE CONTE; NAVAJAS, 2008). Elas são conhecidas por sua organização social altamente complexa, com uma colmeia composta por uma rainha, zangões e abelhas operárias (PAGE; FONDRK, 1995).

As abelhas melíferas são altamente sociais e vivem em colônias complexas, chamadas de colmeias. Cada colônia é composta por três castas principais, a rainha, os zangões e as operárias (PERNAL, 2021).

Existe apenas uma rainha em cada colônia, sendo que sua principal função é reproduzir e garantir a sobrevivência da colônia. Ela é a maior abelha da colônia e é responsável por colocar ovos. Os zangões são os machos da colônia e sua única função é acasalar com a rainha. Eles não têm ferrão e não são capazes de coletar néctar ou pólen. As operárias são as abelhas estéreis que constituem a maioria da população da colônia. Elas desempenham várias tarefas, como coletar néctar e pólen, construir e proteger a colmeia, alimentar as larvas e cuidar da rainha (PERNAL, 2021).

As abelhas melíferas se comunicam principalmente através de danças, chamadas de "dança das abelhas". Essas danças são usadas para transmitir informações sobre a localização de fontes dos alimentos, como néctar e pólen, para outras abelhas da colônia (ALVES; GEORGE; KAUR; BROCKMANN *et al.*, 2023).

Na colmeia, as abelhas obtêm sua nutrição principalmente de duas fontes vegetais: néctar e pólen. O néctar é coletado e transformado em mel, fornecendo às abelhas uma fonte rica em carboidratos. Já o pólen das flores é transformado em BB, que é uma fonte importante de carboidratos, além de outros nutrientes essenciais (proteínas, gorduras, minerais e vitaminas). Além disso, o pólen é uma fonte significativa de compostos antioxidantes, incluindo compostos fenólicos,  $\alpha$ -tocoferol e coenzima Q10. Esses compostos auxiliam na proteção celular contra danos oxidativos e também desempenham um papel importante na

saúde das abelhas (URCAN; MĂRGHITAȘ; DEZMIREAN; BOBIȘ *et al.*, 2017; ZULUAGA; SERRATOB; QUICAZANA, 2015).

## 2.2 Pólen apícola

Os grãos de pólen são pequenas estruturas microscópicas encontradas nas anteras dos estames de plantas angiospermas e gimnospermas. Eles representam o gametófito masculino das plantas e desempenham um papel crucial na polinização. Além disso, para muitos insetos, especialmente as abelhas, o pólen é uma fonte fundamental de alimento sólido (TCHÓRZEWSKA; MARCINIEC; DERYŁO; WINIARCZYK, 2020). Na apicultura, o pólen é valorizado como uma importante fonte de proteínas, gorduras e minerais para as abelhas. Esses nutrientes são essenciais para o desenvolvimento e a saúde das colônias de abelhas, fornecendo-lhes os elementos necessários para seu crescimento, reprodução e resistência a doenças (BARRETO; FUNARI; ORSI; DIB, 2006; BARTH, 1989; MORETI; MARCHINI; SOUZA; RODRIGUES, 2002; VIT, 2004).

De acordo com a Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o pólen apícola é definido como o produto resultante da aglutinação do pólen das flores pelas abelhas operárias, utilizando néctar e substâncias salivares. Esse pólen apícola é coletado diretamente das colmeias. Essa definição estabelece as características e origem do pólen apícola, identificando-o como um produto produzido pelas abelhas a partir do pólen das flores, utilizando seus processos de coleta e transformação na colmeia (PEREIRA; FREITAS; FREITAS; MARACAJÁ *et al.*, 2015).

O BP é composto por uma variedade de nutrientes, incluindo vitaminas antioxidantes (KHALIFA; ELASHAL; KIELISZEK; GHAZALA *et al.*, 2020). Essas vitaminas incluem vitamina C, vitamina E e o betacaroteno (precursor da vitamina A). Além destas, ele também pode ser composto por vitaminas do complexo B, que desempenham um papel importante no metabolismo energético e na saúde do sistema nervoso. Algumas variedades de BP também podem conter vitamina D, que desempenha um papel essencial na saúde óssea (CAMPOS; CUNHA; MARKHAM, 1997; MUNIATEGUI; SANCHO; LOPEZ; HUIDOBRO *et al.*, 1990).

As vitaminas antioxidantes têm a capacidade de neutralizar os radicais livres, que são moléculas instáveis e reativas produzidas naturalmente durante o metabolismo celular ou resultantes de influências externas (exposição ao sol, poluentes ambientais e tabagismo)

(SALIM; SHUIB; MOHD YUSOF, 2022). O acúmulo excessivo de radicais livres pode levar ao estresse oxidativo, que está associado ao envelhecimento celular e ao desenvolvimento de doenças degenerativas. As vitaminas antioxidantes (C e E) e o betacaroteno (precursor da vitamina A), ajudam a estabilizar os radicais livres, reduzindo o dano oxidativo às células e tecidos (ELLIOTT, 1999; TURKYILMAZ; YANARDAĞ, 2023).

O conteúdo de macro e micronutrientes do BP pode ser influenciado pela origem botânica, por ser coletado pelas abelhas em diferentes espécies de plantas e flores, cada tipo de planta ter uma composição nutricional única (MATUSZEWSKA; PLEWA; PIETKIEWICZ; KOSSAKOWSKI *et al.*, 2022; ROJO; ESCUREDO; RODRÍGUEZ-FLORES; SEIJO, 2023). A quantidade e proporção desses nutrientes podem variar dependendo das plantas das quais as abelhas coletaram o pólen. Por exemplo, algumas plantas podem ter pólen com maior teor de proteínas, enquanto outras podem ser mais ricas em vitaminas específicas. Da mesma forma, a presença e concentração de minerais também podem variar de acordo com a origem botânica do pólen (ALMEIDA-MURADIAN; PAMPLONA; COIMBRA; BARTH, 2005; BARRETO; FUNARI; ORSI; DIB, 2006; MARKOWICZ BASTOS; MONIKA BARTH; ISABEL ROCHA; DA SILVA CUNHA *et al.*, 2004; VILLANUEVA; MARQUINA; SERRANO; ABELLÁN, 2002).

### **2.3 Pão de abelha**

Nas colmeias, o pólen é utilizado pelas abelhas como matéria-prima para a produção do BB. Durante a coleta de pólen, as abelhas operárias coletam o pólen das anteras das plantas e o misturam com uma pequena quantidade de secreção das glândulas salivares e/ou néctar. Esse pólen é então armazenado em cestas (corbículas), localizados na tíbia das patas traseiras das abelhas. As abelhas transportam essas cargas de pólen de volta para a colmeia. Uma vez na colmeia, as cargas de pólen são acondicionadas nas células do favo de mel e cobertas com uma fina camada de mel e uma tampa de cera. Essa combinação cria um ambiente anaeróbico dentro das células do favo. No entanto, mesmo nessas condições anaeróbicas, o BP ainda está sujeito à deterioração microbiológica. É importante que os apicultores tomem medidas para garantir a qualidade do BP, incluindo práticas de higiene adequadas durante a coleta e o armazenamento. O controle adequado da umidade e a garantia de condições de armazenamento adequadas também são essenciais para minimizar a deterioração microbiológica e manter a qualidade do BP nas colmeias (CASTEEL, 2022; DIDARAS;



KARATASOU; DIMITRIOU; AMOUTZIAS *et al.*, 2020; KOMOSINSKA-VASSEV; OLCZYK; KAZMIERCZAK; MENCNER *et al.*, 2015).

O mecanismo exato dos processos de biotransformação do BP em BB ainda não é totalmente compreendido. No entanto, pesquisas indicam que diferentes enzimas presentes nas glândulas das abelhas desempenham um papel importante nesse processo. As amilases são enzimas responsáveis pela hidrólise do amido, em açúcares mais simples (NKHATA; AYUA; KAMAU; SHINGIRO, 2018). Além disso, também foram identificadas bactérias presentes na saliva das abelhas e nas superfícies das cargas de pólen, como bactérias do ácido láctico (LAB) e bactérias do gênero *Pseudomonas*, bem como leveduras do gênero *Saccharomyces*, que desempenham um papel fundamental no processo de biotransformação. Esses microrganismos podem estar envolvidos na fermentação do pólen, ajudando a modificar sua composição química e tornando-o mais adequado como alimento para as abelhas. Acredita-se que a fermentação realizada pelas bactérias do ácido láctico e pelas leveduras possa contribuir para a quebra de componentes complexos do pólen, aumentando sua disponibilidade nutricional para as abelhas (DIDARAS; KARATASOU; DIMITRIOU; AMOUTZIAS *et al.*, 2020; DISAYATHANOOWAT; LI; SUPAPIMON; SUWANNARACH *et al.*, 2020; GILLIAM, 1979; VÁSQUEZ; OLOFSSON, 2009).

O desenvolvimento da população de LAB desempenha um papel fundamental na preservação do BB. Durante o processo de biotransformação do BP em BB, as LAB estão envolvidas na hidrólise de triacilgliceróis presentes no pólen, resultando na produção de ácido láctico e possivelmente outros metabólitos de atividade antimicrobiana, como as bacteriocinas. A presença de ácido láctico e outros compostos antimicrobianos contribui para a preservação do BB, inibindo o crescimento de microrganismos indesejados. Além disso, adições de mel e polifenóis presentes no pólen apícola (matéria-prima) aumentam ainda mais o potencial antimicrobiano do BB (DISAYATHANOOWAT; LI; SUPAPIMON; SUWANNARACH *et al.*, 2020).

Os polifenóis são compostos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, que ajudam a prolongar a vida útil do BB e a protegê-lo contra a deterioração microbiológica. Esses mecanismos de defesa natural, incluindo o desenvolvimento de LAB, a produção de ácido láctico e a presença de mel e polifenóis, permitem o armazenamento prolongado do BB na colmeia, garantindo sua qualidade e preservando suas propriedades benéficas para as abelhas (VÁSQUEZ; OLOFSSON, 2009).

## 2.4 Processos oxidativos e espécies reativas

As espécies reativas do oxigênio estão presentes em níveis reduzidos nos sistemas biológicos, e sua quantidade é regulada pelo equilíbrio entre a produção e a remoção dessas espécies pelos antioxidantes. O estresse oxidativo surge quando ocorre um desequilíbrio entre a geração dessas espécies e a capacidade antioxidante de neutralizar o excesso delas (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2014).

Em quantidades apropriadas, as espécies reativas têm um efeito protetor nas células através de mecanismos de sinalização, entretanto, em excesso, podem provocar lesões nas macromoléculas. O estresse oxidativo é visto como um fator de risco para certas enfermidades (por exemplo, diabetes, câncer, entre outras). O controle das espécies reativas é essencial para manter a homeostase celular (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018; DROGE, 2002).

Existem duas categorias de espécies reativas encontradas nos sistemas biológicos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO incluem moléculas como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), o radical peroxila ( $ROO\bullet$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Por outro lado, as ERN são compostas pelo óxido nítrico ( $NO\bullet$ ), o dióxido de nitrogênio ( $NO_2\bullet$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (OZCAN; OGUN, 2015).

A exposição às espécies reativas desencadeia reações que ativam mecanismos de defesa no organismo. A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) desempenha um papel crucial na primeira linha de defesa, catalisando a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (MIRONCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). Além disso, outras enzimas importantes, como catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GT) e peroxiredoxinas (Prxs), são responsáveis por neutralizar o peróxido de hidrogênio. Essas enzimas atuam na proteção contra os danos causados pelas espécies reativas (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

O sistema de defesa antioxidante do organismo é composto por diferentes linhas de proteção. A primeira linha envolve substâncias não enzimáticas (ceruloplasmina, ferritina, transferrina e albumina), que inibem a formação de espécies reativas ligando-se aos metais de transição (MIRONCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). A segunda linha consiste em antioxidantes não enzimáticos que neutralizam rapidamente os radicais e oxidantes. A terceira linha de defesa é realizada por enzimas antioxidantes que reparam danos no DNA, proteínas e membranas celulares, além de interromperem a propagação dos radicais peroxila. Antioxidantes exógenos da dieta, como compostos fenólicos, podem influenciar os

antioxidantes endógenos, atuando em conjunto para manter a homeostase do organismo (PISOSCHI; POP, 2015).

## 2.5 Radical peroxila (ROO•)

O radical peroxila (ROO•) é um tipo de radical livre altamente reativo que contém o grupo funcional peróxido (ROO-). Os radicais livres são espécies químicas com elétrons desemparelhados, o que os torna altamente reativos e capazes de participar em reações químicas de oxidação e redução (MARTEMUCCI; COSTAGLIOLA; MARIANO; D'ANDREA *et al.*, 2022).

Os radicais peroxila são formados durante reações de oxidação, especialmente quando moléculas orgânicas reagem com o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) ou peróxidos. O radical peroxila é representado pelo símbolo "ROO•", onde "R" representa um grupo orgânico, e o ponto indica o elétron desemparelhado (BASCHIERI; JIN; AMORATI, 2023; MARTEMUCCI; COSTAGLIOLA; MARIANO; D'ANDREA *et al.*, 2022).

Esses radicais desempenham um papel importante em várias reações químicas, incluindo reações de auto oxidação e propagação de reações em cadeia. Em sistemas biológicos, os radicais peroxila podem ser gerados durante o metabolismo celular e estão implicados em processos de estresse oxidativo (BASCHIERI; JIN; AMORATI, 2023).

Embora os radicais peroxila sejam altamente reativos e possam causar danos às moléculas celulares, as células possuem sistemas antioxidantes que ajudam a neutralizá-los e a proteger as estruturas celulares contra o estresse oxidativo. Antioxidantes, como a vitamina C e E, são capazes de neutralizar os radicais livres, incluindo os radicais peroxila, reduzindo o dano oxidativo nas células (AKBARI; BAGHAEI-YAZDI; BAHMAIE; MAHDAVI ABHARI, 2022).

Os radicais livres, incluindo os radicais peroxila, desempenham um papel complexo em processos químicos e biológicos, e seu estudo é importante em várias áreas, como química, bioquímica, biologia e medicina. O equilíbrio entre a formação e a neutralização de radicais livres é crucial para a saúde e o funcionamento adequado dos organismos vivos (BASCHIERI; JIN; AMORATI, 2023).

## 2.6 Radical hipocloroso (HOCl)

O ácido hipocloroso (HOCl) é um agente oxidante poderoso, ele desempenha um papel importante no sistema imunológico como um mecanismo de defesa contra micro-organismos (ULFIG; LEICHERT, 2021).

É gerado pelos neutrófilos, por meio da reação entre íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), catalisada pela enzima mieloperoxidase (MPO). A sua produção controlada é essencial para combater infecções e promover a eliminação de patógenos (AKONG-MOORE; CHOW; VON KOCKRITZ-BLICKWEDE; NIZET, 2012).

Também possui propriedades antimicrobianas potentes, sendo capaz de inativar bactérias, vírus, fungos e protozoários. Ele atua oxidando e danificando componentes essenciais desses micro-organismos, levando à sua morte. O HOCl é capaz de oxidar e danificar moléculas biológicas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e lesões teciduais (SUNG; HSU; CHEN; LIN *et al.*, 2013).

