

Influência dos métodos de preservação na composição química e atividade antioxidante de pólen apícola

Filipe Hélder Cardoso Lema

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por
Professor Doutor Vítor Manuel Ramalheira Martins

**Bragança
2020**

À Helena Cardoso, ao Luís Lema, pelo amor, confiança, e apoio nos momentos difíceis e por acreditar nos meus sonhos.

Dedico

Agradecimentos

Quero manifestar o meu agradecimento ao Professor Doutor Vítor Manuel Ramalheira Martins e ao Professor Doutor Miguel José Rodrigues Vilas-Boas, por terem possibilitado a realização do meu trabalho de dissertação no âmbito do projeto DivInA.

Ao meu orientador Professor Doutor Vítor Martins, agradeço por todo o apoio disponibilizado ao longo da realização desta dissertação, pela amizade e confiança que em mim depositou, pelo enorme empenhamento que demonstrou no desenvolvimento do trabalho. Muito obrigado professor pelos ensinamentos.

À Andreia Tomás, agradeço pelo carinho e amizade, pela infundável compreensão demonstrada nos momentos em que mais precisei e acima de tudo, agradeço por todo apoio disponibilizado no laboratório, confiança e incentivo. Agradeço ainda pela simpatia com que me recebeu no Centro de Investigação de Montanha (CIMO), pela ajuda constante disponibilizada e pelas vezes em que madrugamos e saímos tarde do laboratório. Muito obrigado pelos eternos ensinamentos minha Coorientadora.

Aos apicultores envolvidos no Projeto DivInA, agradeço pela disponibilização das amostras necessárias para a realização dos ensaios e análises.

Aos Laboratórios de Agroindústrias, Química e Bioquímica Aplicada do Instituto Politécnico de Bragança, agradeço pelas condições disponibilizadas para a realização prática desta dissertação.

À Maria do Céu Fidalgo Rodrigues, Luana Fernandes e o David, agradeço pela amizade, carinho e por toda ajuda que recebi de vós. Muito obrigado pela disponibilidade e experiência.

A todos funcionários do IPB no geral, de modo particular aos professores da Escola Superior Agrária, do Mestrado de Qualidade e Segurança Alimentar, manifesto os meus profundos agradecimentos pelos ensinamentos e sapiência.

À Professora Doutora Leticia Estevinho, Professora Doutora Elsa Ramalhosa, Professora Doutora Conceição Fernandes, Professora Doutora Isabel Ferreira, Professor Doutor José Alberto Pereira, Professora Doutora Filomena Barreiro, Doutora Lilian Barros, Professora Doutora Fátima Silva, Professora Doutora Clementina Santos, agradeço pela amizade, carinho, incentivo e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas, Marta Cuamba, Ângela Ciliato, Maria Olinda, Cesário, Ricardo, Adelgisa, Nágila, Stéphanie, Cátia, Patrícia, David, Rogério, Nuno, Joana, Pedro Regadas, Lau Costa, Valdemira, Décio, Imen, Iness, Zaqueu, Nastiana, Sozinha, que mesmo distantes fizeram-se presentes na minha vida, agradeço pelo encorajamento e constante motivação disponibilizada.

À Maria Zayadio, por suportar tamanha saudade e compreender os motivos da minha ausência longínqua, agradeço pelo amor, carinho e por tudo que eu não conseguirei retribuir na vida, que fizeste por mim.

Agradecimentos a família, por tudo aquilo que são e significam na minha vida, pelo amor incondicional, incentivo e palavras de conforto nos momentos em que mais precisei.

Aos investigadores do CIMO, Andreia, Ângela, Soraia, Rossana, Márcio, Inês, Sandrina, Carla, Lúvia, Taofiq, Zé, Manuel, Shantal, Tiane, Shirley, Filipa, Ângela, Ricardo, um obrigado especial pela simpatia e carinho com que me receberam, por todos os momentos de laboratório, pela partilha de dúvidas, do conhecimento e pela forma prestável com que sempre me ajudaram ao longo destes meses.

À Natália Sabino, Centro Ciência Viva de Bragança, Senhor António Francisco Pires “*Jaleco*”, Doutor João Manuel Sampaio, o meu muito obrigado pela amizade e carinho.

Aos que aqui não pude mencionar, peço as minhas sinceras desculpas e dizer-vos que, vós sois parte de mim e muito obrigado por existirem na minha vida.

Muito obrigado a todos

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	xiv
1. 1. OBJETIVO GERAL.....	1
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	3
1.3. Pólen apícola	4
1.3.1. <i>Aplicação do pólen apícola na indústria alimentar</i>	5
1.4. Normas, qualidade e especificações do pólen apícola	5
1.5. Composição química do pólen apícola.....	7
1.5.1. <i>Humidade</i>	9
1.5.2. <i>Hidratos de carbono</i>	9
1.5.3. <i>Proteínas</i>	10
1.5.4. <i>Lípidos</i>	10
1.5.5. <i>Minerais</i>	10
1.6. Propriedades biológicas do pólen apícola.....	11
1.6.1. <i>Atividade antioxidante</i>	11
1.6.2. <i>Atividade anti-inflamatória</i>	12
1.6.3. <i>Atividade antibacteriana</i>	12
1.7. Métodos de recolha do pólen apícola	13
1.8. Métodos de preservação do pólen apícola	15
1.8.1. <i>Secagem do pólen apícola</i>	15
1.8.2. <i>Congelação do pólen apícola</i>	16
1.8.3. <i>Liofilização do pólen apícola</i>	17
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1. Amostragem.....	19

2.2. Análise polínica.....	20
2.3. Metodologias de preservação.....	20
2.4. Composição química	21
2.4.1. Determinação do teor de humidade	21
2.4.2. Determinação do teor em cinzas	22
2.4.3. Determinação do teor de gordura bruta	23
2.4.4. Determinação do teor de proteína bruta	25
2.4.5. Determinação de açúcares livres	26
2.4.6. Teor de compostos fenólicos totais.....	27
2.5. Atividade antioxidante.....	28
2.5.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	28
2.5.2. Poder redutor.....	30
2.6. Análise Estatística	31
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1. Caracterização das amostras de pólen.....	33
3.1.1. Análise polínica	33
3.1.2. Teor de humidade	39
3.1.3. Método de captura	40
3.2. Impacto dos métodos de preservação	41
3.2.1. Composição química e atividade antioxidante imediatamente após aplicação dos diferentes métodos de preservação	41
3.2.2. Composição química e atividade antioxidante ao longo do armazenamento	47
4. Conclusões.....	59
5. Perspetivas de trabalho.....	61
6. Referências bibliográficas.....	62
ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da flor e suas partes sexuais.....	4
Figura 2 - Abelhas obreiras a colher pólen e com as cargas polínicas nas patas traseiras (A) e capta-pólen utilizados para a recolha de pólen apícola (B).	13
Figura 3 – A) Capta pólen com pólen apícola (estrado); B) Capta pólen de plástico tipo injetado (frontal); C) Capta pólen tipo tropical africanizado baiano (estrado); D) Capta pólen de tipo intermediário interno (estrado).....	14
Figura 4 - Secador de pólen apícola.....	16
Figura 5 – Origem das amostras de pólen apícola usadas nas várias partes do trabalho. Distribuição do estudo de acordo com as amostras utilizadas	19
Figura 6 – A. Estufa Climacell (MMM Group, modelo CLC-B2V-M/CLC111-TV) B. Estufa Memmert Basic UNB 100-500	22
Figura 7 - Amostras de pólen apícola após incineração em mufla a 550 °C.....	23
Figura 8 - Extrator de Soxhlet, extraíndo gordura em amostras de pólen apícola.....	24
Figura 9 - Evaporador rotativo a vácuo (Heidolph).....	25
Figura 10 - Balança (BEL engineering)	25
Figura 11 – A. Reação de oxidação da amostra em tubos de digestão. B. Micro-Kjeldahl de extração de proteínas	26
Figura 12 – Placa de agitação (Selecta Multimatic-9N, Espanha)	28
Figura 13 – A. Micro placa de 96 poços preparada para leitura; B. Leitor de microplacas ELX800 Microplate Reader Bio-Tek	29
Figura 14 – Espectrofotómetro (Analytik Jena, SPECORD 200, Alemanha)	30
Figura 15 – Teor de humidade do pólen por região de captura e valores de precipitação registados na respetiva data de recolha	39
Figura 16 – Teor de humidade do pólen pelo modelo de captura utilizado (capta-pólen de estrado e frontal)	40
Figura 17 – Evolução do teor de humidade ao longo de 9 meses de armazenamento, das	

amostras de pólen preservadas através dos métodos de preservação em estudo.....	48
Figura 18 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de cinza do pólen para os diferentes métodos de preservação.....	49
Figura 19 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de gordura do pólen para os diferentes métodos de preservação.....	50
Figura 20 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de proteínas do pólen para os diferentes métodos de preservação.....	51
Figura 21 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do perfil de açúcares do pólen para os diferentes métodos de preservação.....	53
Figura 22 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do perfil de açúcares do pólen para os diferentes métodos de preservação	54
Figura 23 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de compostos fenólicos totais do pólen para os diferentes métodos de preservação.....	55
Figura 24 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses da atividade antioxidante do pólen, avaliada pelo método do DPPH, e expressa através do valor de EC50, para os diferentes métodos de preservação.....	56
Figura 25 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses da atividade antioxidante do pólen, avaliada através do método do poder redutor, para os diferentes métodos de preservação.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Caraterização da evolução do sector apícola 2010 – 2013 e 2013 – 2015 em Portugal.....	2
Tabela II - Países que possuem legislação específica para o controlo de qualidade dos produtos da apicultura.	6
Tabela III - Composição química do pólen apícola	8
Tabela IV – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Bragança	33
Tabela V – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Vila Real	35
Tabela VI – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Nisa	37
Tabela VII – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Portalegre	38
Tabela VIII – Preservação do pólen apícola no T0 (zero mês)	42
Tabela IX – Análise do valor nutricional e atividade antioxidante das amostras de pólen apícola após aplicação das diversas metodologias de preservação ao longo do tempo	75

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação n° 1	22
Equação n° 2	23
Equação n° 3	24
Equação n° 4.....	26
Equação n° 5	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SEC35	Secagem em estufa a 35°C	mg	Miligrama
SEC40	Secagem em estufa a 40°C	mm	Milímetro
SEC45	Secagem em estufa a 45°C		
AACC	American Association of Cereal Chemists	m:v	Massa / volume
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	mL	Mililitro
CIMO	Centro de Investigação de Montanha	NH₂	Amina
CONG	Amostra congelada	nm	Nanómetro
Cu	Cobre	pH	Potencial de hidrogénio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	rpm	Rotação por minuto
DivInA	Diversificação e Inovação na produção Apícola	T0	Tempo zero mês
EAG	Equivalentes de ácido gálico	T1	Tempo um mês
EC₅₀	Concentração do extrato a 50% de inibição	T3	Tempo três meses
ESA	Escola Superior Agrária	T6	Tempo seis meses
g	Grama	vs	Versus
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	v/v	Volume / volume
Kg	Kilograma	µL	Micro litro
LIOF	Amostra liofilizada	µm	Micrómetro
MAFDR	Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural	°C	Graus Celsius
Mbar	Milibar	%	Porcento

RESUMO

O pólen apícola é um importante produto da colmeia, com uma composição química e propriedades biológicas, que variam de acordo com a região de produção, idade e espécie botânica da planta de onde a abelha recolhe o pólen e condições agroecológicas no momento da recolha. A presente investigação teve como objetivo o estudo da influência dos métodos de preservação na composição química e atividade antioxidante do pólen apícola preservado através das técnicas de congelação, liofilização e secagem em estufa a temperatura de 35°C, 40°C e 45°C, durante 9 meses de armazenamento. Deste modo, foram avaliados os teores de humidade, cinza, proteína, gordura, açúcares e compostos fenólicos totais, para além da atividade antioxidante (método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e método do poder redutor), imediatamente após a aplicação de cada técnica de preservação e ao longo de um período de 9 meses de armazenamento (após 1 mês, 3 meses, 6 meses e 9 meses). Os resultados obtidos mostraram que as características significativamente influenciadas pela aplicação das técnicas de preservação foram os teores de glucose, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. De uma forma geral, considerando a manutenção do valor nutricional do pólen, a liofilização mostrou-se como a técnica de preservação mais adequada, tendo, no entanto, um impacto negativo mais evidente no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do pólen, quando comparada com a técnica de secagem em estufa à temperatura mais alta, ou seja, a 45°C.