O sequestro do radical HOCl é um processo pelo qual substâncias antioxidantes podem reagir com o HOCl, neutralizando sua atividade oxidante e protegendo as células e tecidos contra danos. Essas substâncias podem atuar como *scavengers* (desativadores) de radicais livres, reduzindo sua concentração e diminuindo seu potencial prejudicial. A pesquisa sobre o sequestro do radical HOCl é de grande interesse, uma vez que substâncias capazes de inibir sua atividade excessiva, podem ter aplicações terapêuticas no tratamento de doenças inflamatórias (artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e lesões pulmonares) (MIYAMOTO; MARTINEZ; RETTORI; AUGUSTO *et al.*, 2006).

## 2.7 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é uma ERO que consiste em duas moléculas de átomos de hidrogênio e dois átomos de oxigênio. As EROs são compostos quimicamente reativos que contêm oxigênio e são gerados normalmente como subprodutos do metabolismo celular aeróbico (SIES; JONES, 2020).

O peróxido de hidrogênio é um exemplo de uma ERO conhecida como peróxidos. Essas espécies são formadas pela adição de um ou mais átomos de oxigênio a uma molécula orgânica ou inorgânica. O peróxido de hidrogênio é produzido em células vivas durante várias

reações metabólicas e tem um papel importante como um agente oxidante (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

Embora seja necessário para algumas funções celulares normais, o peróxido de hidrogênio também pode ser tóxico em altas concentrações. Em níveis elevados, pode causar danos oxidativos às células, danificando proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Por esse motivo, as células têm mecanismos de defesa antioxidante, como enzimas (catalase e a glutathione peroxidase), que ajudam a decompor o peróxido de hidrogênio em produtos menos tóxicos, como água e oxigênio (ADWAS; ELSAYED; AZAB; QUWAYDIR, 2019).

## 2.8 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais comuns encontrados em alimentos. Eles pertencem à classe dos metabólitos secundários e são caracterizados por possuírem um anel aromático em sua estrutura química, acompanhado por uma ou mais hidroxilas substituintes. Essas hidroxilas conferem propriedades antioxidantes aos compostos fenólicos, permitindo que eles atuem na neutralização de radicais livres e na proteção contra o estresse oxidativo no organismo. São amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em diversas fontes alimentares, como frutas, vegetais, cereais, chás e ervas. Esses compostos desempenham um papel importante na dieta humana, pois têm sido associados a benefícios para a saúde, como redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas. Além disso, também podem contribuir para as características sensoriais dos alimentos (DE BEER; JOUBERT; GELDERBLON; MANLEY, 2002).

Os ácidos fenólicos constituem um subgrupo importante dentro dos compostos fenólicos, apresentando características particulares em sua estrutura química. Sua composição é notável por conter um anel benzênico, um grupamento carboxílico e, adicionalmente, um ou mais grupamentos hidroxilas e/ou metoxila na molécula. A classificação formal desses compostos divide-os em duas categorias principais: os derivados do ácido benzoico, exemplificado pelo ácido gálico, e os derivados do ácido cinâmico, representado pelo ácido *p*-cumárico. Os ácidos fenólicos exibem atividade antioxidante, que geralmente é determinada pela quantidade de hidroxilas presentes na molécula e pela proximidade do grupamento -COOH com o grupo fenil. Quanto mais próximo o grupamento -COOH se encontra do grupo fenil, maior é a capacidade antioxidante do ácido fenólico, especialmente quando o grupamento hidroxila está posicionado meta em relação ao grupamento carboxílico. A

presença desses ácidos fenólicos em alimentos pode fornecer benefícios à saúde, uma vez que possuem propriedades antioxidantes que ajudam a combater o estresse oxidativo no organismo. Além disso, eles também podem contribuir para as características sensoriais dos alimentos, como sabor e aroma (BURIOL, 2008; OLDONI, 2007).

A fim de desempenhar seu papel biológico como antioxidantes, os compostos fenólicos precisam possuir a capacidade de impedir, retardar ou prevenir a auto-oxidação ou oxidação provocada por radicais livres, mesmo em concentrações baixas. Os radicais livres são espécies quimicamente instáveis e altamente reativas que podem causar danos às células e tecidos do organismo por meio de reações de oxidação (HALLIWELL, 2001).

Os antioxidantes, como os compostos fenólicos, atuam neutralizando os radicais livres, ajudando a proteger as células contra danos oxidativos. Além disso, é importante que o produto formado após a reação antioxidante seja estável. Isso significa que o composto fenólico, após reagir com o radical livre, deve ser convertido em um produto inerte e não reativo, sem a formação de novos radicais livres. Dessa forma, evita-se o ciclo de reações de oxidação em cadeia, mantendo a estabilidade e o equilíbrio no organismo (KAUR; KAPOOR, 2001).

A capacidade dos compostos fenólicos de atuarem como antioxidantes depende de sua estrutura química, incluindo a presença e posição dos grupamentos hidroxilas, bem como de outros fatores como concentração, interações com outros compostos e o ambiente em que estão presentes. Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes quando são capazes de combater os radicais livres e prevenir danos oxidativos, desde que sejam eficazes em baixas concentrações e que o produto resultante seja estável e inerte (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Os compostos antioxidantes podem ser classificados em duas categorias principais: aqueles com atividade enzimática e aqueles que não possuem essa atividade. Na primeira classe, temos os compostos antioxidantes com atividade enzimática (capazes de inibir a oxidação logo no início, removendo as espécies reativas de oxigênio). Essas enzimas têm a função de neutralizar os radicais livres e outras espécies oxidantes, protegendo as células contra danos oxidativos. Exemplos de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Já na segunda classe, encontramos os compostos antioxidantes que não possuem atividade enzimática, mas que interagem com as espécies radicalares e são consumidos durante a reação oxidativa. Essas moléculas atuam como doadores de elétrons ou hidrogênio, neutralizando os radicais livres e prevenindo a propagação das reações de

oxidação em cadeia. Os compostos fenólicos, são antioxidantes naturais e se enquadram nessa categoria. Além dos compostos fenólicos, existem outros antioxidantes naturais, como as vitaminas C e E, carotenoides, flavonoides, entre outros (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004; NICOLLE; CARDINAULT; GUEUX; JAFFRELO *et al.*, 2004).

## 2.9 Flavonoides

A palavra “flavonoide” tem sua origem no latim “*flavus*” (amarelo). Inicialmente, o conceito de flavonoides se referia somente a um grupo de compostos que possuíam coloração amarela. Ao longo do tempo, a definição foi ampliada para incluir também compostos menos coloridos; e até mesmo incolores (EVANS; TREASE, 2002).

Os flavonoides constituem uma ampla classe de compostos de origem natural e não são sintetizados no organismo humano, sendo encontrados em uma variedade de alimentos vegetais (frutas, legumes, mel, própolis, entre outros) (STEVANOVIC; DIOUF; GARCIA-PEREZ, 2009). Estes, desempenham papéis importantes na proteção das plantas contra danos oxidativos, e são associados a benefícios para a saúde humana. Possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e cardioprotetoras, entre outras (TUNGMUNNITHUM; THONGBOONYOU; PHOLBOON; YANGSABAI, 2018).

É importante ressaltar que os flavonoides podem variar em sua estrutura química e propriedades biológicas, o que contribui para a diversidade de efeitos que eles podem ter no organismo humano. Sua presença em alimentos vegetais é uma das razões pelas quais uma dieta rica em frutas, legumes e ervas é recomendada para promover uma alimentação saudável e equilibrada (MALEŠEV; KUNTIĆ, 2007; OLDONI, 2007).

Desempenham múltiplas funções nas plantas, incluindo a absorção de radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível. Essa propriedade permite que eles atuem como protetores contra os danos causados pela radiação UV da luz solar (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013). Além disso, também são importantes na defesa das plantas contra microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. Eles atuam como uma barreira química, inibindo o crescimento e a proliferação desses microrganismos e contribuindo para a resistência das plantas a infecções (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006).

Eles são responsáveis pela coloração das flores e outras estruturas vegetais, atraindo polinizadores, como abelhas, borboletas e pássaros. A coloração vibrante das flores é um mecanismo de comunicação visual que facilita a polinização, permitindo a transferência de

pólen entre as plantas e a reprodução. Assim, os flavonoides desempenham uma série de funções importantes nas plantas, desde a proteção contra a radiação UV até a defesa contra patógenos e a interação com polinizadores. Essas substâncias têm despertado grande interesse devido aos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde humana, como antioxidantes e possíveis agentes terapêuticos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998; OLDONI, 2007).

Os flavonoides possuem uma estrutura básica composta por um anel heterocíclico com três anéis de carbono (anel A, B e C) e um anel adicional de benzeno (anel D). Essa estrutura básica pode apresentar várias modificações, como a presença de múltiplos grupos hidroxila, glicosil, oxigênios ou grupos metil, que conferem diversidade aos flavonoides. Com base no estado de oxidação do anel heterocíclico, os flavonoides podem ser classificados em diferentes categorias, sendo: flavonas e flavonois (possuem uma cetona na posição C4 do anel C). Flavanonas e flavanonois: Possuem uma cetona na posição C4 do anel C e uma hidroxila na posição C3. Antocianidinas: flavonoides pigmentados que apresentam uma ou mais hidroxilas na posição C3. Isoflavonoides: possuem um anel heterocíclico adicional chamado de pirano. Catequinas: possuem um anel adicional de benzeno ligado ao anel C. Essas são apenas algumas das classes de flavonoides existentes, e cada uma delas pode apresentar uma variedade de estruturas e substituições químicas (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

É importante destacar que a diversidade estrutural dos flavonoides contribui para a ampla gama de propriedades biológicas associadas a essas substâncias. Sua presença em alimentos vegetais tem despertado interesse devido aos potenciais efeitos benéficos para a saúde humana, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e cardioprotetora, entre outras (CABRAL, 2008; LIU; LI; HUANG; CHEN *et al.*, 2013; MALEŠEV; KUNTIĆ, 2007).

## **2.10 Digestão gastrointestinal *in vitro***

O sistema digestório humano é composto pelo trato gastrointestinal, que inclui a boca, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Esses órgãos trabalham em conjunto para realizar a digestão dos alimentos e a absorção dos nutrientes. Além do trato gastrointestinal, existem as glândulas acessórias que desempenham um papel importante no processo digestivo (BERNE; LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2008).



As glândulas salivares produzem saliva, que contém enzimas que ajudam na digestão inicial dos alimentos na boca. O fígado produz a bile, que é armazenada na vesícula biliar e desempenha um papel essencial na digestão e absorção de gorduras. O pâncreas secreta enzimas digestivas no intestino delgado para auxiliar na quebra dos alimentos. Em conjunto, o trato gastrointestinal e as glândulas acessórias trabalham para processar os alimentos, quebrando-os em nutrientes que podem ser absorvidos pelo corpo e utilizados para diversas funções (PELASEYED; BERGSTRÖM; GUSTAFSSON; ERMUND *et al.*, 2014).

Compreender o sistema digestório humano é realmente essencial para o desenvolvimento de métodos de digestão *in vitro* que se assemelhem às condições fisiológicas *in vivo*. Os protocolos de digestão *in vitro* tentam simular os principais compartimentos do trato digestório, reproduzindo as condições e os processos que ocorrem durante a digestão real (LEE; JO; JEONG; CHOI *et al.*, 2023).

Na fase oral, pode-se simular a mastigação e a ação das enzimas salivares, que ajudam na quebra inicial dos alimentos. Na fase gástrica, é possível reproduzir a ação do suco gástrico, que contém ácido clorídrico e enzimas como a pepsina, responsáveis pela digestão de proteínas. Já na fase intestinal, pode-se simular a ação das enzimas pancreáticas (bile e microbiota intestinal), que desempenham um papel importante na digestão e absorção de nutrientes (MULET-CABERO; EGGER; PORTMANN; MÉNARD *et al.*, 2020).

Ao compreender o sistema digestório e seus processos, é possível ajustar os parâmetros dos métodos de digestão *in vitro* (pH, tempo de incubação, concentração de enzimas, entre outros), de modo a reproduzir as condições fisiológicas reais. Isso permite uma melhor avaliação da biodisponibilidade e bioacessibilidade de nutrientes em diferentes alimentos, bem como a compreensão dos efeitos da digestão na liberação e absorção de compostos bioativos (MULET-CABERO; EGGER; PORTMANN; MÉNARD *et al.*, 2020).

O INFOGEST, uma rede internacional que segue um protocolo desenvolvido para análise de alimentos sob condições simuladas do sistema digestório, descreve um procedimento de digestão *in vitro* composto por três fases: oral, gástrica e intestinal. Na fase oral, são utilizados a enzima  $\alpha$ -amilase e o fluido salivar simulado (SSF) contendo uma combinação de KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , HCl,  $\text{CaCl}_2$  e pH 7,0, com duração de 2 minutos. A fase gástrica envolve a enzima pepsina e o fluido gástrico simulado (SGF) composto por KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ , NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , HCl,  $\text{CaCl}_2$  e pH 3,0, com duração de 2 horas. Por fim, a fase intestinal é constituída por pancreatina, bile e o fluido intestinal simulado (SIF) contendo KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,

MgCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, NaCl, HCl, CaCl<sub>2</sub> e pH 7,0, com duração de 2 horas (figura 1) (MINEKUS; ALMINGER; ALVITO; BALLANCE *et al.*, 2014).

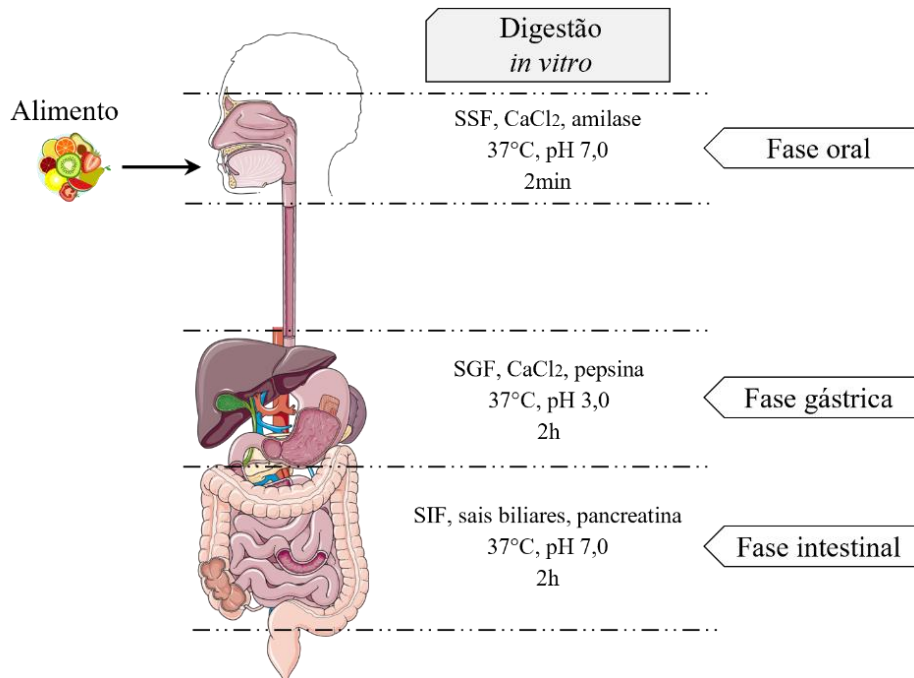


Figura 1. Esquema representativo do mecanismo de digestão *in vitro*. (Próprio autor)

## 2.11 Bioacessibilidade e biodisponibilidade

A bioacessibilidade diz respeito à quantidade de um determinado nutriente presente em um alimento que é liberada e se torna disponível para absorção no trato gastrointestinal durante o processo de digestão. Essa fração bioacessível representa a quantidade máxima do nutriente que pode ser absorvida através do epitélio intestinal. É de suma importância enfatizar que o conteúdo total de um nutriente presente no alimento nem sempre é completamente liberado durante a digestão, e tampouco toda a quantidade liberada é absorvida pelo organismo. A quantidade efetivamente absorvida pelo organismo pode ser inferior àquela presente na fração bioacessível. Nesse contexto, a bioacessibilidade se apresenta como uma medida de notável relevância a ser ponderada, pois nem todo nutriente presente em um alimento é, necessariamente, disponibilizado para ser absorvido e aproveitado pelo organismo (CARDOSO; AFONSO; LOURENÇO; COSTA *et al.*, 2015; SOUZA; SOUZA; SANTANA; ARAUJO *et al.*, 2018).

Os testes de bioacessibilidade podem ser realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os testes *in vitro* são realizados em laboratório, onde se simulam as condições fisiológicas

durante a digestão humana. Existem diferentes métodos *in vitro* que podem ser utilizados para avaliar a bioacessibilidade de nutrientes e compostos bioativos em alimentos. Esses métodos envolvem a simulação dos principais compartimentos do trato gastrointestinal, como a boca, o estômago e o intestino delgado, utilizando diferentes soluções, enzimas digestivas e condições de pH adequadas. O objetivo desses testes é determinar a quantidade de nutrientes que é liberada e se torna disponível para a absorção durante a digestão (SOUZA; SOUZA; SANTANA; ARAUJO *et al.*, 2018).

Já os testes *in vivo* são realizados em seres humanos ou animais, e envolvem a coleta de amostras biológicas (sangue, urina, cabelos e unhas), para avaliar a absorção e a concentração de nutrientes e compostos bioativos após a ingestão de alimentos. Esses estudos de balanço de massa e concentração tecidual permitem uma avaliação mais direta da biodisponibilidade e do metabolismo dos nutrientes no organismo (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017).

Os testes *in vitro* são realizados em laboratório, geralmente utilizando células Caco-2. Essas células são derivadas da mucosa do intestino delgado humano e são amplamente utilizadas como modelo de estudo da absorção de nutrientes. Nesses testes, a fração bioacessível do alimento ou nutriente em estudo é colocada em contato com as células Caco-2, e a absorção dos nutrientes é avaliada. Esse método permite estudar a interação entre os nutrientes e as células intestinais, fornecendo informações sobre a sua absorção. É importante ressaltar que os testes *in vitro* são úteis para estudos preliminares e de triagem, proporcionando uma compreensão inicial da biodisponibilidade (RANA; ARORA; GUPTA; KAPILA, 2019).

No entanto, os testes *in vivo* são essenciais para obter resultados mais precisos e representativos da biodisponibilidade em seres humanos ou animais, considerando fatores como metabolismo, interações com outros nutrientes e variações individuais (MAURER; DAUM; SCHAEFER; LEHR *et al.*, 2010).

Ambos os testes, são importantes para a avaliação da bioacessibilidade de nutrientes e compostos bioativos em alimentos, fornecendo informações sobre a quantidade efetivamente absorvida e disponível para exercer seus efeitos no organismo (SOUZA; SOUZA; SANTANA; ARAUJO *et al.*, 2018; TOKALIOGLU; CLOUGH; FOULKES; WORSFOLD, 2014).

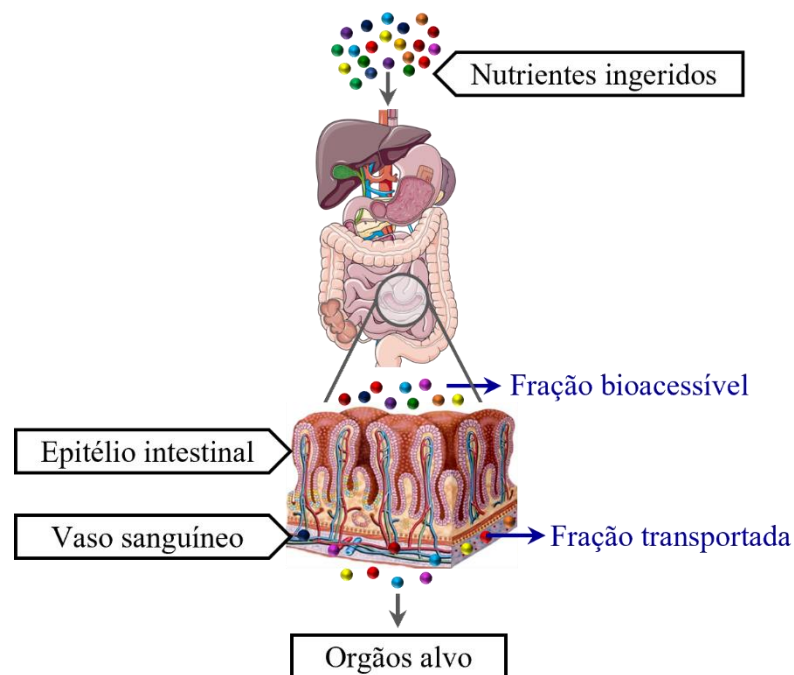


Figura 2. Esquema representativo para a obtenção das frações bioacessível e transporte dos nutrientes ingeridos por meio de alimentos. (Próprio autor)

## 2.12 Células Caco-2

O epitélio do intestino delgado desempenha um papel crucial na absorção de nutrientes e funciona como uma barreira seletiva para proteger o organismo contra a entrada de substâncias indesejáveis. A camada de células que compõem o epitélio intestinal é composta principalmente de enterócitos, células caliciformes e células endócrinas. As junções apertadas ou junções estreitas, desempenham um papel fundamental na função de barreira do epitélio intestinal. Essas junções formam uma estrutura celular que mantém as células adjacentes unidas, impedindo a passagem de substâncias através do espaço paracelular entre as células (SIMON-ASSMANN; TURCK; SIDHOUM-JENNY; GRADWOHL *et al.*, 2007).

A seletividade da barreira é determinada pela composição das junções apertadas, que são compostas por proteínas transmembranares (claudinas e ocludinas) (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006).

O transporte de compostos através das junções apertadas ocorre principalmente por difusão passiva, em que as substâncias se movem em resposta a gradientes eletroquímicos. Essa passagem de compostos através das junções apertadas é regulada e controlada, garantindo a absorção seletiva de nutrientes enquanto evita a entrada de substâncias prejudiciais. É importante ressaltar que a integridade e a função adequada das junções

apertadas são essenciais para a saúde e o bom funcionamento do sistema digestório, permitindo a absorção eficiente de nutrientes e a proteção contra a entrada de agentes patogênicos e substâncias tóxicas (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006).

As junções apertadas são estruturas complexas compostas por diferentes proteínas, e a compreensão de sua estrutura tridimensional e função ainda está em progresso. Acredita-se que as claudinas (proteínas presentes nas junções apertadas), desempenham um papel importante na formação de poros que controlam a natureza e o fluxo do transporte paracelular (MARCHIANDO; GRAHAM; TURNER, 2010).

Alterações na permeabilidade paracelular podem ocorrer devido a alterações na fosforilação das proteínas das junções apertadas, na composição das proteínas envolvidas e nas propriedades da membrana celular. Essas alterações podem levar a um aumento da permeabilidade, permitindo a passagem de substâncias indesejadas ou estranhas através do espaço paracelular (MARCHIANDO; GRAHAM; TURNER, 2010; VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006).

A disfunção da barreira intestinal, incluindo um aumento na permeabilidade paracelular, tem sido associada à patogênese de várias doenças intestinais, como doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino permeável e alergias alimentares (GROSCHWITZ; HOGAN, 2009; MULLIN; AGOSTINO; RENDON-HUERTA; THORNTON, 2005).

Acredita-se que a passagem de peptídeos alimentares não digeridos e outras moléculas estranhas através da barreira intestinal comprometida possa desencadear respostas imunológicas exacerbadas, contribuindo para reações alérgicas e intolerância alimentar (CEREIJIDO; CONTRERAS; FLORES-BENITEZ; FLORES-MALDONADO *et al.*, 2007; PERRIER; CORTHESEY, 2011).

As células Caco-2 são uma linhagem de células de câncer colorretal que foram amplamente utilizadas como um modelo *in vitro* para estudar o transporte de substâncias através do epitélio intestinal. Essas células são capazes de diferenciar e formar uma monocamada que exhibe características semelhantes às células epiteliais do intestino delgado humano. O teste de resistência elétrica transepitelial (TEER) é comumente usado para avaliar a integridade da barreira epitelial formada pelas células Caco-2 (AMASHEH; SCHLICHTER; AMASHEH; MANKERTZ *et al.*, 2008; SUZUKI; HARA, 2009).

Mede-se a resistência elétrica através da camada de células usando eletrodos colocados em ambos os lados da monocamada celular. A TEER é um indicador da função de

barreira das células, pois uma maior resistência elétrica está associada a uma barreira mais intacta e menos permeável. A quercetina, um composto encontrado em frutas e vegetais, tem sido estudada por seus efeitos na saúde intestinal. Pesquisas mostraram que a quercetina pode aumentar TEER em uma monocamada de células Caco-2, indicando um fortalecimento da barreira epitelial e uma redução na permeabilidade. Esses estudos sugerem que a quercetina pode desempenhar um papel na preservação da integridade da barreira intestinal e ser benéfico para a saúde intestinal. É importante ressaltar que os resultados obtidos em células Caco-2 podem não refletir completamente a complexidade do intestino humano e que mais pesquisas são necessárias para entender completamente os efeitos da quercetina e de outros compostos alimentares na função de barreira intestinal *in vivo* (AMASHEH; SCHLICHTER; AMASHEH; MANKERTZ *et al.*, 2008; PERRIER; CORTHESEY, 2011; SUZUKI; HARA, 2009).

O uso de células Caco-2 como modelo para estudos de absorção apresenta algumas limitações em relação à dinâmica e à estrutura real do intestino humano. Algumas das limitações mencionadas incluem a falta de peristaltismo, diferenças no tamanho do espaço intercelular e o tempo necessário para estabilizar a diferenciação das células. Apesar disso, as células Caco-2 continuam sendo uma ferramenta valiosa na pesquisa de absorção e estudos de barreira intestinal, desde que as condições de cultivo sejam cuidadosamente ajustadas e os resultados interpretados levando em consideração as diferenças entre o modelo *in vitro* e a fisiologia intestinal real (TAVELIN; TAIPALENSUU; SODERBERG; MORRISON *et al.*, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo geral, obter uma maior compreensão do potencial nutricional e bioativo do pão de abelha diante do pouco conhecimento existente, através das técnicas de: composição proximal, capacidade de desativação de espécies reativas, digestão gastrointestinal *in vitro* e avaliação do transporte epitelial em células Caco-2.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma abaixo (figura 3), representa resumidamente as atividades realizadas com as amostras de BB e BP.

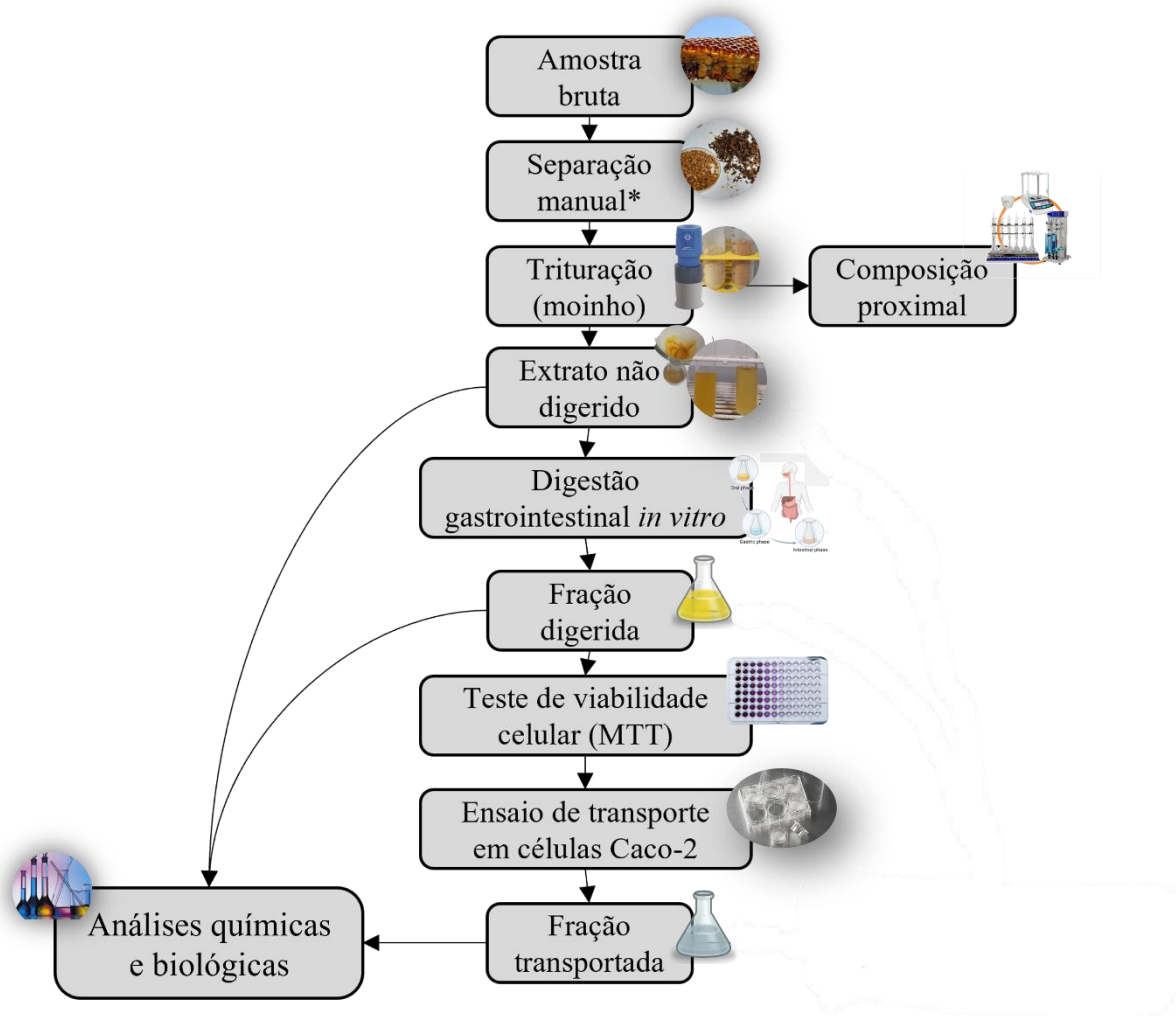


Figura 3. Fluxograma das atividades realizadas com as amostras de pão de abelha e pólen apícola. \*Apenas para o pão de abelha.