Palavras-chaves: *pólen, preservação, composição química e atividade antioxidante*

ABSTRACT

Bee pollen is an important product of the hive, with a chemical composition and biological properties, which may vary according to the region of production, age and botanical species of the plant from which the bee collects pollen, and agroecological conditions at the time of collection. The objective of this investigation was to study the effect of freezing, freeze-drying and oven drying methods at temperature the 35°C, 40°C and 45°C, on the chemical composition and antioxidant activity of bee pollen during 9 months of storage. Thus, moisture, ash, protein, fat and total phenolic compounds contents, as well as antioxidant activity (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and reducing power assays) were evaluated, immediately after the application of each preservation method and during 9 months of storage (after 1, 3, 6 and 9 months). The results obtained showed that the glucose levels, the total phenolic contents and antioxidant activity were significantly influenced by the application of preservation methods. In general, regarding the nutritional composition of the pollen, freeze-dry showed the best preservation method, although it was observed a negative impact on total phenolic contents and antioxidant activity, when compared with the oven drying at the taller temperature (45°C).

Keywords: *pollen, preservation, chemical composition, conservation and antioxidant activity*

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO



- 1.1. Objetivo geral
- 1.2. Objetivos específicos
- 1.3. Pólen apícola
 - 1.3.1. *Aplicação do pólen na indústria alimentar*
- 1.4. Normas, qualidade e especificações do pólen apícola
- 1.5. Composição química do pólen apícola
 - 1.5.1. *Humidade*
 - 1.5.2. *Hidratos de carbono*
 - 1.5.3. *Proteínas*
 - 1.5.4. *Lípidos*
 - 1.5.5. *Cinzas*
- 1.6. Propriedades biológicas do pólen apícola
 - 1.6.1. *Atividade antioxidante*
 - 1.6.2. *Atividade anti-inflamatória*
 - 1.6.3. *Atividade antibacteriana*
- 1.7. Métodos de recolha do pólen apícola
- 1.8. Métodos de preservação do pólen apícola
 - 1.8.1. *Secagem do pólen apícola*
 - 1.8.2. *Congelação do pólen apícola*
 - 1.8.3. *Liofilização do pólen apícola*

1. 1. OBJETIVO GERAL

A apicultura tem grande importância para o sector da agricultura, uma vez que participa na manutenção dos ecossistemas e espaços naturais, cria equilíbrio ecológico da flora e na manutenção da biodiversidade, sendo economicamente sustentável nas explorações apícolas, quer na polinização de espécies cultivadas e na vegetação espontânea dos espaços rurais (Cabo *et al.*, 2014; Caminha, 2014).

O pólen apícola tem sido um assunto de grande interesse para muitos investigadores e apicultores. O mesmo resulta da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas, mediante o acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel (Caminha *et al.*, 2016). O pólen serve de alimento, sendo recolhido pelas abelhas em função das necessidades da colmeia e armazenado em alvéolos separadamente do mel. As abelhas, ao coletar o néctar das flores, involuntariamente coletam também o pólen, sendo este regurgitado com o néctar nos alvéolos melíferos. Desta maneira, o pólen aparecerá no mel constituindo importante indicador para a sua origem botânica e geográfica (Barth, 1989).

Em Portugal, a prática da apicultura está ligada ao sector da agricultura, como acontece em toda União Europeia e em todos os países do mundo onde se pratica esta atividade, tendo sido encarada como um complemento ao rendimento das explorações. No entanto, é de assinalar um crescente universo de apicultores para os quais a apicultura é a base das receitas de exploração [Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (MAFDR), 2016]. Atualmente, existem em Portugal cerca de 11 mil (anteriormente 17 mil de 2010 - 2013) apicultores registados, correspondendo a um universo de aproximadamente 33 mil (anteriormente 40 mil) apiários e 626 mil colmeias, (anteriormente 567 mil), segundo os dados relativos à evolução da atividade apícola entre 2010 a 2013 e 2013 a 2015 (Caminha, 2014; MAFDR, 2016), conforme apresentado na **Tabela I**.

Tabela I - Caracterização da evolução do sector apícola 2010 – 2013 e 2013 – 2015 em Portugal

	2010	2013	2015	Variação (número e %)			
				2010-2013		2013-2015	
Nº de apicultores	17291	16774	10698	-517	3%	-6076	-36%
Nº de apiários	38203	40176	33876	1973	5%	-6300	-16%
Nº de colmeias	562557	566793	626399	4236	1%	59606	11%
Total de apiários/apicultor	-	2	3			1	50%
Total de colmeias/apicultor	-	34	59			25	74%

[Fonte: Adaptado de [Caminha \(2014\)](#) e [MAFDR \(2016\)](#)]

Segundo a análise de distribuição regional dos apicultores registados em Portugal, verificou-se que existe uma forte dispersão desta atividade no país, praticada por apicultores profissionais e não profissionais. É na região Norte onde se situa o maior número de apicultores (34% do total) em valor absoluto; na região do Algarve, se encontram os apicultores de maior dimensão e o menor número de apicultores do continente; na região da Madeira com o menor número de apicultores, menor número de apiários e menor número de colmeias (tendo entre 2013 e 2015 uma diminuição substancial do número de apicultores – passou de 313 para 185 apicultores – e aumentou o número de colmeias – de 4791 para 5052 – passando o número de colmeias/apicultor, de 13 para 27 durante o mesmo período) ([MAFDR, 2016](#)).

Apesar do pólen apícola da colmeia ser utilizado há muitos anos como um suplemento alimentar, destacando-se como antioxidante, antibacteriano e antifúngico, é pouco valorizado atualmente em Portugal. E como reflexo desta situação, a oferta de pólen apícola no mercado português é relativamente escassa, se compararmos com a grande diversidade de méis disponíveis para o consumidor. Este facto pode ser explicado pela pouca informação dos atributos que este produto possui e pela falta de conhecimentos técnicos da maioria dos apicultores do país, sobre os sistemas de produção, preservação e respetivo impacto na composição físico-química e propriedades terapêuticas ([Rocha, 2013](#)).

Deste modo, o presente trabalho pretende contribuir para um melhor conhecimento da influência na composição química e atividade antioxidante do pólen apícola preservado através das técnicas de congelação, secagem em estufa a várias temperaturas (35°C, 40°C e 45°C) e liofilização. A informação obtida ao longo deste trabalho deverá ser divulgada junto dos apicultores, permitindo-lhes utilizar as técnicas de preservação

do pólen que permitam a obtenção de um produto com maior qualidade, possibilitando assim uma maior rentabilidade.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

De modo a atingir o objetivo, foi necessário:

1. Avaliar a composição química das amostras de pólen preservado através de congelação, secagem em estufa à temperatura de 35°C (SEC35), 40°C (SEC40) e 45°C (SEC45) e liofilização:

- a.** teor de humidade;
- b.** teor de cinza;
- c.** teor de proteína total;
- d.** teor de gordura;
- e.** perfil de açúcares;
- f.** compostos fenólicos totais;
- g.** atividade antioxidante (DPPH e poder redutor).

2. Avaliar, para cada uma das cinco metodologias de preservação, a evolução das características químicas referidas anteriormente ao longo do tempo (0, 1, 3, 6 e 9 meses).

Para além disso, foi também possível avaliar a influência da região e do modelo de capta-pólen utilizado na recolha do pólen (capta-pólen frontal e de estrada) no teor de humidade das amostras.

1.3. Pólen apícola

Do ponto de vista botânico, o pólen é a parte do androceu (**Figura 1**), que é o gâmeta masculino das flores das plantas e que tem a função de garantir a fecundação da flor e, conseqüentemente, a reprodução da planta e a diversidade genética (Nogueira, 2012). O pólen apícola é um pó fino, formado por minúsculos grãos de aproximadamente 50 µm (Carpes, 2008), que têm estruturas e formas diversas conforme as plantas e flores que os originam e possuem esporos na superfície (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Tomás, 2013) de coloração diversa e clara, devido a diversidade das espécies botânicas visitadas pelas abelhas.

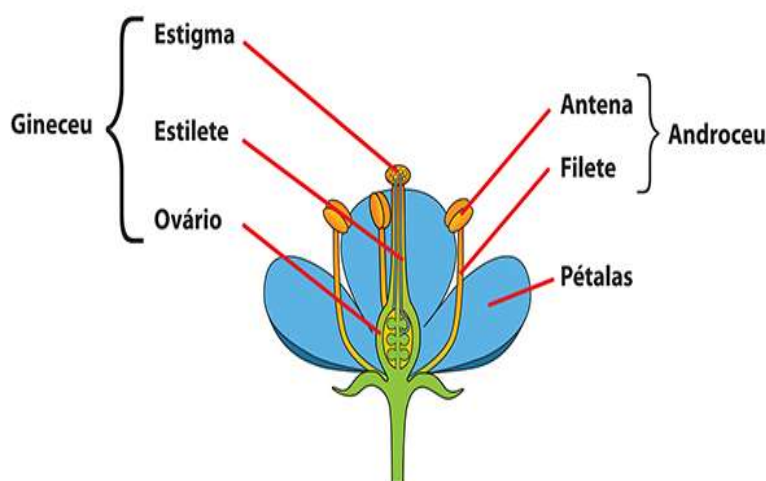


Figura 1 - Representação da flor e suas partes sexuais.

[Fonte: https://www.sistemanovi.com.br/basenovi/image/ConteudosDisciplinas/52/117/715/301597/esquema-simplificado-flor.png?pfdr_id_c=true. Acessado em Novembro de 2018]

As plantas em fase de floração, podem ser polinizadas de diversas formas, nomeadamente através do vento, insetos, água corrente e a intervenção do homem. As flores das plantas polinizadas pelo vento (anemófilas) produzem grãos de pólen leves e secos, que facilmente são transportados pelo vento. Por outro lado, as flores das plantas polinizadas pelos insetos (entomófilas) produzem pólen e néctar, tendo os grãos de pólen determinadas características que contribuem para que fiquem presos ao corpo dos insetos. Quer o pólen das plantas anemófilas, quer o das plantas entomófilas é recolhido pelas abelhas e levado para o interior da colmeia onde é utilizado como alimento, devido ao seu alto valor nutritivo a nível proteico (Casaca, 2010; Bogdanov, 2014a).