#### 3.1 Coleta das amostras de pão de abelha e pólen apícola

As amostras de BB e BP foram fornecidas por um apicultor, coletadas das colmeias de abelhas *Apis melífera* (figura 4), respectivamente, no mês de março e setembro/2021, na cidade de General Carneiro - Paraná. Após a coleta, as amostras de BB foram congeladas e transportadas a  $-35^{\circ}\text{C}$ , enquanto as amostras de BP foram transportadas em temperatura ambiente até o Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ/USP-Piracicaba.





Figura 4. Apiários em General Carneiro, Paraná. (Fonte: Breyer)

No laboratório, as amostras de BB foram separadas do favo de mel manualmente (figura 5), posteriormente triturada com o auxílio do moinho analítico e armazenada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para as análises seguintes. O BP também foi triturado e armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Figura 5. Amostras de pão de abelha. **a** Favo de mel com pão de abelha. **b** Separação manual do pão de abelha. (Próprio autor)

### 3.2 Composição proximal

Para a análise da composição centesimal das amostras de BP e BB, foram utilizados diferentes métodos indicados pela Association of Official Analytical Chemists– AOAC (HORWITZ, 1975), sendo as análises realizadas em triplicatas e os resultados expressos em porcentagem.

### 3.2.1 Cinzas

As cinzas das amostras brutas de BB e BP foram analisadas de acordo com o método (AOAC 923,03). A amostra foi calcinada em forno mufla para a matéria orgânica ser retirada. Foi pesado 1g de amostra no cadinho seco e tarado, posteriormente, o cadinho foi colocado em mufla com temperatura elevada pouco a pouco (50°C em 50°C), até atingir 550°C e mantida na mufla por uma noite para a destruição da matéria orgânica, após o tempo, esta foi desligada. Não abrindo a mufla até ela atingir 100°C. Após, retirou-se o cadinho e o deixou no dessecador até atingir a temperatura ambiente.

Por fim, o cadinho foi pesado com as cinzas para se ter o resultado obtido por diferença, conforme a fórmula:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{(\text{Peso do Cadinho} + \text{Amostra Após Mufla}) - (\text{Peso do Cadinho})}{\text{Peso Amostra Úmida}} \times 100$$

### 3.2.2 Umidade

Para se obter o teor de umidade, foi utilizado o método gravimétrico. Pela ação do calor, este método realiza a evaporação da água presente na amostra. Foi pesada em balança analítica uma placa de Petri previamente identificada e seca em estufa a 105°C por uma noite e resfriada em dessecador. Pesado 1 g de amostra na placa de Petri e adicionada em assadeira forrada com papel alumínio; mantida por uma noite na estufa circulação forçada a 105°C até peso constante.

Para finalizar, retirou-se as placas de Petri da estufa, colocou-as no dessecador até atingir a temperatura ambiente e posteriormente a pesagem das placas de Petri com a matéria seca em balança analítica, sendo a diferença correspondente a matéria seca a 105°C (AOAC, 2010).

$$\% \text{ Matéria Seca} = \frac{(\text{Peso Placa} + \text{Amostra Seca}) - (\text{Peso da Placa})}{\text{Peso Amostra Úmida}} \times 100$$

$$\% \text{ Umidade} = 100 - (\% \text{ Matéria Seca})$$

### 3.2.3 Proteína bruta

Foi realizada a determinação de nitrogênio das amostras de acordo com a metodologia (AOAC 978,04). Sendo dividida em três etapas: digestão, destilação e titulação.

Na primeira etapa, foi pesado 1g de cada amostra para a digestão com ácido sulfúrico e catalisador. Na segunda, ocorreu a destilação por arraste de vapor de amônia, acolhida em Erlenmeyer com ácido bórico a 2%. Para finalizar, a amônia foi titulada com o ácido sulfúrico 0,02 N e a determinação de proteínas foi calculada conforme as fórmulas:

$$\% N = \frac{(A - B) \times N \times 14 \times 100}{P}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% N \times 6,25$$

Sendo:

A: ml gasto na amostra

B: ml gasto no branco

N: N do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

P: peso da amostra em mg

### 3.2.4 Lipídeos totais

O teor de lipídeos totais foi determinado de acordo a metodologia (AOAC 920,85). Foi pesado 1 g de amostra em papel filtro e inserida no tubo extrator de Soxhlet, adicionando o solvente no balão, mantida por 4 horas em refluxo contínuo. Após o tempo de extração, retirou o papel com a amostra e fez um refluxo para lavar o tubo, recolheu o solvente e armazenou o solvente recuperado em um frasco. Após a recuperação do solvente, os tubos foram retirados e armazenados na estufa a 105°C por 12 horas. Foram esfriados em dessecador e pesados, para então ter-se o resultado de lipídeos por diferença do tubo, conforme a fórmula:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{(\text{Peso Balão} + \text{Gordura}) - \text{Peso Balão}}{\text{Peso Amostra Úmida}} \times 100$$

### 3.2.5 Açúcares redutores totais

Os açúcares redutores totais foram quantificados pela técnica proposta por Somogy e adaptada por NELSON (1944), sendo que a determinação foi realizada com as amostras brutas de BB e BP. Realizou-se a leitura das absorbâncias das amostras a 535 nm, em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em g açúcares redutores 100 mg<sup>-1</sup> de amostra seca.

### 3.3 Preparo de extrato etanólico das amostras

As amostras brutas de BB e BP foram submetidas à extração utilizando-se 2 g de cada material e 15 mL de etanol 70%. A extração foi realizada a 70°C, em banho de água termostaticado e com agitação constante por 30 minutos. Posteriormente, a filtração foi realizada em papel filtro. Ao final, foram nomeados de extrato não digerido de BB e de extrato não digerido de BP (figura 6).



Figura 6. Extrato não digerido de pão de abelha e pólen apícola. (Próprio autor)

### 3.4 Digestão gastrointestinal *in vitro*

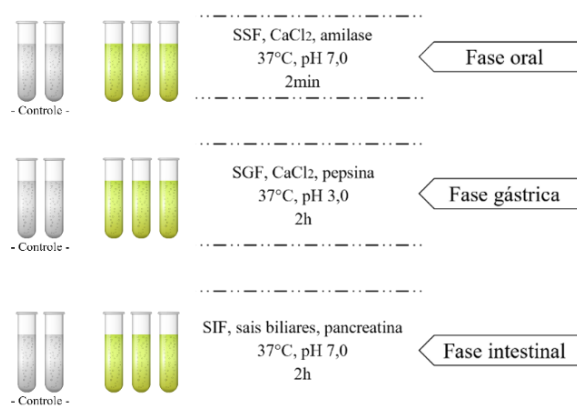


Figura 7. Esquema representativo da digestão gastrointestinal *in vitro*. (Próprio autor)

A digestão gastrointestinal *in vitro* dos extratos das amostras de BB e BP foi realizada conforme o protocolo da rede COST Action INFOGEST FA1005 (BRODKORB; EGGER; ALMINGER; ALVITO *et al.*, 2019). Sendo dividida em três fases (oral, gástrica e intestinal). Em cada fase, diferentes concentrações dos sais KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> foram utilizados. Para cada fase, uma solução de sais estoque concentrada 1,25x foi preparada sempre sem o sal CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, para não ter precipitados. As soluções com as enzimas foram preparadas em soluções de sais estoque.

Para a digestão do BB e BP, foi adicionado 2,5g de amostra em 9 tubos de ensaio, sendo a triplicata para as três fases, 3 tubos controles contendo a amostra com fluido digestivo de cada fase sem enzimas e outros 3 para o controle negativo (fluido digestivo com as enzimas, sem amostra).

Em cada tubo de ensaio foi adicionado fluido sintético salivar (SSF), CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> e amilase salivar, sendo adicionada água destilada no mesmo volume da enzima nos tubos controle de amostra sem enzima. O pH foi ajustado em 7,0 e os tubos foram incubados à 37°C, com agitação leve constante por 2 minutos. Ao final desta etapa, 5 tubos foram retirados e denominados como digeridos da fase oral, acompanhando seus controles (sem enzima e sem amostra).

Na sequência, foi adicionado o fluido sintético gástrico (SGF) nos tubos restantes, incluindo também o CaCl<sub>2</sub> e a pepsina (exceto nos 2 tubos controle de amostra, que se adicionou água destilada no mesmo volume). O pH foi ajustado em 3 (adição de solução de HCl) e os tubos foram incubados à 37°C, com agitação leve, por 2 horas. Ao final desta etapa,

5 tubos foram retirados e denominados como digeridos da fase gástrica; triplicata acompanhando seus controles.

Para a última etapa, nos 5 tubos restantes adicionou-se o fluido sintético intestinal (SIF), CaCl<sub>2</sub>, sais biliares e pancreatina (exceto nos tubos controle, que se adicionou água destilada no mesmo volume que os outros tubos receberam de sais e pancreatina). O pH foi ajustado em 7,0 com adição de NaOH e os tubos foram incubados à 37°C, com agitação leve por 2 horas.

Ao final, os tubos correspondentes à fase intestinal foram centrifugados à 10.000xg por 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e denominados como fração digerida. Foram armazenados para posteriormente serem utilizados no ensaio de transporte epitelial em células Caco-2.

### **3.5 Avaliação do transporte epitelial em sistema de células humanas Caco-2**

#### **3.5.1 Cultivo de células Caco-2**

As células humanas intestinais de carcinoma de cólon (Caco-2) adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC® HTB-37™) foram cultivadas conforme o protocolo de HUBATSCH; RAGNARSSON e ARTURSSON (2007), em meio com Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (solução 100x) e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (estreptomicina (10.000U/mL estreptomicina- 10mg/mL penicilina – solução 100x), a 37°C e com atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. Sendo realizadas trocas de meio a cada 48 horas, até que atingissem 70-80% de confluência. Após atingir essa porcentagem de ocupação da garrafa de cultivo, fazia-se o subcultivo por tripsinização com solução de tripsina-EDTA a 0,25%. Este, foi necessário para obter-se a passagem adequada das células e diminuição na formação de multicamadas celulares, tornando-as aptas para o cultivo em placas *Transwell*® que foram utilizadas no ensaio de transporte epitelial.

#### **3.5.2 Cultivo de células para ensaio de transporte**

Após o cultivo, células Caco-2 foram semeadas nas placas de *Transwell*® de 6 poços (figura 8), poro de 0,4 µm, diâmetro interno de 24 mm (Corning Life Sciences, Acton, EUA).

Com densidade de  $3 \times 10^5$  células por *insert*, o meio celular (DMEM) foi inserido nos dois compartimentos, apical (1,5 mL) e basolateral (2,6 mL) e mantidas sob incubação à 37°C e umidade relativa de 90 % ao longo de 21 dias, para então formar as monocamadas celulares (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

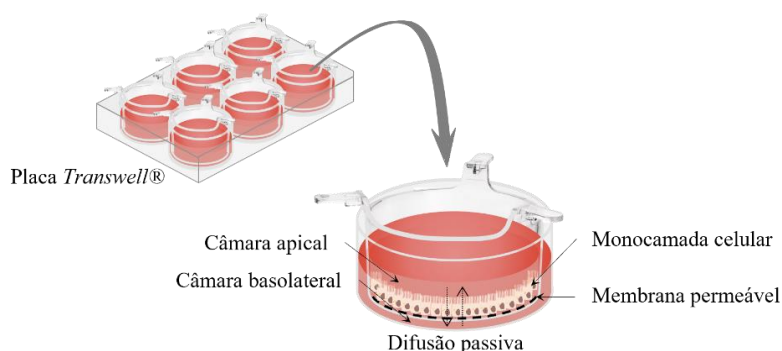


Figura 8. Esquema representativo da placa *Transwell*®, câmara apical e câmara basolateral. (Próprio autor)

### 3.5.3 Teste de viabilidade celular (MTT)

A técnica de microcultura de tetrazólio (MTT) foi usada para prever a viabilidade celular, baseado na capacidade que as enzimas redutases presentes nas mitocôndrias das células viáveis têm em reduzir o sal ao composto formazan, de cor azul. A quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis.

Após o ensaio de viabilidade celular, o qual foi utilizado 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), com a metodologia proposta por SHAPPELL (2003), teve-se a concentração da fase intestinal sendo então, disposta no compartimento apical da placa *Transwell*® no transporte transepitelial.

As células Caco-2 já cultivadas, foram aplicadas nas placas de 96 poços, com densidade de  $10^4$  células/poço, incubadas por 21 dias à 37°C e sendo realizada a troca do meio a cada 48 horas. Em seguida, removeu-se o meio por completo e o substituiu por outro meio com DMEM sem soro bovino fetal, tratando as células da fração bioacessível (fração digerida) com diversas concentrações e por fim, incubadas por 4 horas à 37°C; os controles seguiram a mesma metodologia. Após, acrescentou 20 uL de MTT (5 mg/mL) e as placas foram incubadas sob ausência de luz, à 37°C por 3 horas. Após, removeu-se o meio contendo MTT e o composto formazan produzido foi solubilizado em DMSO (100 uL/poço). Para finalizar, foi feita a medida da absorbância no espectrofotômetro (570 nm), para determinar a porcentagem de viabilidade celular em função das diluições feitas a partir da fração digerida.

### 3.5.4 Ensaio de transporte em células Caco-2

O ensaio foi conduzido de acordo com HUBATSCH; RAGNARSSON e ARTURSSON (2007). Após 21 dias de cultivo, as células foram lavadas com a solução balanceada de Hank's (HBSS) suplementada com 25 mM de HEPES (tampão de permeabilidade), pH 7,4 a 37°C e a resistência elétrica transepitelial (RET) medida usando um Millicell® ERS-2 (Millipore Corporation, Bedford MA, EUA). Foram consideradas adequadas ao experimento as membranas com resistência acima de 165  $\Omega/\text{cm}^2$ .

Com o resultado obtido no MTT, uma alíquota de 1,5 mL da fração digerida obtida no ensaio de digestão *in vitro* diluída em HBSS foi adicionada ao compartimento apical e uma alíquota de 2,6 mL de HBSS ao compartimento basolateral. A placa *Transwell*® foi incubada a 37°C por 4 horas e com leve agitação. Após, as fases apical e basolateral foram coletadas e armazenadas a -80°C para as próximas análises. O experimento foi realizado em triplicata.

## 3.6 Análises químicas dos extratos, fases da digestão e frações do transporte epitelial

### 3.6.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigênio)

O método utilizado foi o descrito por OU; HAMPSCH-WOODILL e PRIOR (2001). Em cada poço da microplaca foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  do padrão, controle ou amostra a ser analisada, 60  $\mu\text{L}$  da solução de fluoresceína 508,25 nM e 110  $\mu\text{L}$  de AAPH 76 mM. As soluções foram diluídas com o tampão fosfato de potássio 75 mM (pH 7,4), sendo também utilizado como branco. O decaimento da fluorescência foi monitorado a cada 10 minutos por 2 horas utilizando os comprimentos de emissão  $528 \pm 20$  nm e excitação de  $485 \pm 20$  nm, usando uma leitora de microplacas SpectraMax M3 a 37°C. Foi usado o padrão de Trolox com variação de 12,5 a 400 mM, as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos em  $\mu\text{mol TEAC}/\text{mg}$  de amostra seca.

### 3.6.2 Sequestro do radical ácido hipocloroso (HOCl)

A determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do HOCl foi realizada de acordo com MELO; MASSARIOLI; DENNY; DOS SANTOS *et al.* (2015). Foi preparado o



HOCl utilizado na reação com uma solução de 1% de NaOCl ajustada para pH 6,2 através do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (v/v). A sonda de DHR foi diluída no momento da análise para a concentração de 1,25 µM utilizando tampão fosfato (100 mM e pH 7,4). Para a análise, foram testadas diversas diluições das amostras (extrato não digerido, fração digerida e fração transportada) adicionadas aos poços da microplaca, juntamente com tampão fosfato (100 mM e pH 7,4), DHR 1,25 µM e HOCl 5 µM.

Por meio da leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA), com temperatura ajustada à 37°C, no modo fluorescência e comprimentos de onda de emissão 528 nm e excitação 485 nm, a leitura foi realizada após a adição de todas as soluções nos poços da microplaca. Os resultados (triplicata), foram expressos em IC<sub>50</sub> (mg/mL).

### 3.6.3 Sequestro do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A análise foi realizada de acordo com o método descrito por (CHISTE; MERCADANTE; GOMES; FERNANDES *et al.*, 2011), com modificações. A atividade sequestrante do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada pelo monitoramento da oxidação da lucigenina. A reação foi conduzida a 25°C contendo os seguintes reagentes: amostras ou padrão: 100 µL de tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4; 50 µL amostra ou padrão diluídos em tampão fosfato ou controle (solvente diluente); 50 µL da solução de lucigenina 4 mM e 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5%, preparados em tampão tris-HCl 50 mM e pH 7,4. O padrão utilizado foi o ácido ascórbico. Após 5 minutos de incubação a leitura de quimioluminescência foi realizada e os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> (mg/mL).

### 3.6.4 Teor de fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* descrito por (AL-DUAIS; MÜLLER; BÖHM; JETSCHKE, 2009), adaptado para micro volumes. Adicionou-se 20 µL de amostra (extrato não digerido, fração digerida e fração transportada) em cada poço da microplaca. Em seguida, 100 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* 10% em água foi adicionado e, após 5 minutos, 75 µL da solução de carbonato de potássio 7,5% foi acrescido aos poços. Após a incubação por 40 min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, foi medida a absorbância em leitora de microplacas à 740 nm.

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalentes ao ácido gálico (EAG), calculado utilizando uma curva de calibração ( $20 - 120\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As amostras foram analisadas em triplicata e expressas em mg de EAG/g de amostra seca.

### 3.6.5 Teor de flavonoides totais

A análise do teor de flavonoides totais foi determinada de acordo com o método descrito por (PARK; KOO; SATO; CONTADO, 1995). Resumidamente, para o preparo dos reagentes foi usado o cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 0,63 M diluído em etanol 80%, acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) 50 mM, diluído em etanol 80%, solução de quercetina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ ) 200  $\mu\text{g/mL}$  diluída em etanol 80%. A partir da solução mãe, foi preparada a curva analítica contendo 6 pontos de concentração (20, 30, 40, 50, 60 e 70  $\mu\text{g/mL}$ ).

Quanto à absorvância, leu-se 415 nm após 40 minutos, o branco foi composto por uma solução de 50  $\mu\text{L}$  do solvente, 100  $\mu\text{L}$  de etanol 80% e 100  $\mu\text{L}$  da solução de acetato de potássio 50 mM. Os ensaios foram realizados em triplicata e o conteúdo total de flavonoides totais foi expresso em mg de equivalentes a quercetina (mg Eq/g), considerando o teor de extrato seco das amostras.

### 3.6 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA), teste *t* de student e o teste TUKEY para identificar diferenças significativas entre as médias, ao nível de 5% de significância, utilizando a linguagem R.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Composição proximal

Os resultados da composição nutricional de macronutrientes, umidade e cinzas das amostras brutas BB e do BP estão apresentados na figura 9.

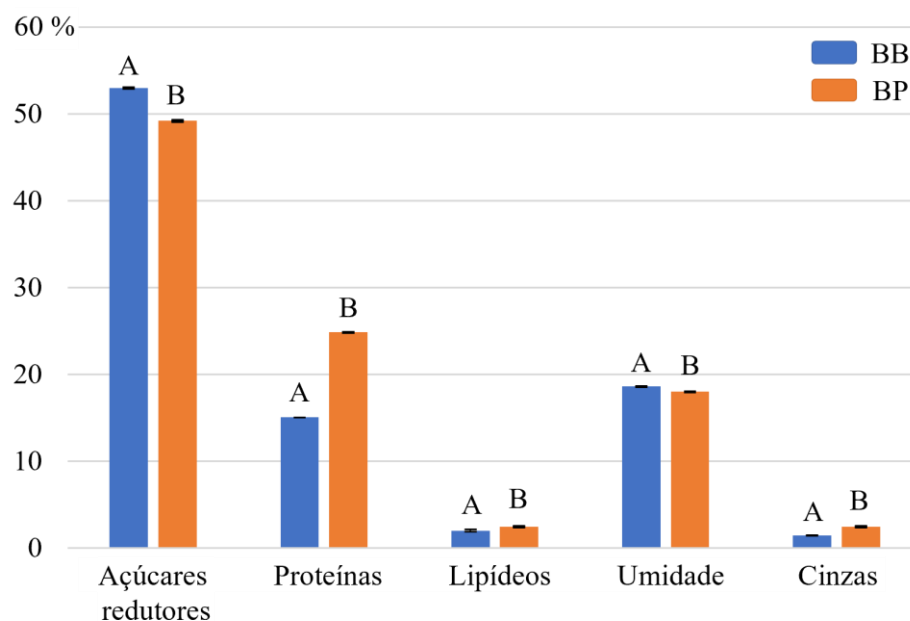


Figura 9. Açúcares redutores, proteínas, lipídeos, umidade e cinzas em g/100g<sup>-1</sup> de amostra de pão de abelha e pólen apícola. Letras idênticas não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo teste t de *student*, ao nível de 5% de significância.

O BB apresentou 52,94 ± 0,09 % de açúcares redutores, 15,05 ± 0,00 % de proteínas, 2,00 ± 0,13 % de lipídeos, 18,59 ± 0,05 % de umidade e 1,45 ± 0,01 % de cinzas. Já o BP apresentou 49,17 ± 0,04 % de açúcares redutores, 24,85 ± 0,00 % de proteínas, 2,48 ± 0,04 % de lipídeos, 17,98 ± 0,00 % de umidade e 2,45 ± 0,02 % de cinzas.

Ao compararmos as análises entre BB e BP, todas expressaram diferenças estatisticamente significativas, sendo o BB superior ao BP em 7,12 % de açúcares redutores e 3,28 % de umidade. Já o BP apresentou 39,44 % a mais de proteínas, 19,35 % de lipídeos e 40,82 % de cinzas.

De acordo com ZULUAGA; SERRATOB e QUICAZANA (2015), responsável pela caracterização química, nutricional e bioativa do BB proveniente da Colômbia, as amostras apresentaram aproximadamente 23% de proteínas, 2% de lipídeos, 17% de umidade e 2% de

cinzas (ZULUAGA; SERRATOB; QUICAZANA, 2015). A composição centesimal do BB, avaliado por DA COSTA; ANTONIO e PEREIRA (2022) no interior de do estado de São Paulo, mostrou em torno de 54% de açúcares redutores, 19% de proteínas, 6% de lipídeos, 18% de umidade e 2% de umidade, sendo os valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho (DA COSTA; ANTONIO; PEREIRA, 2022).

Um importante trabalho de SOARES DE ARRUDA; VIERIA DOS SANTOS; FIGUEIREDO SAMPAIO; DA SILVA ARAUJO *et al.* (2021) envolvendo mais de sessenta amostras comerciais de pólen apícola desidratado, originário de várias regiões brasileiras, confirmam os dados obtidos com amostras de BP. Os resultados obtidos neste trabalho estão compreendidos no intervalo encontrado por SOARES DE ARRUDA; VIERIA DOS SANTOS; FIGUEIREDO SAMPAIO; DA SILVA ARAUJO *et al.* (2021) de  $47,17 \pm 4,13$  % de açúcares redutores,  $23,35 \pm 4,10$  % de proteínas,  $4,33 \pm 1,64$  % de lipídeos e  $2,95 \pm 0,55$  de cinzas.

A relação entre a composição centesimal do BP e do BB está relacionada ao fato de que o BB é produzido a partir do BP. No entanto, a composição centesimal dos dois produtos apícolas pode diferir devido ao processo de fermentação e transformação que ocorre durante a produção do BB (ZULUAGA; SERRATOB; QUICAZANA, 2015).

O BP é geralmente mais rico em nutrientes do que o BB, pois o pólen fresco é coletado pelas abelhas diretamente das flores e possui uma composição mais concentrada. O BP é conhecido por ser uma excelente fonte de proteínas, vitaminas, minerais e antioxidantes (MAYDA; ÖZKÖK; ECEM BAYRAM; GERÇEK *et al.*, 2020).

O BB é o resultado da fermentação do pólen dentro da colmeia. Durante esse processo, ocorrem mudanças na composição e nas propriedades nutricionais do pólen. O BB é menos concentrado em nutrientes em comparação com o pólen fresco, mas ainda é considerado uma fonte valiosa de nutrientes, especialmente para as abelhas (DIDARAS; KARATASOU; DIMITRIOU; AMOUTZIAS *et al.*, 2020; URCAN; MĂRGHITAŞ; DEZMIREAN; BOBIŞ *et al.*, 2017).

#### **4.2 Transporte epitelial do BB e BP em monocamadas de células Caco-2**

Conforme o resultado obtido no ensaio de MTT, as diluições de 1:20 e 1:40 da fração digerida, respectivamente do BB e do BP, foram as maiores concentrações que não afetaram a viabilidade celular e foram usadas no ensaio de transporte epitelial.

O ensaio foi validado após a medição da resistência elétrica transepitelial (TEER) por volt- $\Omega$ m epitelial (Millicell® ER-2, Millipore) para monitorar a integridade da monocamada celular das células Caco-2, antes e após o transporte epitelial.

### 4.3 Desativação do HOCl

Os resultados da desativação do HOCl das amostras de BB e BP (extrato não digerido, fração digerida e fração transportada) estão apresentados na figura 10.

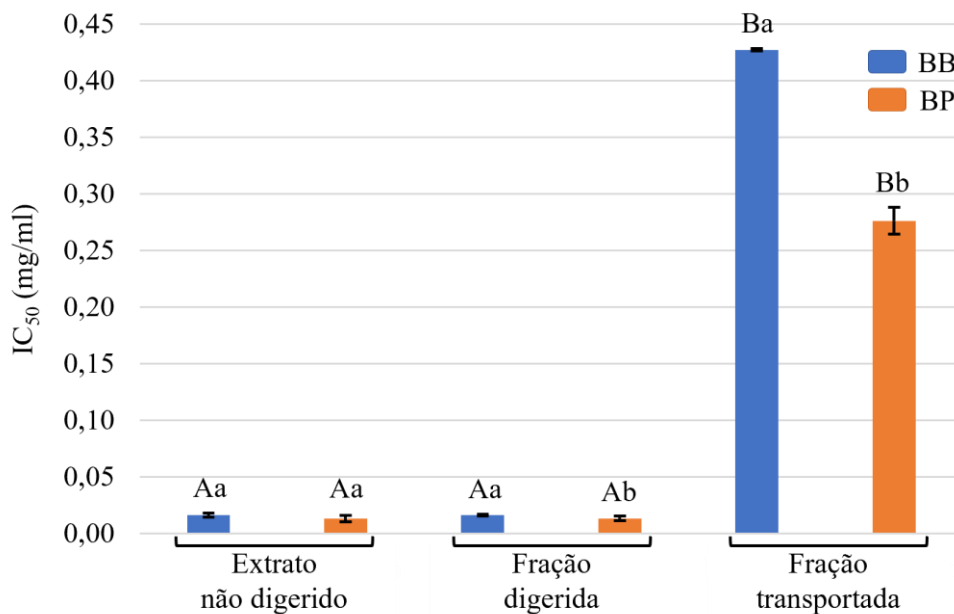


Figura 10. Desativação do HOCl do extrato de pão de abelha e pólen apícola antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey, sendo letras maiúsculas correspondentes as análises estatísticas em pão de abelha ou pólen apícola, e letras minúsculas entre os tratamentos na mesma etapa. \*Valores expressos em IC<sub>50</sub> de mg de amostra/ml de tampão de fosfato de potássio.

Nas análises envolvendo a desativação do HOCl (figura 10) com amostras de BB, as concentrações entre o extrato não digerido (IC<sub>50</sub>= 0,016 ± 0,002 mg/mL) e a fração digerida (IC<sub>50</sub>= 0,016 ± 0,001 mg/mL) se manteve constante, não diferindo estatisticamente. Em relação a fração transportada (IC<sub>50</sub>= 0,427 ± 0,001 mg/mL) houve um acréscimo de 96,25 % nas etapas anteriores. Este cenário se manteve nas análises com amostras de BP, onde se verificou a constante das concentrações entre o extrato não digerido (IC<sub>50</sub>= 0,013 ± 0,003

mg/mL) e a fração não digerida ( $IC_{50} = 0,013 \pm 0,002$  mg/mL), com um significativo aumento de 95,29 % para a fração transportada ( $IC_{50} = 0,276 \pm 0,012$  mg/mL).

Ao analisar as concentrações entre as amostras de BB e BP, apenas o extrato não digerido não apresentou diferença significativa. Tendo o BP concentrações inferiores ao BB na fração digerida (18,00 %) e fração transportada (35,36 %).

Ao compararmos os valores respectivamente, de BB e BP com própolis para atividade de eliminação do ácido hipocloroso segundo SALIBA; DE OLIVEIRA SARTORI; BATISTA; DO AMARAL *et al.* (2023), observamos uma diminuição de 41 e 51 % no extrato não digerido, e 38 e 50 % na fração digerida.

#### 4.5 Sequestro do radical peroxila ( $ROO\bullet$ )

Os resultados da desativação do radical  $ROO\bullet$  das amostras de BB e BP (extrato não digerido, fração digerida e fração transportada) estão apresentados na figura 11.