Diversos estudos têm evidenciado o efeito positivo do pólen ao nível das funções digestivas e intestinais, no aumento do apetite, como alimento energético, no combate à neurose e à depressão mental, contra infeções da próstata e para o controlo dos diabetes (Condón, 2005; Munstedt e Bogdanov, 2009; Bogdanov, 2014b). Como resultado da maior evidência sobre os efeitos benéficos do pólen apícola, tem-se vindo a verificar um aumento substancial na quantidade de informação disponível sobre o pólen, a sua comercialização, e a sua incorporação nas dietas humana e animal.

1.3.1. Aplicação do pólen apícola na indústria alimentar

Este facto tem contribuído de uma forma decisiva para o crescente interesse na busca por alimentos e estilos de vida mais saudáveis (Serafini, 2013). A preocupação na busca de alimentos mais saudáveis tem-se alargado à indústria alimentar que, vastas vezes, recorre à utilização de aditivos alimentares sintéticos, particularmente substâncias com atividade antioxidante (Sousa *et al.*, 2007).

1.4. Normas, qualidade e especificações do pólen apícola

A qualidade do pólen é influenciada pela sua composição química, que varia de acordo com diversos fatores, como por exemplo o tipo de flor, condições agroecológicas e métodos de recolha. (Melo, 2015). Este facto poderá justificar, em parte, a não existência de normas de qualidade relativas ao pólen apícola na maioria dos países, conforme mostra a **Tabela II**.

Tabela II - Países que possuem legislação específica para o controle de qualidade dos produtos da apicultura.

PAÍS	MEL	PRÓPOLIS	GELEIA REAL	PÓLEN APÍCOLA
Alemanha	Sim ¹	Não	Não	Não
Argentina	Sim	Não	Sim	Sim
Armênia	Sim	Sim	Sim	Sim
Bélgica	Sim ¹	Não	Não	Não
Bulgária	Sim	Sim	Sim	Sim
Brasil	Sim	Sim	Sim	Sim
China	Sim	Sim	Sim	Sim
Cuba	Sim	Sim	Não	Sim
El Salvador	Sim	Não	Não	Não
Eslováquia	Sim ¹	Não	Não	Não
Finlândia	Sim ¹	Não	Não	Não
França	Sim ¹	Não	Não	Não
Grécia	Sim ¹	Não	Não	Não
Holanda	Sim ¹	Não	Não	Não
Inglaterra	Sim ¹	Não	Não	Não
Itália	Sim ¹	Não	Não	Não
Japão	Sim	Não	Não	Não
Nepal	Sim	Não	Não	Não
Polônia	Sim	Sim	Sim	Sim
Portugal	Sim ¹	Não	Não	Não
República Tcheca	Sim	Não	Não	Não
România	Sim	Não	Não	Não
Rússia	Sim	Sim	Sim	Sim
Suíça	Sim	Não	Sim	Sim
Turquia	Sim	Sim	Sim	Sim
Uruguai	Sim	Não	Sim	Sim
Venezuela	Sim	Não	Não	Não
¹ Adota a legislação da União Europeia				

[Fonte: Almeida-Muradian, 2009]

A Espanha foi um dos primeiros países a estabelecer normas para a padronização do pólen apícola, como resposta à não existência de normas específicas sobre a qualidade do produto espanhol, o que resultou na comercialização de produtos de baixa qualidade e consequente perda do mercado europeu (Barreto *et al.*, 2005).

É de extrema importância o conhecimento da composição química do pólen apícola, particularmente do seu teor de humidade, para garantir a qualidade do produto

final. Portugal carece de uma legislação referente ao pólen apícola (**Tabela II**), tornando-se por isso, importante o conhecimento dos padrões referentes à sua composição química e o teor de humidade, embora existindo legislações que regulam o sector da apicultura. Refere-se ainda que, países como Argentina, Brasil, Cuba, Japão, Polónia, Rússia, Suíça, Turquia e Uruguai, possuem limites para os parâmetros de qualidade e reconhecem legalmente o pólen como um suplemento alimentar, uma vez que contém substâncias nutricionalmente importantes (Nogueira, 2012).

Na legislação brasileira, são estabelecidos requisitos relativos a características sensoriais (aspeto, aroma, cor e sabor) e físico-químicas (acidez livre, açúcares totais, cinzas, fibra bruta, humidade, lípidos, proteínas e pH) do pólen apícola. No caso particular do teor de humidade, que influencia de forma decisiva a estabilidade do pólen apícola, são estabelecidos valores máximos de 30 e 4%, para o pólen *in natura* e para o pólen desidratado, respetivamente. Esse documento, estabelece ainda que, para o pólen desidratado, a secagem deverá ser realizada a uma temperatura máxima de 42°C. A legislação Argentina estabelece um valor de 8% para o teor de humidade final no pólen desidratado (Caminha, 2014).

1.5. Composição química do pólen apícola

A composição química do pólen apícola é influenciada pelas variações quantitativas entre as flores das diferentes espécies vegetais pelas abelhas, condições agroecológicas, geográficas, idade da planta e estação do ano (Carpes, 2008; Hervatin, 2009; Casaca, 2010), fazendo do pólen o elemento de maior diversidade entre os produtos da colmeia (**Tabela III**).

Tabela III - Composição química do pólen apícola desidratado

PARÂMETROS	ESTUDO (% de peso seco de pólen desidratado)										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Hidratos de carbono	--	13 - 55	--	--	--	40	10 - 40	--	--	--	--
Açúcares totais	28 - 66	--	20 - 40	--	--	--	--	28 - 66	28,4	15,50	--
Açúcar redutor	--	--	20 - 26	47,2	33,3	--	20 - 26	--	--	--	--
Fibra, Pectina	0,3 - 20	0,3 - 20	3 - 5	--	--	--	--	0,3 - 20	--	4,36	--
Proteínas	3 - 62	10 - 40	15 - 30	30	20,3	35	5 - 30	3 - 62	21,5	21,35	23,59
Lípidos	1 - 13	1 - 13	1,0 - 5	2,82	2,81	5	1 - 5	1 - 13	3,5	4,64	4,97
Cinzas	0,5 - 6	2 - 6	2,5 - 3,5	3,2	2,1	3	--	0,5 - 6	2,8	2,22	3,08
Humidade	--	--	--	16,84	7,3	7 - 10	--	--	23,6	7,44	2,34
Indeterminados	--	2 - 5	--	--	--	13	--	--	--	--	--
pH	--	--	--	--	--	--	--	--	5,1	--	--

[Fonte: Adaptado de: **A.** Almeida-Muradian, (2009); **B.** Campos *et al.*, (2008); **C.** Carpes, (2008); **D.** Morais, (2009); **E.** Nogueira *et al.*, (2012); **F.** Tomás (2013); **G.** Estevinho *et al.*, (2012); **H.** Almeida-Muradian *et al.*, (2005); **I.** Marchini *et al.*, (2006); **J.** Serafini, (2013); **K.** Ferreira, (2012)].

1.5.1. Humidade

A humidade facilita a recolha do pólen fresco e é um dos principais parâmetros de qualidade para a preservação deste produto. A humidade relativa do pólen fresco ronda aos 30%, para garantir a sua qualidade e reduzir o desenvolvimento de microrganismos é necessário reduzir o teor de humidade para valores de aproximadamente 4-8% através da secagem (Almeida-Muradian e Penteado, 2007; Campos *et al.*, 2008; Casaca, 2010; Melo *et al.*, 2011). Para a qualidade do pólen apícola, a Legislação Brasileira recomenda um teor de humidade máxima de 30% para pólen fresco e 4% para pólen desidratado (Brasil, 2001).

Na altura da recolha, o teor de humidade na amostra de pólen é um dos parâmetros que recebe maior atenção do apicultor. Depende sobre tudo de vários fatores, associados com a época de colheita, fatores climáticos, o grau de maturação alcançado na colmeia (Finola *et al.*, 2007).

1.5.2. Hidratos de carbono

Os principais hidratos de carbono presentes no pólen são monossacarídeos (frutose e a glucose) ou dissacarídeos (sacarose). Os hidratos de carbono podem aparecer no pólen com valores médios no intervalo de 10 a 55%, (Campos *et al.*, 2008; Estevinho *et al.*, 2012; Tomás, 2013). No entanto, estes valores podem estar sujeitos a uma elevada variabilidade, dependendo da origem do pólen. Este facto torna-se evidente nos valores encontrados em alguns estudos, como é o caso de um estudo realizado com pólen recolhido na Tailândia, onde os valores médios de frutose, sacarose e glucose, foram de 7,2%, 0,6% e 6,4%, respetivamente (Chantarudee *et al.*, 2012). Para além disso, neste estudo foi ainda reportada a presença de 0,53% de maltose. Um outro estudo, envolvendo amostras do sul do Brasil, evidenciou a presença de 6,7% de glucose e de 5,3% de frutose (Souza, 2014).

Para além destes açúcares, existem outros dissacáridos e trissacáridos em pequenas quantidades no pólen apícola, bem como alguma quantidade de amido (Condón, 2005; Campos *et al.*, 2008). Para além do amido, no pólen podem também ser encontradas fibras, sendo que a Instrução Normativa nº3 da Legislação Brasileira sobre a qualidade de pólen apícola, estabelece um percentual mínimo de 1,8% para as fibras (BRASIL, 2001). Os percentuais médios de fibras encontrados no pólen apícola por Carpes,

(2008); Almeida-Muradian, (2009); Serafini, (2013), foram de 3 a 5%, 0,3 a 20% e 4,36, respetivamente.

1.5.3. Proteínas

O pólen apícola contém cerca de 3 a 62% de proteínas (Almeida-Maradian, 2009), sendo a prolina e o ácido glutâmico, os aminoácidos constituintes mais abundantes. O seu valor nutritivo é considerado elevado, devido à sua composição em aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina, valina, metionina, treonina, lisina, triptofano e fenilalanina), tornando o pólen um excelente suplemento alimentar na dieta humana (Lengler, 2002; Condón, 2005; Campos *et al.*, 2008; Caminha, 2014). As médias encontradas em trabalhos apresentados por Morais, (2009) e Ferreira, (2012) são superiores a 20%, o que demonstra a riqueza desse alimento em material proteico. Outros estudos com o pólen apícola, mostram valores médios em proteína total de 10 a 40% (Campos *et al.*, 2008), 30% (Morais, 2009), 20,3% (Nogueira *et al.*, 2012) e 35% (Tomás, 2013).

1.5.4. Lípidos

O pólen contém na sua composição entre 1 a 13% de lípidos, onde predominam os ácidos gordos insaturados, predominando o ácido linolénico, seguido do ácido linoleico e ácido oleico (Condón, 2005; Caminha, 2014). Para além de ácidos gordos, o pólen contém outros compostos de natureza lipídica, tais como esteróis e carotenóides (Féas *et al.*, 2012). A legislação Suíça sobre a qualidade do pólen apícola, estabelece valores máximos, no intervalo de 1 a 10% de lípidos (Bogdanov *et al.*, 2004). Estudos realizados por Morais (2009), Ferreira (2012) e Tomás (2013), apresentaram valores médios de lípidos de 2,82%, 4,97% e 5%, respetivamente.

1.5.5. Minerais

A fração de minerais no pólen determina-se mediante a obtenção do teor em cinzas (Condón, 2005; Campos *et al.*, 2008). O potássio é o mineral que aparece em maior percentagem (60% do total de minerais), no entanto o pólen também possui magnésio (cerca 20%), sódio, cálcio, ferro, zinco. Normalmente, a quantidade de cinzas presente no pólen apícola, depende substancialmente da origem floral, época de colheita, melada adicionada e do néctar recolhido pelas abelhas durante o voo (Rodríguez *et al.*, 2004).

As cinzas, constituídas pela matéria mineral do pólen, fazem parte dos constituintes minoritários, podendo apresentar valores médios entre 2,5 e 3,5% (Carpes, 2008) e 3% (Tomás (2013)).

1.6. Propriedades biológicas do pólen apícola

O pólen tem vindo a despertar o interesse de investigadores de todo o mundo, devido às suas propriedades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora e anti-mutagénica.

1.6.1. Atividade antioxidante

Os antioxidantes nos alimentos, são considerados substâncias que aparecem em pequenas quantidades e que são capazes de prevenir significativamente a matéria ou retardar grandemente a oxidação de substâncias facilmente oxidáveis (Becker *et al.*, 2004). Um exemplo de substâncias com atividade antioxidante são os compostos fenólicos, que representam um indicador de qualidade para o pólen apícola (Carpes, 2008). Os mesmos, variam de uma forma simplificada com baixo peso molecular, compostos por anéis aromáticos individuais a grandes e complexos taninos e derivados polifenóis. Quanto ao arranjo e número de carbonos, são classificados em flavonóides (flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, tocianidinas, flavanonas, isoflavonas e outros) e não-flavonóides (ácidos fenólicos, hidroxicinamatos, e outros) (Amâncio, 2014). Entre os compostos fenólicos, os flavonóides são os mais numerosos e podem ser encontrados em todo reino vegetal, principalmente na parede superficial do pólen. Os mesmos, têm grande importância como metabolito secundário, estando envolvido em processos como proteção à exposição ultravioleta, pigmentação e resistência a doenças (Hubinger, 2009; Lopes *et al.*, 2011). Carpes *et al.*, (2008) refere em seus estudos que, as propriedades biológicas do pólen podem estar relacionadas, com a ação dos compostos fenólicos.

No caso particular do pólen apícola, a atividade antioxidante é das propriedades mais reportadas, o que possibilita a sua aplicação na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética. Estudos *in vitro* e *in vivo* com amostras de pólen apícola demonstraram o efeito da atividade antioxidante do pólen e que pode ser utilizado como um antioxidante dietético para a saúde humana (Li *et al.*, 2018). Estudos com amostras de pólen apícola do Cairo (Egipto), testados em ratos por indução de fluoreto de sódio, mostraram a

diminuição significativa do malondialdeído, bem como um aumento notável de superóxido dismutase e níveis de glutamina no sangue e no cérebro (Khalil e Elsheikh, 2010). Outro estudo contra o *stress* oxidativo, utilizando amostras de pólen apícola, promoveu a restauração do fígado em ratos induzidos por tetracloreto de carbono (CCl₄) (Yıldız *et al.*, 2013). Reporta-se ainda em outro estudo que, amostras de pólen apícola modularam a catalase, a glutamina, níveis de peroxidase e superóxido dismutase, na hiperamonemia induzida por tioacetamida em ratos (Omnia *et al.*, 2014).

1.6.2. Atividade anti-inflamatória

O pólen apícola possui um potencial anti-inflamatório comparável ao de anti-inflamatórios não esteróides, como o naproxeno, analgin, fenilbutazona e indometacina (Melo, 2015). Diversos estudos evidenciaram a presença de ácidos gordos, flavonóides, ácidos fenólicos e fitoesteróis como principais responsáveis pela atividade anti-inflamatória do pólen apícola (Hamalainen *et al.*, 2007; Komosinska-Vassev *et al.*, 2015).

A capacidade anti-inflamatória do pólen apícola foi testada *in vivo* por Choi (2007), que estudou a capacidade de extratos de pólen de pinheiro em aliviar a inflamação e a dor em ratos, submetidos a diferentes protocolos. Observou-se uma redução significativa na inflamação provocada, bem como na percepção da dor aos animais expostos ao tratamento.

1.6.3. Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana do pólen apícola é pouco reportada, embora esta atividade tenha sido comprovada em alguns estudos que demonstraram a atividade antibacteriana contra algumas espécies patogénicas para os vegetais (Frigerio, 2009).

Estudos de avaliação da atividade antibacteriana de pólen apícola recolhido na Turquia mostraram que o extrato de pólen tem um efeito inibidor do crescimento de 13 espécies bacterianas patogénicas para os vegetais (Esin *et al.*, 2006). Através da realização deste estudo foi possível concluir que os extratos de pólen apícola utilizados têm um potencial para tornarem-se agentes protetores de sementes. Em outro estudo da atividade antimicrobiana (ensaios preliminares) utilizando diferentes flavonóides isolados a partir de extratos de pólen apícola de *Eucalyptus globulus*, *Ranunculus*

sardous e *Ulex europeus*, mostrou-se que os derivados da herbacetina encontrados no pólen de *Ranunculus Sardous* e *Ulex europeus*, têm atividade antibiótica marcada contra *Pseudomonas aeruginosa*. No mesmo estudo, o pólen de *Eucaliptus globulus*, rico em derivados da quercetina, não mostrou nenhuma atividade antibiótica (Campos *et al.*, 1998; Frigerio, 2009).

1.7. Métodos de recolha do pólen apícola

As abelhas obreiras, após a recolha do pólen nas flores, transportam-no nas suas patas traseiras como cargas polínicas (**Figura 2 A**) para a colmeia, onde se poderá instalar um dispositivo denominado de capta-pólen (**Figura 2 B**) que possibilitará a recolha do pólen apícola. Este dispositivo é colocado na entrada de voo e consiste numa grelha cujas aberturas são suficientemente largas para permitir a passagem da abelha, mas suficientemente estreitas para reter parte do pólen das patas das abelhas obreiras em pastoreio de pólen e recolhê-lo num recipiente adequado para o efeito (Casaca, 2010).

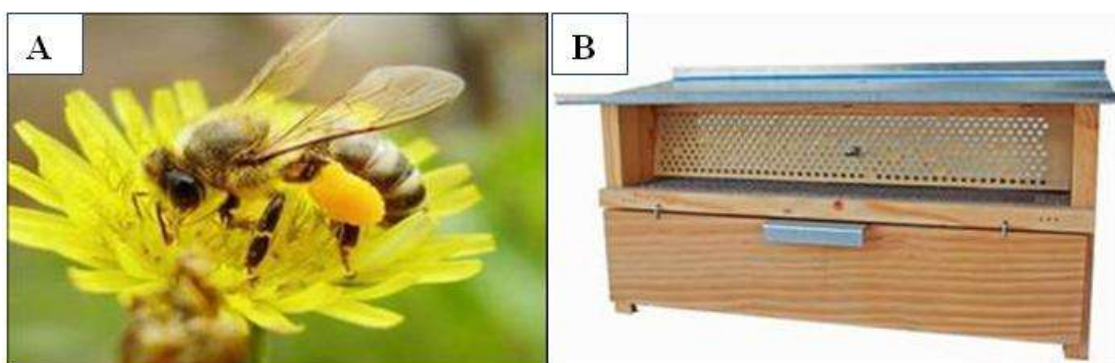


Figura 2 - Abelhas obreiras a colher pólen e com as cargas polínicas nas patas traseiras (**A**) e capta-pólen utilizados para a recolha de pólen apícola (**B**).

[Fonte: **A**) MAFDR, (2016); **B**) <https://drwfxyu78e9uq.cloudfront.net/usercontent/apisfilanis/media/images/5615d98c4dd6cb32d03547ec7d12888f.jpg>. Acessado em Novembro de 2018].

Os capta-pólen utilizados nas colmeias são escolhidos pelos apicultores de acordo com a sua capacidade, facilidade de higienização e custo, podendo ser encontrados em diferentes configurações (**Figura 3**).

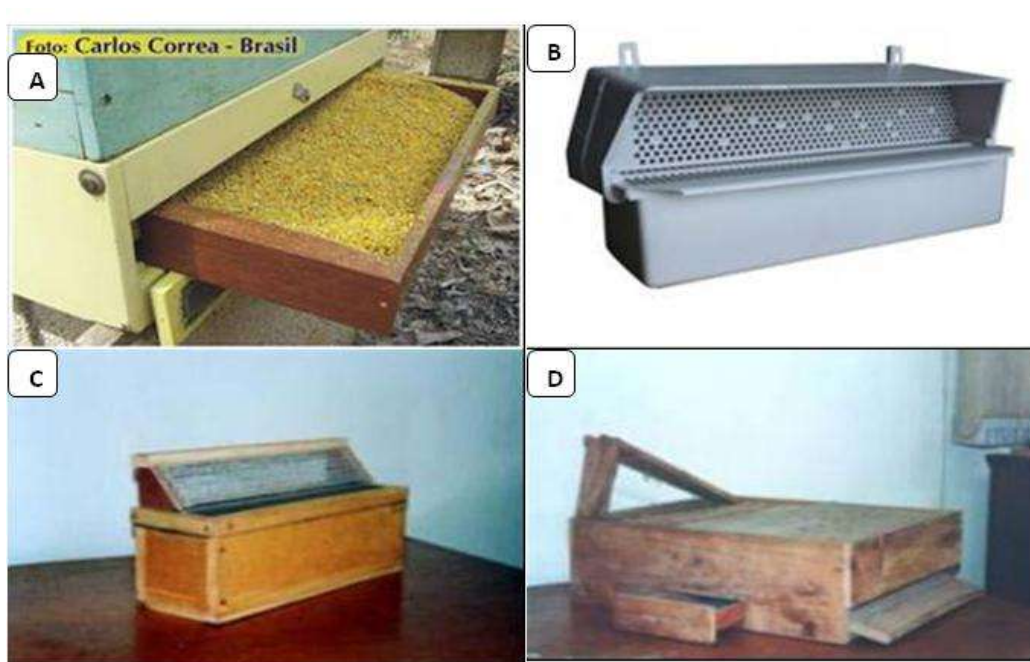


Figura 3 – **A)** Capta pólen com pólen apícola (estrado); **B)** Capta pólen de plástico tipo injetado (frontal); **C)** Capta pólen tipo tropical africanizado baiano (estrado); **D)** Capta pólen tipo intermediário interno (estrado).

[Fonte:**A)** http://2.bp.blogspot.com/_OeMEdSu4fhQ/SgFuFykHk7I/AAAAAAAAABhs/xkKpFy8KToE/s400/capta_polen.jpg. Acessado em Novembro de 2018; **B)** http://www.o-cortico.com/379-large_default/capta-polen-em-plastico.jpg. Acessado em Novembro de 2018; **C)** e **D)**: Hervatin, (2009)].

Existem algumas práticas que devem ser tidas em consideração durante a utilização dos capta-pólen. Assim, estes dispositivos devem ser colocados no período da manhã e retirados no final do dia, podendo a coleta ser realizada diariamente ou dia sim/dia não, dependendo do tipo de capta-pólen a utilizar na colmeia e da estação do ano. Para apiários novos ou antigos em que a atividade de coleta de pólen se implementa pela primeira vez, é também aconselhável a colocação dos capta-pólen nas colmeias com a grelha aberta durante um período de 24 a 48 horas para a adaptação das abelhas com a nova entrada e que se estabeleçam períodos em que se devem e não devem colocar os capta-pólen, fazer a higienização e manter a produtividade das colmeias. Na estação de chuvas é aconselhável retirar os capta-pólen e não recolher o pólen, visto se tratar de um período onde a humidade relativa do ar varia bastante, podendo favorecer o crescimento de microrganismos no pólen que fica nos capta-pólen (Hervatin, 2009; Melo, 2015).