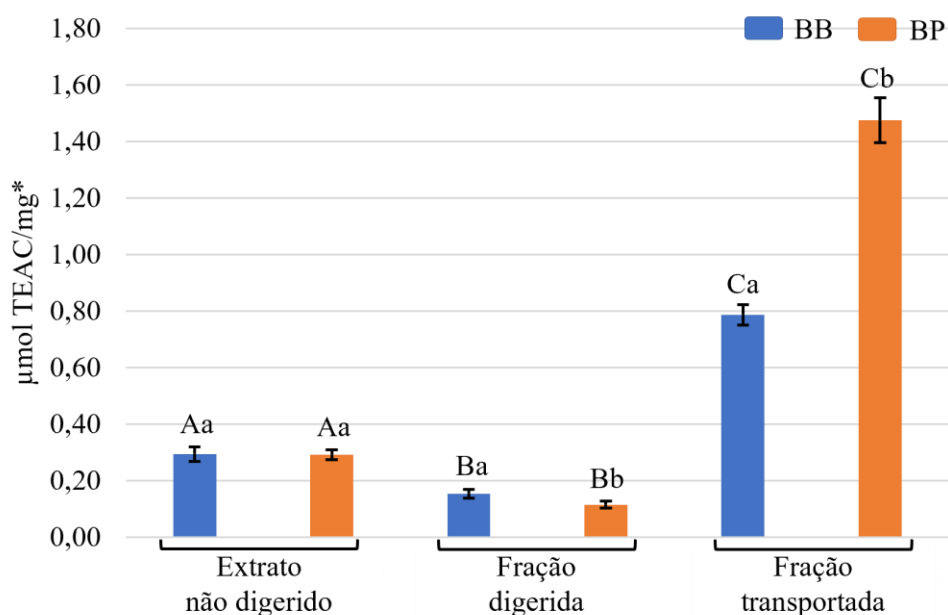


Figura 11. Desativação do radical  $ROO\bullet$  do extrato de pão de abelha e pólen apícola antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey, sendo letras maiúsculas correspondentes as análises estatísticas em BB ou BP, e letras minúsculas entre os tratamentos na mesma etapa. \*TEAC = mg de equivalentes ao trolox.

De acordo com a figura 11, houve uma redução de 47,62 % no potencial de sequestro do radical ROO• do extrato não digerido de BB ( $0,294 \pm 0,025$   $\mu\text{mol}$  de TEAC/mg) para a fração digerida ( $0,154 \pm 0,015$   $\mu\text{mol}$  de TEAC/mg). Já entre a fração digerida e a fração transportada ( $0,787 \pm 0,036$   $\mu\text{mol}$  de TEAC/mg), observa-se um aumento da atividade antioxidante de 80,43 %. Ao analisar todo ensaio com BB, houve um aumento de 62,64 % entre o extrato não digerido e a fração transportada. Todas as amostras de BB apresentaram diferença significativa entre as etapas.

Com amostras de BP observa-se o mesmo comportamento, identificadas pela redução de 60,62 % no potencial de sequestro do radical ROO• do extrato não digerido ( $0,292 \pm 0,017$   $\mu\text{mol}$  de TEAC/mg) para a fração digerida ( $0,115 \pm 0,012$   $\mu\text{mol}$  de TEAC/mg). Em relação a fração digerida e a fração transportada ( $1,475 \pm 0,079$   $\mu\text{mol}$  de TEAC/mg), identifica-se um aumento da atividade antioxidante de aproximadamente 92,20 %. Em toda a análise, é possível identificar um aumento de 80,20 % entre o extrato não digerido e a fração transportada. Todas as amostras de BP apresentaram diferença significativa entre as etapas.

Com as análises entre as amostras de BB e BP, apenas o extrato não digerido não apresentou diferença significativa. Tendo a fração digerida de BB com 25,32 % mais atividade oxidante que o BP, e o comportamento inverso na fração transportada, com o BP apresentando 46,64 % mais atividade oxidante que o BB.

A análise foi aplicada para monitorar a ação antioxidante das amostras (extrato não digerido, fração digerida e fração transportada do BB e BP), medindo a degradação oxidativa da fluoresceína, após ser misturada com geradores de radicais livres como o AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride). O AAPH, produz radicais peroxila por aquecimento, e estes oxidam a sonda que conseqüentemente, diminui a intensidade da fluorescência com o processo oxidativo. A degeneração da fluoresceína é medida na presença de antioxidantes.

O mesmo comportamento encontrado com amostras de BB e BP com valores de IC<sub>50</sub> para desativar o ROO• foi identificado no estudo com própolis orgânica da região sul do Brasil, onde houve uma redução do extrato não digerido para a fração digerida, seguido de um aumento para a fração transportada (SALIBA; DE OLIVEIRA SARTORI; BATISTA; DO AMARAL *et al.*, 2023).



#### 4.6 Sequestro do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Na figura 12 são apresentados os resultados do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para as amostras de BB e BP (extrato não digerido, fração digerida e fração transportada).

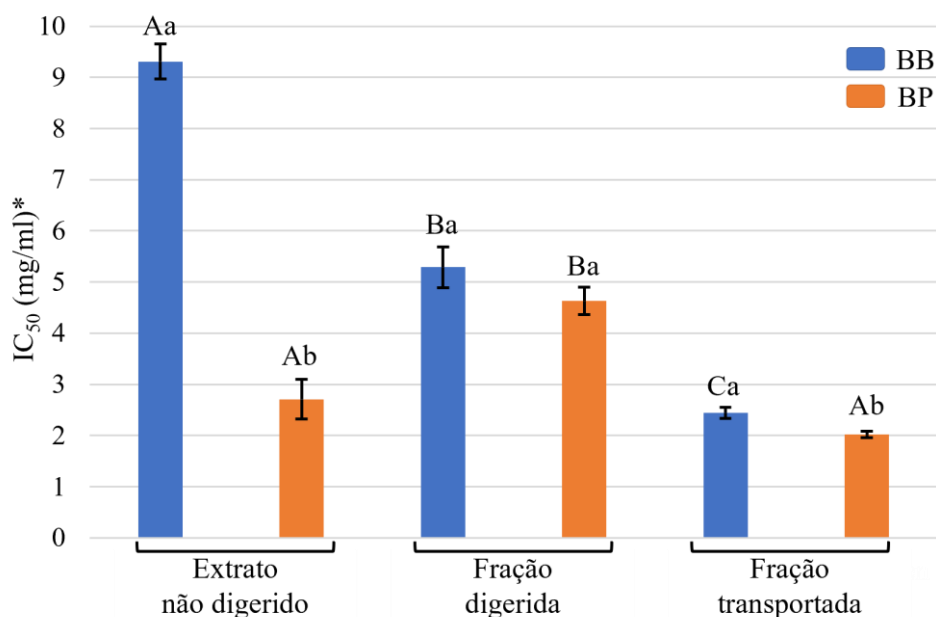


Figura 12. Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) do extrato de pão de abelha e pólen apícola antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey, sendo letras maiúsculas correspondentes as análises estatísticas em “pão de abelha” ou pólen apícola, e letras minúsculas entre os tratamentos na mesma etapa. \*Valores expressos em IC<sub>50</sub> de mg de amostra/ml de tampão de fosfato de potássio.

Quanto ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de BB, o extrato não digerido apresentou o melhor desempenho (IC<sub>50</sub> = 9,31 ± 0,34 mg/mL), sendo 43,18 % superior a fração digerida (IC<sub>50</sub>= 5,29 ± 0,40 mg/mL) e 73,79 % à fração transportada (IC<sub>50</sub>= 2,44 ± 0,11 mg/mL). A diferença entre a fração digerida e transportada foi de 53,88 %. As três etapas diferiram estatisticamente.

Nas amostras de BP, a fração digerida (IC<sub>50</sub>= 4,63 ± 0,27 mg/mL) apresentou o melhor desempenho no sequestro do peróxido de hidrogênio, sendo 41,47 % superior ao extrato não digerido (IC<sub>50</sub>= 2,71 ± 0,39 mg/mL) e 56,37 % a fração transportada (IC<sub>50</sub>= 2,02 ± 0,06 mg/mL), sendo estas não diferenciadas estatisticamente.

Ao analisar o contraste das amostras de BB e BP, o extrato não digerido e a fração transportada do BB se destacam, sendo superiores em 70,89 % e 17,21 % respectivamente. Já na fração digerida não houve diferença significativa entre as amostras.

Valores de  $IC_{50}$  encontrados por SULEIMAN; MOHAMED; ABU BAKAR; NNA *et al.* (2021) para sequestro do peróxido de hidrogênio em extrato não digerido de BB derivado de *Heterotrigona itama* foi de 1,86 mg/mL, já em estudos com diferentes tipos de mel por SAKAC; JOVANOVIĆ; MARIC; CETOJEVIC-SIMIN *et al.* (2022) os valores variaram entre 7 - 12 mg/mL.

A diminuição da capacidade de sequestro do peróxido de hidrogênio, do extrato não digerido à fração transportada, pode ocorrer devido a várias razões. Durante a digestão, os compostos antioxidantes presentes no pão de abelha podem ser modificados ou quebrados pela ação de enzimas digestivas DAUDU (2019). Isso pode resultar em uma redução da capacidade antioxidante medida na fração não digerida em comparação com o extrato original. Após a digestão, os compostos antioxidantes podem ser absorvidos pelo organismo e transportados através da corrente sanguínea para diferentes tecidos KIM; YU e CHOI (2021). Durante esse processo, podem ocorrer modificações metabólicas ou interações com outros componentes biológicos, o que pode afetar a capacidade de sequestro do peróxido de hidrogênio RILEY (1994).

#### **4.7 Teor de fenólicos totais**

Os resultados do teor de fenólicos totais das amostras de BB e BP (extrato não digerido, fração digerida e fração transportada) estão apresentados na figura 13.

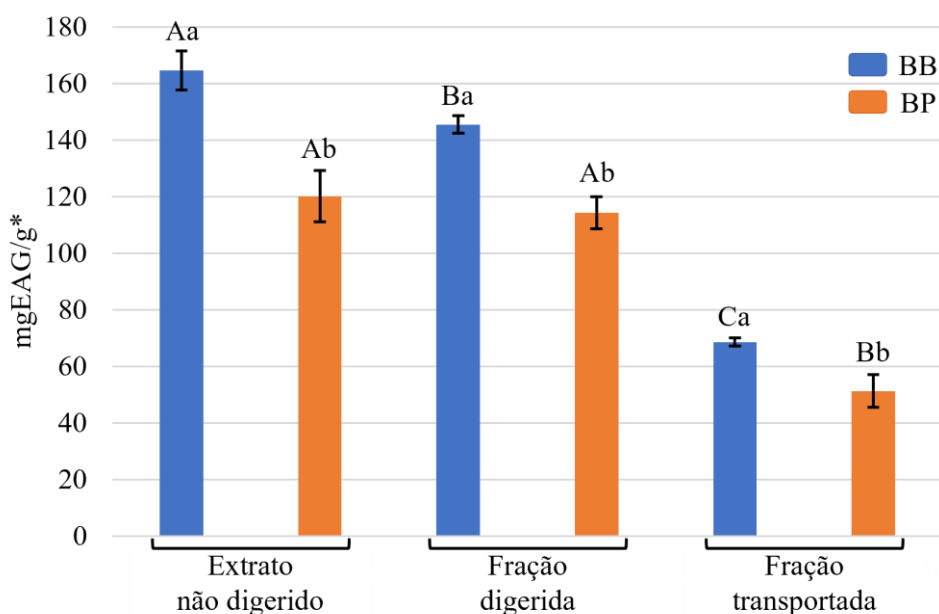


Figura 13. Teor de compostos fenólicos totais do extrato de pão de abelha e pólen apícola antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey, sendo letras maiúsculas correspondentes as análises estatísticas em pão de abelha ou pólen apícola, e letras minúsculas entre os tratamentos na mesma etapa. \*EAG= equivalentes ao ácido gálico.

Conforme a figura 13, houve uma redução de 11,60 % no teor total de compostos fenólicos do extrato não digerido de BB ( $164,61 \pm 6,95$  mg EAG/g) para a fração digerida ( $145,52 \pm 3,07$  mg EAG/g), entretanto, dentre os compostos fenólicos que estavam biodisponíveis (fração digerida), houve um transporte de 47,11 % para a fração transportada ( $68,55 \pm 1,45$  mg EAG/g). Ao total, houve uma redução de 58,36 % entre o extrato não digerido e a fração transportada. Todas as amostras de BB apresentaram diferença significativa entre as etapas.

Em relação ao BP, houve uma redução de apenas 4,92 % no teor total de compostos fenólicos do extrato não digerido ( $120,13 \pm 9,08$  mg EAG/g) para a fração digerida ( $114,22 \pm 5,67$  mg EAG/g), não apresentando diferença significativa, porém, dentre os compostos fenólicos que estavam biodisponíveis (fração digerida), houve um transporte de 44,87 % para a fração transportada ( $51,25 \pm 5,74$  mg EAG/g). Em todo processo, houve uma diminuição de 57,34 %, sendo apenas a fração transportada diferenciada estatisticamente.

As análises entre as amostras de BB e BP apresentaram diferença estatística, sendo o teor de compostos fenólicos totais do BB superior em todas as análises, com 27,02 % no extrato digerido, 21,51 % na fração digerida e 25,23 % na fração transportada.

Autores mostram que o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de BB e BP, em regiões aleatórias, variaram entre 10,5 – 24,62 mg EAG/g e 2,5 – 37,15 mg EAG/g, respectivamente ČEKSTERYTĚ; KURTINAITIENĖ; VENSKUTONIS; PUKALSKAS *et al.* (2016). Estes valores não se assemelham aos resultados obtidos neste trabalho, porém são explicados através do trabalho de HARIF FADZILAH; JAAPAR; JAJULI e WAN OMAR (2017), onde trabalharam com diferentes espécies de abelhas e botânicas, sendo encontrados valores entre 33 e 135 mg EAG/g. Desta forma, é possível notar que há uma variação dos teores apresentados quando relacionamos diferentes espécies de abelhas e plantas, porém através dos dados de HARIF FADZILAH; JAAPAR; JAJULI e WAN OMAR (2017) é possível inferir que nossos dados estão entre os valores encontrados e, além disso, estão entre os extratos com maior potencial antioxidante.

O perfil do teor de compostos fenólicos totais do BB e BP da etapa de extrato para fração digerida, corroboram com resultado obtido por AYLANC; FALCÃO; ERTOSUN e VILAS-BOAS (2021) onde identificou o decréscimo dos compostos com o BB apresentando um perfil decrescente acentuado e o BP ligeiramente constante. De acordo com DE OLIVEIRA SARTORI; SALIBA; MARTARELLO; LAZARINI *et al.* (2024) o composto ácido *p*-cumárico foi identificado apenas após digestão e transporte através de células Caco-2.

Existem alguns fatores que podem levar a uma redução da bioacessibilidade dos compostos do BB e do BP, sendo o processamento térmico com a variação de temperatura, podendo resultar na degradação ou perda de compostos fenólicos, o pH do ambiente digestivo (alguns compostos fenólicos são mais estáveis em ambientes ácidos, enquanto outros podem se degradar ou formar complexos menos absorvíveis em ambientes mais alcalinos) e estrutura celular do BB e BP (o BB apresenta uma parede celular fina e massa macia em relação ao BP, que contrariamente, apresenta parede celular e massa rígidas) (AYLANC 1 ; AYLANC 2 ; KIELISZEK).

Alguns estudos têm analisado o transporte de compostos do BP utilizando células Caco-2. Esses estudos têm mostrado que os compostos fenólicos presentes no BP podem ser absorvidos pelas células Caco-2 e apresentar efeitos benéficos, como atividade antioxidante e anti-inflamatória LI; LIANG; GUO; HU *et al.* (2019). Em relação ao BB, atualmente há uma escassez de estudos disponíveis sobre a absorção de seus compostos utilizando células Caco-2, porém como foi possível ver no resultado obtido, há semelhança entre o perfil decrescente dos compostos fenólicos das amostras de BB com BP, levando a inferir que os mesmos fatores podem estar ligados tanto ao BB quanto ao BP.