Após a recolha do pólen, é recomendada a limpeza dos capta-pólenes, para além do transporte do pólen fresco em caixas receptoras de pólen, baldes plásticos, caixas plásticas organizadoras retangulares com base larga até a sala de beneficiamento. Segue-se a limpeza de material estranho no pólen (resíduos vegetais, fragmentos de abelhas, própolis, poeiras), congelamento do pólen em bandejas plásticas com 2,5 kg no máximo para evitar o empelotamento do mesmo durante o processo que pode chegar até 2 horas (Lengler, 2007). Durante o processo de recolha nos apiários, o pólen pode apresentar um teor de humidade superior a 18% de humidade. Deste modo, torna-se necessário baixar a humidade para valores que permitam garantir a qualidade do pólen (inferior a 10%), minimizando o crescimento microbiano e consequentes processos de fermentação (Casaca, 2010; Melo *et al.*, 2011; Rocha, 2013).

1.8. Métodos de preservação do pólen apícola

São várias as técnicas utilizadas atualmente para a preservação do pólen apícola, desde as mais remotas e artesanais, até às mais modernas, indicando um amplo espaço a ser desenvolvido nesse segmento da cadeia (Barreto *et al.*, 2006; Ferreira, 2012). Entre as técnicas usadas destacam-se a secagem e a congelação. Importa realçar que, o sucesso destas técnicas de preservação do pólen apícola, dependem do devido controlo e manejo de fatores como: temperatura, humidade relativa do meio ambiente e humidade do pólen (Rocha, 2013).

1.8.1. Secagem do pólen apícola

A secagem é um dos processos mais antigos e mais frequentemente utilizado para a preservação do pólen apícola. Apesar de ser uma técnica que envolve processos de transferência de calor e de massa complexos, a sua utilização prática é bastante simples, uma vez que os equipamentos necessários para a secagem são de fácil operação (Rocha, 2013).

Tal como sucede com outros produtos alimentares, é de extrema importância controlar e inspecionar as etapas de processamento, como é o caso da secagem, bem como o armazenamento e distribuição, de modo a assegurar aos consumidores que o pólen comercializado satisfaz as suas necessidades, mantendo as propriedades nutritivas, organolépticas e a qualidade microbiológica (Campos *et al.*, 2008).

Considera-se ser de extrema importância controlar e inspecionar as etapas de processamento, armazenamento e distribuição, de modo a assegurar aos consumidores todos os nutrientes disponíveis no pólen apícola e, em conformidade com as suas necessidades mantendo as propriedades organolépticas e a qualidade microbiológica (Arruda *et al.*, 2013). Devido à importância nutricional e funcional dos componentes existentes no pólen apícola (Souza *et al.*, 2004).

A secagem do pólen apícola pode ser realizada em secadores que devem possuir preferencialmente bandejas sobrepostas perfuradas, para além de sistemas de controlo de temperatura e de circulação e renovação do ar (Figura 4). A secagem deve possibilitar a redução do teor de humidade até um valor considerado adequado para a preservação do pólen apícola. Este valor não é consensual e podem-se encontrar na literatura referências a valores compreendidos entre os 2,5 e os 6,0%. (Casaca, 2010) ou entre os 4,0 e os 8,0%, no caso da Legislação Argentina (Campos *et al.*, 2008; Caminha, 2014).

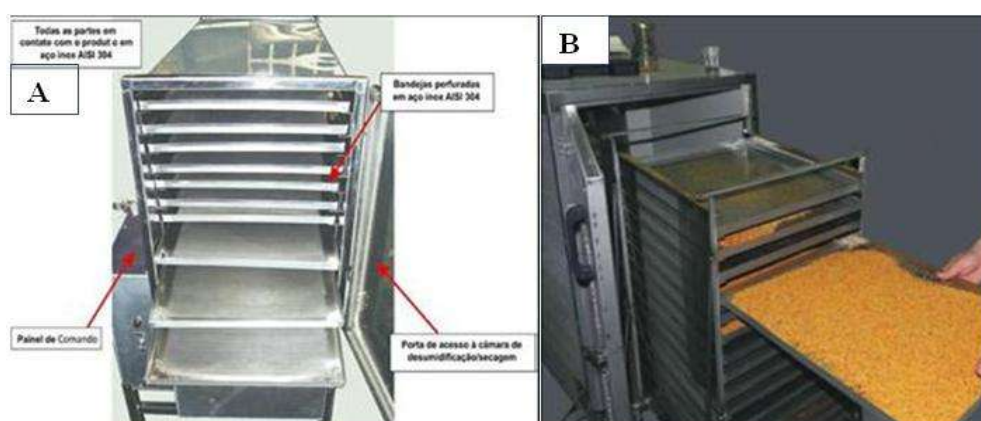


Figura 4 – Secador de pólen apícola

[Fonte: A) Oliveira Jr (2009); B) <http://montedomel.blogspot.pt> e <http://apiariosforte.blogspot.pt>. Acessado em Janeiro de 2019]

1.8.2. Congelação do pólen apícola

Um outro método de preservação do pólen apícola consiste na sua congelação, possibilitando que este se conserve *in natura*. Normalmente, a congelação é usada quando existe a impossibilidade de uma secagem imediata após a colheita do pólen apícola. As reduzidas temperaturas usadas evitam a multiplicação total ou parcial dos microrganismos presentes no pólen apícola após a sua colheita, possibilitando

simultaneamente a manutenção das características físicas e químicas e aumentando o tempo de prateleira do produto. A sua preservação deve ser feita em sacos plásticos a -20°C durante dois dias, colocando-o em bandejas de 2,5kg durante 2 horas, agitando-as para evitar a agregação dos grãos e facilitar a congelação (Casaca, 2010; Rocha, 2013).

1.8.3. Liofilização do pólen apícola

A liofilização do pólen, é um processo de preservação que consiste na passagem do conteúdo em água contido no pólen, do estado sólido (após a congelação) ao estado gasoso, sem passar pelo estado líquido. O processo de congelação deve ser o mais rápido possível, para se formarem microcristais de gelo que não danifiquem a membrana celular do pólen. Se o processo de congelamento for lento, os cristais formados serão grandes e poderão causar danos ao nível da estrutura celular tendo como resultado a perda do líquido citoplasmático e, conseqüentemente, a degradação dos grãos de pólen (Frutal, 2003; Bortolatto e Lora, 2009; Ferreira, 2012).

O processo de liofilização do pólen apícola possibilita a obtenção de um produto esponjoso que permite a sua rápida reconstituição, sem comprometer o sabor e a aparência do produto original. Para além disso, a liofilização apresenta outras vantagens tais como a redução de perdas vitamínicas e de constituintes voláteis, diminuição de desnaturação proteica e maior digestibilidade do pólen apícola.

Já é possível encontrar alguns produtos alimentares liofilizados, tais como pedaços de frutas, vegetais e carnes. No entanto, o custo associado a este método de preservação é relativamente elevado, sendo aplicado com mais frequência em produtos de elevado valor acrescido e que necessitam de uma reidratação rápida e completa. Deste modo, a liofilização não é frequentemente utilizada pelos apicultores como um método de preservação do pólen apícola (Ferreira, 2012).

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS



- 2.1. Amostragem
- 2.2. Análise polínica
- 2.3. Aplicação das metodologias de preservação
- 2.4. Composição química
 - 2.4.1. *Determinação do teor de humidade*
 - 2.4.2. *Determinação do teor em cinza*
 - 2.4.3. *Determinação do teor de gordura bruta*
 - 2.4.4. *Determinação do teor de proteína bruta*
 - 2.4.5. *Determinação do teor de açúcares livres*
 - 2.4.6. *Teor de compostos fenólicos totais*
- 2.5. Avaliação da atividade antioxidante
 - 2.5.1. *DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazina)*
 - 2.5.2. *Poder redutor*
- 2.6. Análise Estatística

2.1. Amostragem

A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito de um projeto de investigação (DivInA) que envolve várias entidades ligadas ao sector da apicultura, nomeadamente apicultores, que foram responsáveis pela recolha e fornecimento das amostras de pólen.

Deste modo, numa fase preliminar do projeto foi avaliada a influência da região de captura na composição química, em amostras de pólen recolhidas em Bragança, Nisa, Vila Real e Portalegre. Foi ainda possível realizar a avaliação da influência do modelo de capta-pólen (capta-pólen frontal vs capta-pólen de estrado) no teor de humidade, utilizando amostras de pólen recolhidas na região de Vila Real e Portalegre, conforme se descreve na **Figura 5**. Após a sua receção, as amostras foram preservadas a -18°C até à sua respetiva avaliação.

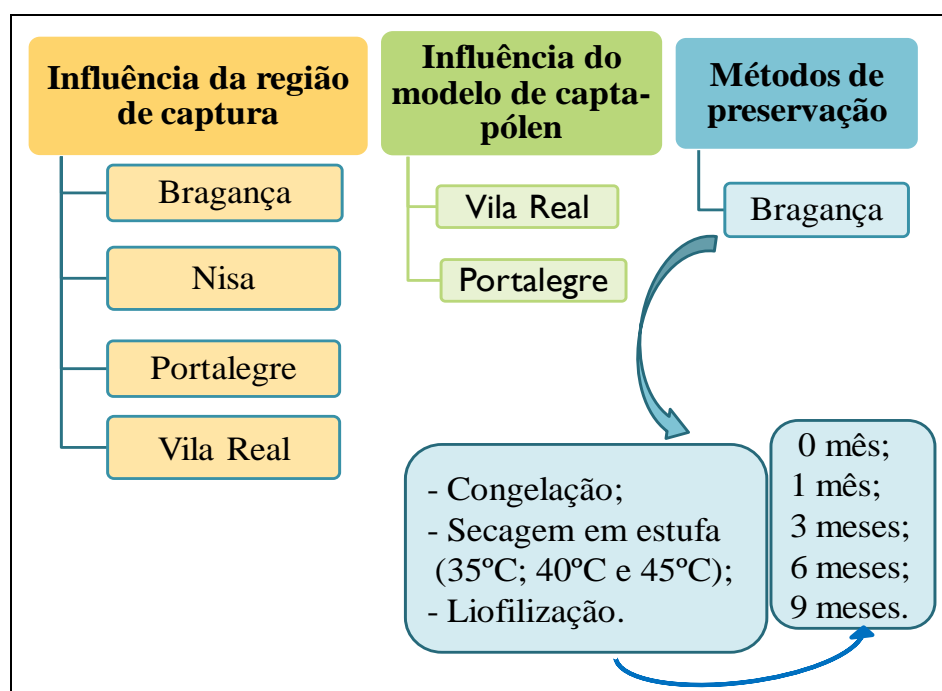


Figura 5 – Origem das amostras de pólen apícola usadas nas várias partes do trabalho.

Posteriormente, utilizando amostras recolhidas em Bragança, foi realizado o trabalho relacionado com o principal objetivo desta dissertação de mestrado, ou seja, o estudo do efeito da aplicação de diferentes métodos de preservação nas características químicas do pólen (**Figura 5**). A escolha desta localização está essencialmente relacionada com questões de ordem prática, neste caso, na capacidade dos parceiros deste projeto fornecerem a quantidade de pólen necessário para a realização das várias

análises. Depois de rececionadas, as amostras de pólen foram preservadas a -18°C até serem processadas através da aplicação das metodologias de preservação em estudo: secagem em estufa a 35°C (SEC35), 40°C (SEC40), 45°C (SEC45) e liofilização. As amostras de pólen do presente estudo, foram recolhidas ao longo de um total de 13 semanas, compreendidas entre os meses de Maio, Junho, Julho e Agosto de 2018.

2.2. Análise polínica

A análise foi feita em triplicado, dissolvendo-se 10 g de pólen apícola em água destilada e centrifugada a 4300 rpm (3373g), durante 10 minutos. O sedimento obtido foi novamente dissolvido em água destilada e centrifugado durante 5 minutos. A análise qualitativa foi realizada com duas alíquotas de 100 μL do sedimento, sendo utilizado um mínimo de 800 grãos de pólen apícola, que foram contados e identificados por microscopia (Nikon Optiphot II) com uma ampliação de 400x, ou 1000x, quando necessário. Para a análise quantitativa, foi utilizada uma alíquota de sedimento de 10 μL (volume final de 2 ml) e a quantidade de grãos de pólen nas alíquotas foi quantificada por microscopia, com uma ampliação de 400x. A análise polínica foi realizada em colaboração com o Laboratório Apícola – LabApis – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal.

2.3. Metodologias de preservação

Após a receção do pólen e preservação a -18°C , as amostras foram separadas e submetidas a diferentes técnicas de preservação, nomeadamente a liofilização, congelação e secagem em estufa com temperaturas de 35°C , 40°C e 45°C (SEC35, SEC40 e SEC45, respetivamente).

A congelação foi feita numa arca vertical (LIEBHERR Comfort NoFrost) a -20°C , sendo as amostras de pólen retiradas para análise nos tempos de avaliação correspondentes a 0 meses, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 9 meses de armazenamento.

A secagem foi feita em estufa (**Figura 6A**) com convexão forçada sem controlo de humidade, em bandejas de cartolina de papel, até as amostras atingirem um teor de humidade de aproximadamente 10%. Assim, a amostra SEC35, obedeceu a um tempo total de 15 horas de secagem, a amostra seca a SEC40, obedeceu 7 horas e 30 minutos e

a amostra seca a SEC45, fez 5 horas e 50 minutos de secagem. A liofilização foi feita num liofilizador (Zirbus LYOPHILIZERS VACO 10-II-D) com uma pressão de 0,200 mbar, durante 96 horas.

Após a aplicação de cada uma das técnicas de preservação sob estudo, o pólen foi guardado em porta-amostras, devidamente identificados, correspondentes às diferentes técnicas de preservação aplicadas e tempos de armazenamento avaliados, para posterior caracterização da composição química, descrita na seção 2.4 e avaliação da atividade antioxidante, tal como descrito na seção 2.5 ao longo do tempo (0 mês, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 9 meses).

2.4. Composição química

As várias amostras de pólen utilizadas durante esta dissertação foram caracterizadas quimicamente utilizando as metodologias descritas de seguida. No caso das amostras preservadas através das técnicas descritas na seção 2.3, a avaliação da composição química foi realizada após a aplicação das várias metodologias de preservação, bem como após 1 mês, 3 meses, 6 meses e 9 meses da aplicação dessa mesma técnica de preservação. Assim, foram realizadas análises para a determinação do respetivo teor de humidade, cinza, proteína e gordura bruta. Para além destes parâmetros nutricionais, procedeu-se ainda à determinação do teor de compostos fenólicos totais e perfil de açúcares.

2.4.1. Determinação do teor de humidade

A determinação do teor de humidade foi feita segundo o método de [Almeida-Muradian et al., \(2012\)](#), através de secagem em estufa à temperatura de 105°C durante 90 minutos, utilizando-se o equipamento da marca *Memmert Basic UNB 100-500* (**Figura 6B**), com convexão forçada sem controlo de humidade. Para tal, para cada amostra analisada, foram deixados na estufa, de um dia para o outro, 3 cadinhos à temperatura de 105°C para eliminar qualquer vestígio de humidade. Após o seu arrefecimento em exsiccador, os cadinhos foram pesados (MC), tendo-se adicionado cerca de 2 g de pólen apícola moído e homogeneizado (MA). Posteriormente, os cadinhos foram colocados na estufa à temperatura de 105°C, durante 90 minutos. Os

cadinhos foram deixados 30 minutos em exsiccador para arrefecer e pesados até peso constante para determinar o remanescente de peso final da amostra (MS). O teor de humidade foi calculado em termos de percentagem de humidade (%) de acordo com a seguinte equação:

$$\%humidade = \left(\frac{MC + MA - MS}{MA} \right) * 100$$

Equação nº 1

onde:

MC = massa do cadinho;

MS = massa do conjunto (cadinho + amostra após secagem);

MA = massa da amostra.

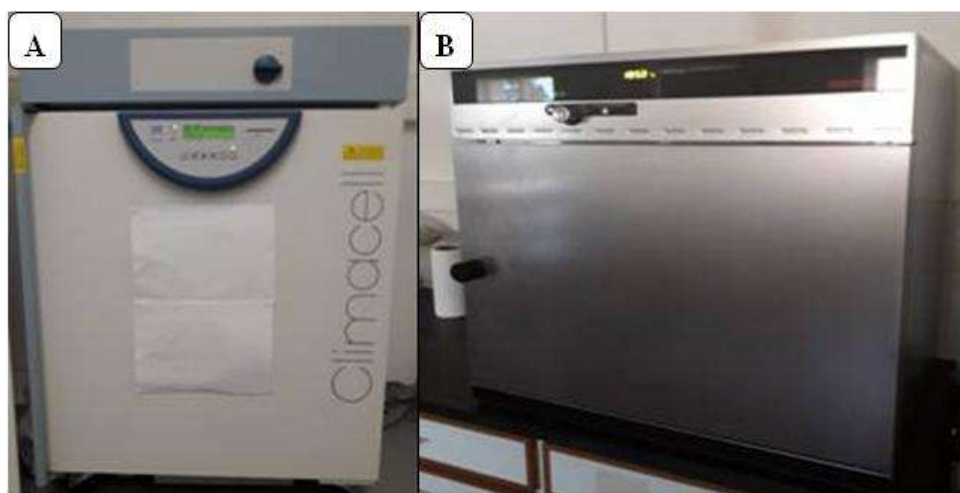


Figura 6 – **A.** Estufa Climacell (MMM Group, modelo CLC-B2V-M/CLC111-TV)
B. Estufa Memmert Basic UNB 100-500

2.4.2. Determinação do teor em cinzas

O teor em cinzas foi determinado em base seca (primeiramente determinou-se o teor de humidade e a mesma amostra seca a 105°C, utilizou-se para determinar o teor em cinzas) por incineração em mufla, utilizando-se o equipamento de marca *Lenton Thermal designs LTD* e a metodologia proposta por [Almeida-Muradian et al., \(2012\)](#). Esta avaliação obedeceu a descrição da seção 2.4.1, uma vez que a amostra utilizada

para a determinação do teor de humidade, também serviu para determinar o teor em cinzas. A massa do cadinho (MC) e a massa da amostra (MA), é a mesma utilizada para calcular o teor de humidade. Posteriormente, os cadinhos foram colocados na mufla à temperatura de 550°C, durante 8 horas de incineração. Após saírem da mufla, os cadinhos foram deixados em exsiccador para arrefecer e pesados até peso constante para determinar o remanescente de peso final da amostra (MS) (**Figura 7**), sendo os resultados calculados em % de base seca pela seguinte equação:

$$\%cinzas = \left(\frac{MS - MC}{MA} \right) * 100$$

Equação nº 2

onde:

MS = massa do conjunto (cadinho + resíduo);

MC = massa do cadinho;

MA = massa da amostra.



Figura 7 – Amostras de pólen apícola, após incineração em mufla a 550°C

2.4.3. Determinação do teor de gordura bruta

O teor de gordura bruta foi determinado após extração em Soxhlet (modelo Behr Labor - Technik) (**Figura 8**), utilizando-se a metodologia proposta por [Almeida-Muradian et al., \(2012\)](#).



Figura 8 – Extrator de Soxhlet, extraíndo gordura em amostras de pólen apícola

Inicialmente, pesaram-se cerca de 2 g de amostra de pólen apícola (MA) em cartuchos de filtro de papel, com um pouco de algodão dentro dos cartuchos. Posteriormente, os cartuchos foram colocados nos extratores do Soxhlet, tendo-se procedido à extração da gordura durante 8 horas, utilizando o éter de petróleo como solvente. Após a extração, o balão de extração foi levado à secura em evaporador rotativo (Heidolph) (**Figura 9**). O balão, contendo o material extraído, foi pesado (ME) (**Figura 10**), e o teor de gordura bruta, expresso em termos de % (base húmida), calculado pela seguinte equação:

$$\%gordura = \left(\frac{ME - MB}{MA} \right) * 100$$

Equação nº 3

onde:

ME = massa do conjunto (balão + resíduo após extração);

MB = massa do balão volumétrico;

MA = massa da amostra.

Os valores assim obtidos foram posteriormente convertidos a % (base seca), tendo em consideração o teor de humidade médio das amostras.



Figura 9 - Evaporador rotativo a vácuo (Heidolph)



Figura 10 - Balança (BEL engineering)

2.4.4. Determinação do teor de proteína bruta

O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando-se 6,25 como fator de conversão, para transformação do teor de nitrogénio total em teor total de proteínas, de acordo com a metodologia proposta por [Almeida-Muradian et al., 2012](#).

Pesou-se aproximadamente 0,2 g de amostra de pólen apícola para os tubos de digestão. Em seguida adicionaram-se 2 pastilhas de catalisador metálico ((Cu) 9% em $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 15 mL de ácido sulfúrico puro, colocando-se o bloco digestor a 400°C durante 70 minutos, e aguardando pelo aparecimento da coloração verde (**Figura 11A**),

que indica o final da reação de oxidação. Após a digestão, os tubos foram arrefecidos e colocados no destilador de azoto (**Figura 11B**), tendo-se diluído a amostra com água destilada e neutralizado o excesso de ácido sulfúrico com hidróxido de sódio a 40% (m/v). De seguida, amoníaco (NH₃) formado foi destilado e recolhido num erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico a 0,5% (v/v), com indicador misto verde de bromocresol e vermelho de metilo. Finalmente, a solução obtida foi titulada com uma solução de HCl 0,5 M até atingir o ponto de viragem, identificado pela passagem da coloração azul para rosa.

O teor de proteína bruta (expresso em base húmida) foi calculado pela **equação nº 4** e os resultados expressos em percentagem de proteína (%):

$$\text{Teor de Proteína (\%)} = \text{Teor de azoto (\%)} \times 6,25$$

Equação nº 4

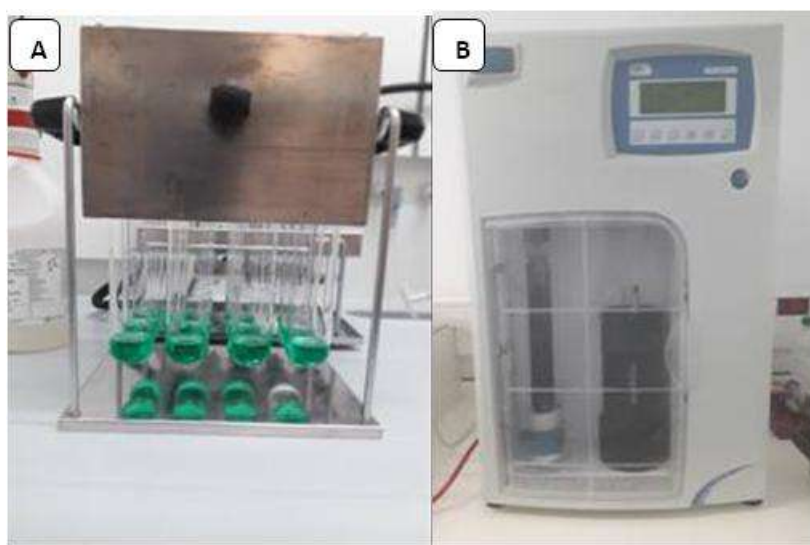


Figura 11 – A. Reação de oxidação da amostra em tubos de digestão. B. Micro-Kjeldahl de extração de proteínas

Os valores assim obtidos foram posteriormente convertidos a % (base seca), tendo em consideração o teor de humidade médio das amostras.