#### 4.8 Teor de flavonoides totais

Na figura 14 são apresentados os resultados dos flavonoides totais das amostras de pão de abelha (BB) e de pólen apícola (BP), extrato não digerido, fração digerida e fração transportada.

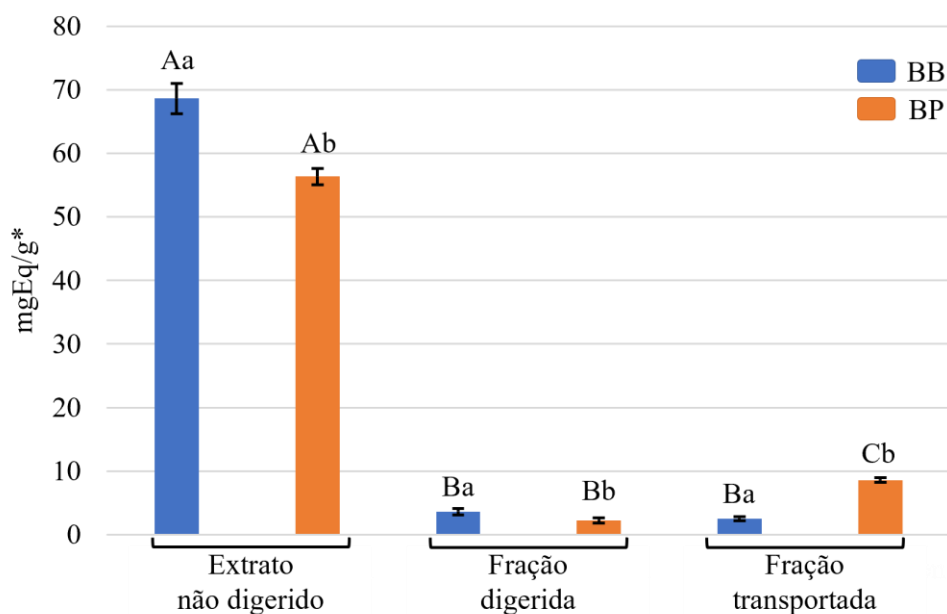


Figura 14. Teor de flavonoides totais do extrato de pão de abelha e pólen apícola antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey, sendo letras maiúsculas correspondentes as análises estatísticas em pão de abelha ou pólen apícola, e letras minúsculas entre os tratamentos na mesma etapa. \*Eq= equivalentes em quercetina.

Em relação ao teor de flavonoides totais (figura 14), em amostras de BB, o extrato não digerido ( $68,65 \pm 2,37$  mg Eq/g) apresentou maior concentração que a fração digerida ( $3,60 \pm 0,51$  mg Eq/g) e a fração transportada ( $2,52 \pm 0,31$  mg Eq/g), as quais não apresentaram diferença significativa. A diferença do extrato não digerido para a fração digerida e fração transportada foi de 94,76 % e 96,33 %, respectivamente.

Nas amostras de BP, o extrato não digerido ( $56,37 \pm 1,27$  mg Eq/g) apresentou maior destaque, sendo 96,01 % superior a fração digerida ( $2,25 \pm 0,42$  mg Eq/g) e 84,76 % a fração transportada ( $8,59 \pm 0,39$  mg Eq/g). A fração transportada apresentou 84,76 % mais teor de flavonoides que a fração digerida. As três etapas envolvendo a amostra de BP apresentou diferença significativa.

Na comparação entre amostras de BB e BP, o extrato não digerido de BB foi 17,89 % superior ao BP, e na fração digerida se observou o mesmo cenário com o BB apresentando 37,50 % mais teor de flavonoides que o BP. Já na fração transportada, o BP apresentou evidência com 70,66 % maior que o BB. Nas três comparações entre as amostras de BB e BP houve diferença significativa.

Assim como descrito com os compostos fenólicos totais, na literatura é possível encontrar diversas concentrações de flavonoides em BB e BP. Por meio de estudos com amostras de origem de Malvaceae, foram encontrados aproximadamente 72 mg Eq/g em extrato não digerido ASMAE; NAWAL; BAKOUR e LYOUSSI (2021). Porém, VASCONCELOS; DUARTE; GOMES; SILVA *et al.* (2017), com amostras de diferentes origens botânicas do estado de Alagoas, obtiveram em torno de 45 mg Eq/g. Outros estudos apenas com a variação da origem botânica de BB e BP obtiveram uma variação de 1,90 - 296 mg Eq/g MUÑOZ; VELÁSQUEZ; RODRIGUEZ; MONTENEGRO *et al.* (2020).

Nos resultados obtidos na fração digerida, nossos dados se assemelham a AYLANC; FALCÃO; ERTOSUN e VILAS-BOAS (2021), onde BB apresentou  $2.7 \pm 0.1$  mg Eq/g e o BP  $0.6 \pm 0.1$  mg Eq quercetina/g. Já BRIDI; ECHEVERRIA; LARENA; NUNEZ PIZARRO *et al.* (2022), com amostras provenientes da região sudeste do Chile, as concentrações de flavonoides variaram entre 2 e 8 mg Eq quercetina/g.

Essa variação pode ser explicada por meio de estudos mostrando que diferentes tipos de BB e BP têm perfis de flavonoides distintos, o que pode influenciar sua concentração total MAYDA; ÖZKÖK; ECEM BAYRAM; GERÇEK *et al.* (2020). Além disso, a concentração de flavonoides também pode variar dentro da mesma espécie de planta, dependendo de fatores como a fase de florescimento, a idade da planta e as condições climáticas BORGHI; PEREZ DE SOUZA; YOSHIDA e FERNIE (2019). E uma característica específica do BB que pode ocasionar essa diferenciação está na quantidade e qualidade do pólen utilizado para sua produção, bem como pelo processo de fermentação específico realizado pelas abelhas na colmeia KIELISZEK; PIWOWAREK; KOT; BŁAŻEJAK *et al.* (2018).

O trabalho de DE OLIVEIRA SARTORI; SALIBA; MARTARELLO; LAZARINI *et al.* (2024) identificou onze flavonoides em amostras de BB, como quercetina e kaempferol. Alguns desses compostos permaneceram ou surgiram após a digestão gastrointestinal simulada, mas nenhum foi detectado após o ensaio de permeabilidade intestinal *in vitro*. Os autores também observaram que o kaempferol foi encontrado tanto no perfil fenólico do extrato hidroetanólico do BB quanto após digestão gastrointestinal.

A digestão simulada resulta na decomposição dos flavonóis glicosilados, liberando as agliconas quercetina e kaempferol, além de ácido *p*-cumárico livre das fenilamidas. Após o ensaio de permeabilidade intestinal utilizando monocamada de células Caco-2, apenas as espermidinas foram detectadas na fração basolateral, possivelmente devido à oxidação da espermina (DE OLIVEIRA SARTORI; SALIBA; MARTARELLO; LAZARINI *et al.*, 2024).

Novos estudos têm aprofundado a compreensão sobre a biodisponibilidade e o metabolismo desses compostos. Por exemplo, pesquisas recentes demonstraram que a quercetina e o kaempferol podem sofrer biotransformação adicional no intestino, gerando metabólitos que possuem atividades biológicas significativas (CHEN; CAO; HUANG; XIAO *et al.*, 2022). Além disso, foi observado que o ácido *p*-cumárico pode ser metabolizado por bactérias intestinais, contribuindo para a modulação da microbiota intestinal e potencialmente influenciando a saúde gastrointestinal (ZHANG; ZHANG; LI; DENG *et al.*, 2020).

Outros estudos também têm investigado o papel das proteínas transportadoras na absorção desses compostos. Foi identificado que transportadores como o GLUT1 e o SGLT1 podem facilitar a passagem de quercetina e kaempferol através da barreira intestinal, aumentando sua biodisponibilidade (SHAHIDI; PENG, 2018). Esses achados são fundamentais para o desenvolvimento de suplementos nutricionais e estratégias alimentares que otimizem a absorção de flavonóis e outros compostos bioativos.

## 5. CONCLUSÃO

O estudo mostrou o potencial nutricional e bioativo do pão de abelha e do pólen apícola produzidos na região Sul do País. O pão de abelha apresentou os maiores teores de açúcares redutores e umidade, enquanto o pólen apícola se destacou pela maior concentração de proteínas, lipídeos e cinzas. Ambos os materiais apresentaram atividade capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio, sendo que mesmo após digestão gastrointestinal e ao transporte epitelial capacidade antioxidante ainda permaneceu. Esses achados ressaltam a relevância do pão de abelha e pólen apícola como potenciais ingredientes funcionais para o desenvolvimento de novos alimentos, e contribuindo para o desenvolvimento da atividade apícola.





## REFERÊNCIAS

- ADWAS, A. A.; ELSAYED, A.; AZAB, A.; QUWAYDIR, F. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **J. Appl. Biotechnol. Bioeng**, 6, n. 1, p. 43-47, 2019.
- AKBARI, B.; BAGHAEI-YAZDI, N.; BAHMAIE, M.; MAHDAVI ABHARI, F. The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. **BioFactors**, 48, n. 3, p. 611-633, 2022.
- AKONG-MOORE, K.; CHOW, O. A.; VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NIZET, V. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. **PLoS One**, 7, n. 8, p. e42984, 2012.
- AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European food research and technology**, 228, p. 813-821, 2009.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B. D.; PAMPLONA, L. C.; COIMBRA, S. L.; BARTH, O. M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of food composition and analysis**, 18, n. 1, p. 105-111, 2005.
- ALVES, D. A.; GEORGE, E. A.; KAUR, R.; BROCKMANN, A. *et al.* Diverse communication strategies in bees as a window into adaptations to an unpredictable world. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 120, n. 24, p. e2219031120, 2023.
- AMASHEH, M.; SCHLICHTER, S.; AMASHEH, S.; MANKERTZ, J. *et al.* Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. **J Nutr**, 138, n. 6, p. 1067-1073, Jun 2008.
- ASHAOLU, T. J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 130, p. 110625, 2020.
- ASMAE, E. G.; NAWAL, E. M.; BAKOUR, M.; LYOUSSI, B. Moroccan monofloral bee pollen: botanical origin, physicochemical characterization, and antioxidant activities. **Journal of Food Quality**, 2021, p. 1-10, 2021.
- AYLANC, V.; FALCÃO, S. I.; ERTOSUN, S.; VILAS-BOAS, M. From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. **Trends in Food Science & Technology**, 109, p. 464-481, 2021.
- BARRETO, L.; FUNARI, S.; ORSI, R.; DIB, A. Produção de pólen no Brasil. **Cabral Editora, Taubaté**, 2006.

BARTH, O. O pólen no mel brasileiro. editora luxor. **Rio de Janeiro**, 1989.

BASCHIERI, A.; JIN, Z.; AMORATI, R. Hydroperoxyl radical (HOO•) as a reducing agent: unexpected synergy with antioxidants. A review. **Free Radical Research**, 57, n. 2, p. 115-129, 2023.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & levy physiology**. Elsevier Brasil, 2008. 0323045820.

BOBIȘ, O.; MĂRGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D.; MORAR, O. *et al.* Quality parameters and nutritional value of different commercial bee products. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, 67, n. 2, 2010.

BORGHI, M.; PEREZ DE SOUZA, L.; YOSHIDA, T.; FERNIE, A. R. Flowers and climate change: a metabolic perspective. **New Phytol**, 224, n. 4, p. 1425-1441, Dec 2019.

BRIDI, R.; ECHEVERRIA, J.; LARENA, A.; NUNEZ PIZARRO, P. *et al.* Honeybee Pollen From Southern Chile: Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, Bioaccessibility, and Inhibition of DNA Damage. **Front Pharmacol**, 13, p. 775219, 2022.

BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P. *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nat Protoc**, 14, n. 4, p. 991-1014, Apr 2019.

BURIOL, L. Extratos etanólicos e oleosos de própolis: quantificação e atividade biológica. 2008.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. -, Universidade de São Paulo.

CAMPOS, M.; CUNHA, A.; MARKHAM, K. Bee-pollen: composition, properties, and applications. **Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy**, p. 93-100, 1997.

CAMPOS, M. G.; BOGDANOV, S.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; SZCZESNA, T. *et al.* Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, 47, n. 2, p. 154-161, 2008.

CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; COSTA, S. *et al.* Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, 41, n. 1, p. 5-23, 2015.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, 71, p. 107-120, 2018.

CASTEEL, D. B. **The behavior of the honey bee in pollen collection**. DigiCat, 2022.

ČEKSTERYTĚ, V.; KURTINAITIENĖ, B.; VENSKUTONIS, P. R.; PUKALSKAS, A. *et al.* Evaluation of antioxidant activity and flavonoid composition in differently preserved bee products. **Czech Journal of Food Sciences**, 34, n. 2, p. 133-142, 2016.

CEREIJIDO, M.; CONTRERAS, R. G.; FLORES-BENITEZ, D.; FLORES-MALDONADO, C. *et al.* New diseases derived or associated with the tight junction. **Arch Med Res**, 38, n. 5, p. 465-478, Jul 2007.

CHEN, L.; CAO, H.; HUANG, Q.; XIAO, J. *et al.* Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 62, n. 28, p. 7730-7742, 2022.

CHISTE, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E. *et al.* In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chem**, 127, n. 2, p. 419-426, Jul 15 2011.

COŞKUN, T. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi**, 48, n. 1, p. 61-84, 2005.

DA COSTA, E. L.; ANTONIO, J. M.; PEREIRA, O. A. Proximal composition of bee pollen and its functional effect on stress. 2022.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in environmental science**, 2, p. 53, 2014.

DAUDU, O. M. Bee Pollen Extracts as Potential Antioxidants and Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Enzymes Assessment. **Journal of Apicultural Science**, 63, n. 2, p. 315-325, 2019.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W.; MANLEY, M. Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. 2002.

DE OLIVEIRA SARTORI, A. G.; SALIBA, A. S. M. C.; MARTARELLO, N. S.; LAZARINI, J. G. *et al.* Changes in phenolic profile and anti-inflammatory activity of Baccharis beebread during gastrointestinal digestion/intestinal permeability in vitro. **Food Chemistry**, 432, p. 137234, 2024.

DIDARAS, N. A.; KARATASOU, K.; DIMITRIOU, T. G.; AMOUTZIAS, G. D. *et al.* Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives. **Antibiotics**, 9, n. 11, p. 811, 2020.

DISAYATHANOOWAT, T.; LI, H.; SUPAPIMON, N.; SUWANNARACH, N. *et al.* Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial Honey Bees in China. **Microorganisms**, 8, 2020.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

ELLIOTT, J. G. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages : Developing nutraceuticals for the new millenium. **Food Technology**, 53, p. 46-48, 1999.

EVANS, W. C.; TREASE, G. E. **Pharmacognosy**. Saunders London, 2002. 0702026174.

FERGUSON, L. R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **J Am Diet Assoc**, 109, n. 3, p. 452-458, Mar 2009.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, 62, p. 119-132, 2017.

GIANNETTI, V.; TESTANI, E.; RECCHIA, L. Food consumption and innovation: Functional foods. **Journal of Commodity Sciences, Technology and Quality**, 48, n. 3, p. 213-225, 2009.