2.4.5. Determinação de açúcares livres

A quantificação de açúcares livres foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI). Inicialmente

procedeu-se a uma diluição, pesando-se aproximadamente 2 g de amostra de pólen apícola e adicionando-se 30 mL de água desionizada, sob agitação durante 30 minutos. Em seguida, filtrou-se a mistura com papel de filtro para um balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se 12,5 mL de metanol e aferindo-se o volume final com água desionizada. Posteriormente filtrou-se com filtros millipore (0,2 µm) para vials de 2 mL, tendo-se injetado um volume de 20 µL num cromatógrafo integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer) operando a 35°C (forno Grace 7971 R). Como fase móvel utilizou-se uma mistura de acetonitrilo/água 80:20 (v/v), com um caudal de 1,3 mL/min. A identificação dos açúcares foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões, nomeadamente frutose, glucose e sacarose. As diferentes retas de calibração foram construídas pelo método do padrão externo, utilizando-se uma gama de concentrações de 0,375 a 40 mg/mL, tendo-se obtido as seguintes equações e coeficientes de correlação: $y=89,964x-109,73$ e $R^2 = 0,991$; $y=100,87x-136,02$ e $R^2 = 0,995$; $y=69,035x-0,0126$ e $R^2 = 0,97$, para a frutose, sacarose e glucose, respetivamente. Os valores assim obtidos foram posteriormente convertidos a % (base seca), tendo em consideração o teor de humidade médio das amostras.

2.4.6. Teor de compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais foi necessário realizar uma extração prévia destes compostos presentes no pólen apícola. Para a extração, utilizou-se uma amostra homogénea de pólen, posteriormente diluída numa solução aquosa de etanol a 80% (v/v), mantida sob agitação à temperatura ambiente (**Figura 12**), durante 12 horas (6h + 6h). Após cada um dos períodos de extração, a mistura foi filtrada nas mesmas condições, tendo-se combinado os dois extratos filtrados, que foram posteriormente concentrados em evaporador rotativo (**Figura 9**) a 40°C, liofilizados e conservados no exsicador até análise posterior, conforme descrito na metodologia de [Ferreira et al., \(2009\)](#).



Figura 12 – Placa de agitação (Selecta Multimatic-9N, Espanha)

A avaliação do conteúdo em compostos fenólicos totais nas amostras de pólen apícola, foi efetuada segundo o método descrito por [Singleton, \(1965\)](#). A uma alíquota (0,5 mL) de extrato etanólico (1 mg de extrato seco/mL etanol) foi adicionado 0,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio e ajustou-se o volume final para 5 mL com água desionizada. A solução foi depois aquecida durante 10 min a 70°C, recolhendo-se posteriormente para o escuro durante 30 minutos. No final mediu-se a absorvância a 760 nm num espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando 0,5 mL de etanol a 80% em detrimento da amostra. Os resultados finais foram expressos em equivalentes de ácido gálico, efetuando-se para isso uma reta de calibração com diferentes concentrações deste padrão, no intervalo de 0,03 a 0,5 mg/mL ($y=9,8463x+0,0718$; $R^2 =0,992$). Os ensaios foram feitos em triplicado.

2.5. Atividade antioxidante

2.5.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Com base na metodologia descrita por [Ferreira *et al.*, \(2009\)](#), foi possível avaliar, em triplicado, a capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Para o efeito, foram pipetados numa placa de 96 poços, diferentes concentrações de EtOH 80% + os extratos etanólicos da amostra (liofilizada, secagem

em estufa a SEC35, SEC40, SEC45 e congelada), com diferentes concentrações + 150 µL da solução metanólica contendo os radicais de DPPH.

As placas foram guardadas no escuro por 45 minutos à temperatura ambiente, tendo a redução da concentração do radical de DPPH sido monitorizada através do registo do decréscimo da absorvância a 515 nm num leitor de microplacas (**Figura 13B**). O efeito bloqueador de radicais de DPPH, foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(Abs_{DPPH} - Abs_{Amostra}) / Abs_{DPPH}] \times 100$$

Equação nº 5

onde:

Abs_{DPPH}: absorvância inicial da solução de DPPH;

Abs_{Amostra}: absorvância da solução com o extrato da amostra.

O efeito bloqueador de radicais livres DPPH foi expresso através do cálculo do valor de EC₅₀, que corresponde à concentração de extrato de amostra que fornece um efeito bloqueador de 50%, conforme [Falcão et al., \(2010\)](#).

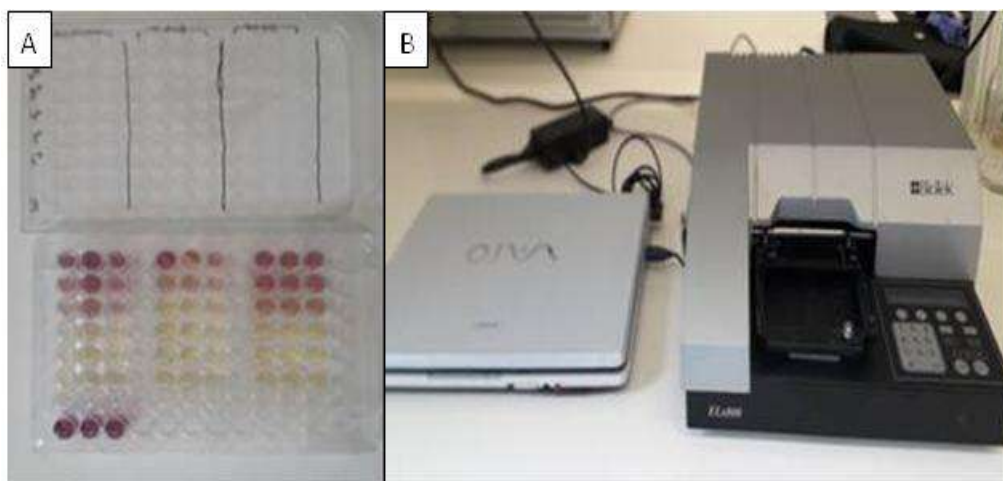


Figura 13 – A. Micro placa de 96 poços preparada para leitura; B. Leitor de microplacas ELX800 Microplate Reader Bio-Tek

2.5.2. Poder redutor

O poder redutor foi determinado, utilizando o material liofilizado obtido após o processo de extração de compostos fenólicos, descrito anteriormente na seção 2.4.6. Para cada amostra a analisar, pesaram-se, em triplicado, 0,0167g do extrato para um balão volumétrico de 50 mL, tendo-se posteriormente aferido com uma solução aquosa de etanol a 80% (v/v). De seguida, pipetaram-se 250 μL da amostra para um tubo de ensaio, tendo-se adicionado 1000 μL de uma solução aquosa de etanol a 80% (v/v), 1250 μL de tampão fosfato com pH 6,6 e 1250 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Procedeu-se à agitação vigorosa dos tubos de ensaio que foram colocados num banho de água à temperatura de 50°C, durante 20 min, com uma agitação de 100 rpm. Após o banho, adicionou-se 1250 μL de ácido tricloroacético (10%) e seguidamente centrifugou-se a 300 rpm durante 10 min. Posteriormente, removeu-se 1250 μL do sobrenadante para outro tubo de ensaio, adicionando-se 1250 μL de H_2O destilada e 250 μL de FeCl_3 (0,1%). Fez-se a leitura da absorvância a 700 nm num espectrofotómetro (Analytik Jena, SPECORD 200, Alemanha (**Figura 14**)).



Figura 14 – Espectrofotómetro (Analytik Jena, SPECORD 200, Alemanha)

2.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada mediante a utilização do programa estatístico SPSS, versão 23. As diferenças entre amostras foram avaliadas através do teste *one-way* ANOVA de múltipla comparação, seguido pelo *post-test* de Tukey, para um nível de significância de $p = 0,05$. Nas tabelas apresentadas, na mesma linha, valores assinalados com letras diferentes indicam diferenças significativas, para um determinado parâmetro analisado, entre as técnicas de preservação estudadas ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO



3.1. Caracterização das amostras de pólen

3.1.1. *Análise polínica*

3.1.2. *Teor de humidade*

3.1.3. *Método de captura*

3.2. Impacto dos métodos de preservação

3.2.1. *Composição química e atividade antioxidante imediatamente após aplicação dos diferentes métodos de preservação*

3.2.2. *Composição química e atividade antioxidante ao longo do armazenamento*

Os resultados obtidos nesta investigação sobretudo os relacionados com a composição química, são apresentados e discutidos, comparando-os com os resultados de outros autores que anteriormente fizeram estudos similares com o pólen apícola.

3.1. Caracterização das amostras de pólen

3.1.1. Análise polínica

A análise polínica possibilita uma caracterização detalhada dos produtos apícolas, como é o caso do pólen apícola, do pão de abelha e do mel. No caso particular do pólen, é possível perceber os diversos tipos polínicos, a respetiva origem vegetal e a frequência com que aparecem.

Ao longo deste estudo foram recolhidas amostras de pólen de diferentes regiões de Portugal, nomeadamente Nisa, Vila Real, Portalegre e Bragança, cuja caracterização polínica é apresentada nas Tabelas IV, V, VI e VII, respetivamente.

Tabela IV – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Nisa.