GIANNIS, A.; KOLTER, T. Peptidomimetics for receptor ligands—discovery, development, and medical perspectives. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 32, n. 9, p. 1244-1267, 1993.

GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. **Apidologie**, 10, n. 3, p. 269-274, 1979.

GROSCWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **J Allergy Clin Immunol**, 124, n. 1, p. 3-20; quiz 21-22, Jul 2009.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARIF FADZILAH, N.; JAAPAR, M. F.; JAJULI, R.; WAN OMAR, W. A. Total phenolic content, total flavonoid and antioxidant activity of ethanolic bee pollen extracts from three species of Malaysian stingless bee. **Journal of Apicultural Research**, 56, n. 2, p. 130-135, 2017.

HELEN, L. B.; ROBERTS, A. E. L.; COOPER, R.; JENKINS, R. E. A review of selected bee products as potential anti-bacterial, anti-fungal, and anti-viral agents. **Medical Research Archives**, 4, n. 8, 2016.

HIDALGO, I. J.; RAUB, T. J.; BORCHARDT, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, 96, n. 2, p. 736-749, 1989.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis**. Association of Official Analytical Chemists Washington, DC, 1975.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature protocols**, 2, n. 9, p. 2111-2119, 2007.

IGHODARO, O.; AKINLOYE, O. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

KAPLAN, M.; KARAOĞLU, Ö.; SILICI, S. An Evaluation on Bee Bread: Chemical and Palynological Analysis. **Mellifera**, 19, n. 1, p. 21-29, 2019.

KAPOOR, D.; SINGH, S.; KUMAR, V.; ROMERO, R. *et al.* Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). **Plant Gene**, 19, p. 100182, 2019.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. **International journal of food science & technology**, 36, n. 7, p. 703-725, 2001.

KHALIFA, S. A.; ELASHAL, M.; KIELISZEK, M.; GHAZALA, N. E. *et al.* Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. **Trends in Food Science & Technology**, 97, p. 300-316, 2020.

KHALIFA, S. A.; ELSHAFIEY, E. H.; SHETAIA, A. A.; EL-WAHED, A. A. A. *et al.* Overview of bee pollination and its economic value for crop production. **Insects**, 12, n. 8, p. 688, 2021.

KIELISZEK, M.; PIWOWAREK, K.; KOT, A. M.; BŁAŻEJAK, S. *et al.* Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 71, p. 170-180, 2018.

KIM, J. H.; YU, Y. B.; CHOI, J. H. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. **J Hazard Mater**, 413, p. 125423, Jul 5 2021.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAZMIERCZAK, J.; MENCNER, L. *et al.* Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2015, p. 297425, 2015.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in research**, 661, n. 2, p. 23-67, 2006.

LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Rev Sci Tech**, 27, n. 2, p. 485-497, 499-510, Aug 2008.

LEE, S.; JO, K.; JEONG, H. G.; CHOI, Y. S. *et al.* Understanding protein digestion in infants and the elderly: Current in vitro digestion models. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 63, n. 7, p. 975-992, 2023.

LI, Q.; LIANG, X.; GUO, N.; HU, L. *et al.* Protective effects of Bee pollen extract on the Caco-2 intestinal barrier dysfunctions induced by dextran sulfate sodium. **Biomed Pharmacother**, 117, p. 109200, Sep 2019.

LINSKENS, H. Pollen as Food for Humans and Animals and as Medicine. **Fertilization in Higher Plants: Molecular and Cytological Aspects**, p. 397-403, 1999.

LIU, S.; LI, D.; HUANG, B.; CHEN, Y. *et al.* Inhibition of pancreatic lipase, alpha-glucosidase, alpha-amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. **J Ethnopharmacol**, 149, n. 1, p. 263-269, Aug 26 2013.

MALEŠEV, D.; KUNTIĆ, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian chemical society**, 72, n. 10, p. 921-939, 2007.

MARCHIANDO, A. M.; GRAHAM, W. V.; TURNER, J. R. Epithelial barriers in homeostasis and disease. **Annu Rev Pathol**, 5, p. 119-144, 2010.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, 46, n. 3, p. 234-239, 1998.

MARGAOAN, R.; MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; DULF, F. V. *et al.* Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee-collected pollen. **J Agric Food Chem**, 62, n. 27, p. 6306-6316, Jul 9 2014.

MARKOWICZ BASTOS, D. H.; MONIKA BARTH, O.; ISABEL ROCHA, C.; DA SILVA CUNHA, I. B. *et al.* Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Journal of Apicultural Research**, 43, n. 2, p. 35-39, 2004.

MARTEMUCCI, G.; COSTAGLIOLA, C.; MARIANO, M.; D'ANDREA, L. *et al.* Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. **Oxygen**, 2, n. 2, p. 48-78, 2022.

MATUSZEWSKA, E.; PLEWA, S.; PIETKIEWICZ, D.; KOSSAKOWSKI, K. *et al.* Mass Spectrometry-Based Identification of Bioactive Bee Pollen Proteins: Evaluation of Allergy Risk after Bee Pollen Supplementation. **Molecules**, 27, n. 22, p. 7733, 2022.

MAURER, F.; DAUM, N.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C.-M. *et al.* Plant genetic factors for iron homeostasis affect iron bioavailability in Caco-2 cells. **Food research international**, 43, n. 6, p. 1661-1665, 2010.

MAYDA, N.; ÖZKÖK, A.; ECEM BAYRAM, N.; GERÇEK, Y. C. *et al.* Bee bread and bee pollen of different plant sources: Determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 14, p. 1795-1809, 2020.

MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; DENNY, C.; DOS SANTOS, L. F. *et al.* Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, 181, p. 160-169, 2015.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Adv Med Sci**, 63, n. 1, p. 68-78, Mar 2018.



MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G. R.; RETTORI, D.; AUGUSTO, O. *et al.* Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 2, p. 293-298, Jan 10 2006.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **REVISTA DE NUTRICAÇÃO-CAMPINAS**-, 17, n. 4, p. 411, 2004.

MORETI, A.; MARCHINI, L.; SOUZA, V.; RODRIGUES, R. Atlas do pólen de plantas apícolas. **Rio de Janeiro: Papel Virtual Editora**, 2002.

MULET-CABERO, A.-I.; EGGER, L.; PORTMANN, R.; MÉNARD, O. *et al.* A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, 11, n. 2, p. 1702-1720, 2020.

MULLIN, J. M.; AGOSTINO, N.; RENDON-HUERTA, E.; THORNTON, J. J. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. **Drug Discov Today**, 10, n. 6, p. 395-408, Mar 15 2005.

MUNIATEGUI, S.; SANCHO, M.; LOPEZ, J.; HUIDOBRO, J. *et al.* Determination of carotenes from bee-collected pollen by high performance liquid chromatography. **Journal of Apicultural Research**, 29, n. 3, p. 147-150, 1990.

MUÑOZ, E.; VELÁSQUEZ, P.; RODRIGUEZ, K.; MONTENEGRO, G. *et al.* Influence of *Brassica campestris* and *Galega officinalis* on antioxidant activity of bee pollen. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 30, p. 444-449, 2020.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyis method for the determination of reducing sugar. **Anal. Chem**, 31, p. 426-428, 1944.

NICOLLE, C.; CARDINAULT, N.; GUEUX, E.; JAFFRELO, L. *et al.* Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. **Clinical Nutrition**, 23, n. 4, p. 605-614, 2004.

NKHATA, S. G.; AYUA, E.; KAMAU, E. H.; SHINGIRO, J. B. Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. **Food science & nutrition**, 6, n. 8, p. 2446-2458, 2018.

OLDONI, T. L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. **Universidade de São Paulo**, 2007.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

OZCAN, A.; OGUN, M. Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. **Basic principles and clinical significance of oxidative stress**, 3, p. 37-58, 2015.

PAGE, R. E.; FONDRK, M. K. The effects of colony-level selection on the social organization of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: colony-level components of pollen hoarding. **Behavioral ecology and sociobiology**, 36, p. 135-144, 1995.

PARADA, J.; AGUILERA, J. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of food science**, 72, n. 2, p. R21-R32, 2007.

PARK, Y.; KOO, M.; SATO, H.; CONTADO, J. Survey of some components of propolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Arquivos de biologia e Tecnologia**, 38, n. 4, p. 1253-1259, 1995.

PELASEYED, T.; BERGSTRÖM, J. H.; GUSTAFSSON, J. K.; ERMUND, A. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunological reviews**, 260, n. 1, p. 8-20, 2014.

PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B. *et al.* Histórico e principais usos da própolis apícola. 2015.

PERNAL, S. F. The Social Life of Honey Bees. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 37, n. 3, p. 387-400, 2021.

PERRIER, C.; CORTHESEY, B. Gut permeability and food allergies. **Clin Exp Allergy**, 41, n. 1, p. 20-28, Jan 2011.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, 4, n. 2, p. 89-96, Jun 2008.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, 97, p. 55-74, Jun 5 2015.

RANA, S.; ARORA, S.; GUPTA, C.; KAPILA, S. Effect of sodium caseinate and vitamin A complexation on bioaccessibility and bioavailability of vitamin A in Caco-2 cells. **Food Research International**, 121, p. 910-918, 2019.

REIN, M. J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-GORETTA, L. *et al.* Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **Br J Clin Pharmacol**, 75, n. 3, p. 588-602, Mar 2013.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **Int J Radiat Biol**, 65, n. 1, p. 27-33, Jan 1994.

ROJO, S.; ESCUREDO, O.; RODRÍGUEZ-FLORES, M. S.; SEIJO, M. C. Botanical Origin of Galician Bee Pollen (Northwest Spain) for the Characterization of Phenolic Content and Antioxidant Activity. **Foods**, 12, n. 2, p. 294, 2023.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 3, n. 9, p. 129-141, 2013.

SAKAC, M.; JOVANOVIĆ, P.; MARIC, A.; CETOJEVIĆ-SIMIN, D. *et al.* Antioxidative, Antibacterial and Antiproliferative Properties of Honey Types from the Western Balkans. **Antioxidants (Basel)**, 11, n. 6, p. 1120, Jun 6 2022.

SALIBA, A. S. M. C.; DE OLIVEIRA SARTORI, A. G.; BATISTA, P. S.; DO AMARAL, J. E. P. G. *et al.* Simulated gastrointestinal digestion/Caco-2 cell transport: Effects on biological activities and toxicity of a Brazilian propolis. **Food Chemistry**, 403, p. 134330, 2023.

SALIM, F.; SHUIB, N. S.; MOHD YUSOF, R. Antioxidants for health management. **Jurnal Intelek**, 17, n. 1, p. 55-62, 2022.

SAMBUY, Y.; DE ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M. *et al.* The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell biology and toxicology**, 21, p. 1-26, 2005.

SHAHIDI, F.; PENG, H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. **Journal of Food Bioactives**, 4, p. 11–68-11–68, 2018.

SHAPPELL, N. W. Ergovaline toxicity on Caco-2 cells as assessed by MTT, alamarBlue, and DNA assays. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, 39, n. 7, p. 329-335, 2003.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature reviews Molecular cell biology**, 21, n. 7, p. 363-383, 2020.

SIMON-ASSMANN, P.; TURCK, N.; SIDHOUM-JENNY, M.; GRADWOHL, G. *et al.* In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. **Cell Biol Toxicol**, 23, n. 4, p. 241-256, Jul 2007.

SOARES DE ARRUDA, V. A.; VIERIA DOS SANTOS, A.; FIGUEIREDO SAMPAIO, D.; DA SILVA ARAUJO, E. *et al.* Brazilian bee pollen: phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Journal of Apicultural Research**, 60, n. 5, p. 775-783, 2021.

SOUZA, L. A.; SOUZA, T. L.; SANTANA, F. B.; ARAUJO, R. G. *et al.* Determination and in vitro bioaccessibility evaluation of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn in linseed and sesame. **Microchemical Journal**, 137, p. 8-14, 2018.

STEVANOVIC, T.; DIOUF, P. N.; GARCIA-PEREZ, M. E. Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. **Current Nutrition & Food Science**, 5, n. 4, p. 264-295, 2009.

SULEIMAN, J. B.; MOHAMED, M.; ABU BAKAR, A. B.; NNA, V. U. *et al.* Chemical profile, antioxidant properties and antimicrobial activities of Malaysian *Heterotrigma itama* bee bread. **Molecules**, 26, n. 16, p. 4943, 2021.

SUNG, C. C.; HSU, Y. C.; CHEN, C. C.; LIN, Y. F. *et al.* Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. **Oxid Med Cell Longev**, 2013, p. 301982, 2013.

SUZUKI, T.; HARA, H. Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. **The Journal of nutrition**, 139, n. 5, p. 965-974, 2009.

TAVELIN, S.; TAIPALENSUU, J.; SODERBERG, L.; MORRISON, R. *et al.* Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. **Pharm Res**, 20, n. 3, p. 397-405, Mar 2003.

TCHÓRZEWSKA, D.; MARCINIEC, R.; DERYŁO, K.; WINIARCZYK, K. Heteromorphism of stamens in monoclinous flowers of *Tinantia erecta* (Jacq.) Fenzl as an example of high variability of the androecium in the Commelinaceae family. **Protoplasma**, 257, p. 1473-1485, 2020.

TOKALIOGLU, S.; CLOUGH, R.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chem**, 150, p. 321-327, May 1 2014.

TUNGMUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines (Basel)**, 5, n. 3, p. 93, Aug 25 2018.

TURKYILMAZ, I. B.; YANARDAĞ, R. Antioxidants prevent indomethacin-induced oxidative damage in tongue tissues of rats. **İstanbul Journal of Pharmacy**, 53, n. 1, p. 73-79, 2023.

ULFIG, A.; LEICHERT, L. I. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. **Cell Mol Life Sci**, 78, n. 2, p. 385-414, Jan 2021.

URCAN, A.; MĂRGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; BOBIȘ, O. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Beebread-Review. **Bulletin of the university of agricultural sciences & veterinary medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies**, 74, n. 1, 2017.

URCAN, A. C.; CRISTE, A. D.; DEZMIREAN, D. S.; MARGAOAN, R. *et al.* Similarity of Data from Bee Bread with the Same Taxa Collected in India and Romania. **Molecules**, 23, n. 10, p. 2491, Sep 28 2018.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. **Annu Rev Physiol**, 68, p. 403-429, 2006.

VASCONCELOS, M. R. D. S.; DUARTE, A. W. F.; GOMES, E. P.; SILVA, S. C. D. *et al.* Physicochemical composition and antioxidant potential of bee pollen from different botanical sources in Alagoas, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, 41, p. 447-458, 2017.

VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. **Journal of apicultural research**, 48, n. 3, p. 189-195, 2009.

VILLANUEVA, M. O.; MARQUINA, A. D.; SERRANO, R. B.; ABELLÁN, G. B. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 53, n. 3, p. 217-224, 2002.

VIT, P. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, 35, n. 2, p. 32-39, 2004.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; LI, H.; DENG, Z. *et al.* A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, 105, p. 347-362, 2020.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev**, 94, n. 3, p. 909-950, Jul 2014.

ZULUAGA, C. M.; SERRATOB, J. C.; QUICAZANA, M. C. Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. **Chem. Eng**, 43, p. 175-180, 2015.