FAMÍLIA VEGETAL	TIPO POLÍNICO	%
ACERACEAE	<i>Acer</i>	0,31
ADOCACEAE	<i>Viburnum</i>	0,06
APIACEAE	Tipo <i>Oenanthe crocata</i>	1,11
APIACEAE	Tipo <i>Smyrniolum olusatrum</i>	0,02
APIACEAE	Tipo <i>Thapsia vilosa</i>	0,12
AQUIFOLIACEAE	<i>Illex</i>	0,52
ASTERACEAE	<i>Galactites tomentosa</i>	1,32
ASTERACEAE	Tipo <i>Anthemis arvenses</i>	0,06
ASTERACEAE	Tipo <i>Calendula arvenses</i>	2,19
ASTERACEAE	Tipo <i>Crepis capillaris</i>	3,73 (I)
BORAGINACEAE	<i>Borago officinalis</i>	0,01
BORAGINACEAE	<i>Echium</i> sp.	14,64 (I)
BRASSICACEAE	Tipo <i>Raphanus raphanistrum</i>	0,15
CAMPANULACEAE	<i>Jasione montana</i>	2,92
CARYOPHYLLACEAE	<i>Silene</i>	0,03
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	5,65 (I)
CISTACEAE	<i>Cistus salviifolius</i>	1,18
CISTACEAE	<i>Cistus</i> sp.	1,23
CISTACEAE	<i>Halimium</i> sp.	1,82
CRASSULACEAE	<i>Sedum</i> sp.	1,84
CURCUBITACEAE	<i>Bryonia dioica</i>	0,02
CYPERACEAE	Cyperaceae	0,04

Tabela IV (cont.) - Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de

DIPSACACEAE	<i>Scabiosa atropurpurea</i>	0,01
ERICACEAE	<i>Erica</i> sp.	3,74 (I)
FABACEAE	<i>Dorycnium</i>	0,03
FABACEAE	<i>Hymnocarpus lotoides</i>	0,52
FABACEAE	<i>Lotus</i> sp.	0,06
FABACEAE	<i>Lupinus</i> sp.	0,05
FABACEAE	<i>Ononis</i> sp.	1,91
FABACEAE	Tipo <i>Ornithopus</i> sp.	0,01
FABACEAE	Tipo <i>Cytisus striatus</i>	7,35 (I)
FABACEAE	<i>Trifolium</i> sp.	0,62
FAGACEAE	<i>Quercus</i> sp.	9,77 (I)
HIPPOCASTANEACEAE	<i>Aesculus hippocastanum</i>	0,01
LAMIACEAE	<i>Lavandula</i> sp.	0,40
LILIACEAE	Liliaceae	0,25
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i> sp.	1,91
OLEACEAE	<i>Olea europaea</i>	14,97 (I)
PAPAVERACEAE	Papaveraceae	0,63
PAPAVERACEAE	<i>Chelidonium majus</i>	0,40
PLANTAGINACEAE	<i>Anarrhinum bellidifolium</i>	0,02
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i> sp.	0,03
POACEAE	Poaceae	0,09
POLYGONACEAE	Tipo <i>Rumex acetosa</i>	0,32
RESEDACEAE	<i>Sesamoides</i> sp. ou <i>Reseda</i> sp.	7,26 (I)
RHAMNACEAE	<i>Rhamnus alaternus</i>	0,02
ROSACEAE	Rosaceae	2,92
ROSACEAE	<i>Cotoneaster</i>	0,47
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i>	0,15
ROSACEAE	<i>Prunus</i> sp.	0,01
ROSACEAE	<i>Rubus</i> sp.	2,46
RUTACEAE	<i>Citrus</i> sp.	0,01
SALICACEAE	<i>Salix</i> sp.	0,67
SIMAROUBACEAE	<i>Ailanthus altissima</i>	0,01
VITACEAE	<i>Vitis vinifera</i>	2,67
Outros		1,24
TOTAL		100

NOTA: **D** – pólen dominante (> 45%); **S** – pólen secundário (16 – 45%); **I** – pólen minoritário importante (3 – 15%); **M** – pólen minoritário (< 3%).

Os resultados da análise polínica da amostra recolhida na região de Nisa (**Tabela IV**), mostraram a presença de um total de 34 famílias vegetais e tipo polínico diferenciado. O pólen recolhido, pertence ao grupo de famílias vegetais predominantes nesta região e que produzem pouco pólen. A amostra de pólen analisada não possui

nenhum pólen dominante ou secundário, tendo sido identificados diversos pólenes minoritários importantes, nomeadamente Oleaceae (*Olea europaea*) com 14,97%, Boraginaceae (*Echium sp.*) com 14,64%, Fragaceae (*Quercus sp.*) com 9,77%, Fabaceae (Tipo *Cytisus striatus*) com 7,35%, Resedaceae (*Sesamoides sp.* ou *Reseda sp.*) com 7,26%, Cristaceae (*Cistus ladanifer*) com 5,65%, Ericaceae (*Erica sp.*) com 3,74% e Asteraceae (Tipo *Crepis capillaris*) com 3,73%.

Para a amostra recolhida na região de Vila Real (**Tabela V**), os resultados mostraram um total de 35 famílias vegetais, evidenciando a predominância dos tipos polínicos das seguintes famílias: Rosaceae (*Rubus sp.*) com 16,85%, Fagaceae (*Castanea sativa*) com 16,29%, Fagaceae (*Quercus sp.*) com 7,21%, Asteraceae (Tipo *Crepis capillaris*) com 5,87%, Resedaceae (*Sesamoides sp.* ou *Reseda sp.*) com 5,35%, Boraginaceae (*Echium sp.*) com 5,27% e Ericaceae (*Erica sp.*) com 4,34%, Salicaceae (*Salix sp.*) com 4,16%, Myrtaceae (*Eucaliptus sp.*) com 3,28%, Fabaceae (Tipo *Cytisus striatus*) com 3,23% e Rosaceae (*Rosaceae*) com 3,10%.

Tabela V – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Vila Real.

FAMÍLIA VEGETAL	TIPO POLÍNICO	%
ACERACEAE	<i>Acer</i>	0,64
ADOCACEAE	<i>Viburnum</i>	0,05
APIACEAE	<i>Eryngium</i>	0,03
APIACEAE	Tipo <i>Oenanthe crocata</i>	0,57
APIACEAE	Tipo <i>Smyrniolum olusatrum</i>	0,02
APIACEAE	Tipo <i>Thapsia vilosa</i>	0,04
AQUIFOLIACEAE	<i>Ilex</i>	1,18
ASTERACEAE	<i>Centaurea sp.</i>	0,01
ASTERACEAE	<i>Galactites tomentosa</i>	0,03
ASTERACEAE	Tipo <i>Anthemis arvenses</i>	0,07
ASTERACEAE	Tipo <i>Crepis capillaris</i>	5,87 (I)
BORAGINACEAE	<i>Borago officinalis</i>	0,01
BORAGINACEAE	<i>Echium sp.</i>	5,27 (I)
BRASSICACEAE	Tipo <i>Raphanus raphanistrum</i>	0,57
CAMPANULACEAE	<i>Jasione montana</i>	0,62
CARYOPHILLACEAE	<i>Silene</i>	0,03
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	0,06
CISTACEAE	<i>Cistus salviifolius</i>	0,93
CISTACEAE	<i>Cistus sp.</i>	0,80
CISTACEAE	<i>Halimium sp.</i>	0,07
CONVOLVULACEAE	Convolvulaceae	0,10
CRASSULACEAE	<i>Sedum sp.</i>	2,44

Tabela V (cont.) - Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Vila

CURCUBITACEAE	<i>Bryonia dioica</i>	0,07
ERICACEAE	<i>Erica</i> sp.	4,34 (I)
FABACEAE	<i>Lupinus</i> sp.	0,14
FABACEAE	<i>Robinia</i>	0,10
FABACEAE	Tipo <i>Ornithopus</i> sp.	0,03
FABACEAE	Tipo <i>Cytisus striatus</i>	3,23 (I)
FABACEAE	<i>Trifolium</i> sp.	0,71
FABACEAE	<i>Vicia</i> sp.	0,03
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	16,29 (S)
FAGACEAE	<i>Quercus</i> sp.	7,21 (I)
HIPPOCASTANEACEAE	<i>Aesculus hippocastanum</i>	0,01
LAMIACEAE	<i>Thymus</i> sp.	0,01
LILIACEAE	LILIACEAE	0,13
MALVACEAE	<i>Tilia</i> sp.	0,03
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i> sp.	3,28 (I)
MYRTACEAE	<i>Myrtus communis</i>	0,43
OLEACEAE	<i>Ligustrum</i>	0,15
OLEACEAE	<i>Olea europaea</i>	0,90
PAPAVERACEAE	PAPAVERACEAE	1,07
PAPAVERACEAE	<i>Chelidonium majus</i>	1,10
PINACEAE	PINACEAE	0,01
PLANTAGINACEAE	<i>Linaria</i> sp.	0,01
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i> sp.	1,18
POACEAE	POACEAE	0,12
POACEAE	<i>Zea mays</i>	0,01
POLYGONACEAE	Tipo <i>Rumex acetosa</i>	0,10
RESEDACEAE	<i>Sesamoides</i> sp. ou <i>Reseda</i> sp.	5,35 (I)
RHAMNACEAE	<i>Frangula alnus</i>	0,01
ROSACEAE	ROSACEAE	3,10 (I)
ROSACEAE	<i>Cotoneaster</i>	0,43
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i>	1,00
ROSACEAE	<i>Prunus</i> sp.	0,05
ROSACEAE	<i>Rubus</i> sp.	16,85 (S)
RUTACEAE	<i>Citrus</i> sp.	0,01
SALICACEAE	<i>Salix</i> sp.	4,16 (I)
SCROPHULARIACEAE	Tipo <i>Scrophularia canina</i>	2,18
VITACEAE	<i>Vitis vinífera</i>	2,68
Outros		4,11 (I)
TOTAL		100

NOTA: **D** – pólen dominante (> 45%); **S** – pólen secundário (16 – 45%); **I** – pólen minoritário importante (3 – 15%); **M** – pólen minoritário (< 3%).

A amostra recolhida em Portalegre (**Tabela VI**), apresentou um total de 16 famílias vegetais, tendo a maior predominância para os seguintes tipos polínicos: Boraginaceae (*Echium sp.*) classificado como dominante (D) com um total de 60,68% e a Rosaceae (*Rubus sp.*) como secundário (S), tendo um total de 24,89% e a Oleaceae (*Olea europaea*) com 3,59%, classificado como minoritário importante (I) (Tomás, 2013; Rocha, 2013).

Tabela VI – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Portalegre

FAMÍLIA VEGETAL	TIPO POLÍNICO	%
ASTERACEAE	<i>Galactites tomentosa</i>	0,87
ASTERACEAE	Tipo <i>Anthemis arvenses</i>	0,03
ASTERACEAE	Tipo <i>Crepis capillaris</i>	0,25
BORAGINACEAE	<i>Borago officinalis</i>	0,03
BORAGINACEAE	<i>Echium sp.</i>	60,68 (D)
CAMPANULACEAE	<i>Jasione montana</i>	0,77
CISTACEAE	<i>Cistus sp.</i>	2,69
CISTACEAE	<i>Halimium sp.</i>	1,76
CURCUBITACEAE	<i>Bryonia dioica</i>	0,03
FABACEAE	<i>Trifolium sp.</i>	0,59
LILIACEAE	LILIACEAE	0,12
MALVACEAE	<i>Tilia sp.</i>	0,06
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus sp.</i>	0,68
MYRTACEAE	<i>Myrtus communis</i>	0,25
OLEACEAE	<i>Olea europaea</i>	3,59 (I)
PAPAVERACEAE	PAPAVERACEAE	0,09
POACEAE	POACEAE	0,03
RESEDACEAE	<i>Sesamoides sp. ou Reseda sp.</i>	0,59
ROSACEAE	<i>Rubus sp.</i>	24,89 (S)
SCROPHULARIACEAE	Tipo <i>Scrophularia canina</i>	0,59
VITACEAE	<i>Vitis vinífera</i>	0,22
Outros		1,18
TOTAL		100

NOTA: **D** – pólen dominante (> 45%); **S** – pólen secundário (16 – 45%); **I** – pólen minoritário importante (3 – 15%); **M** – pólen minoritário (< 3%).

A análise polínica das amostras de pólen recolhidas em Bragança (**Tabela VII**), evidenciou a presença de um total de 12 famílias vegetais, tais como a Fagaceae (*Castanea sativa*) a predominante, com um valor percentual total de 70,69% e 27,07% para a Rosaceae (*Rubus sp.*), como o tipo polínico secundário. Resultados similares foram obtidos por Pires *et al.*, (2005), que confirmam existir na região de Trás-os-

Montes a predominância das seguintes famílias botânicas: *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Fagaceae*, *Boraginaceae*, *Labiatae* e *Ericaceae*.

O resultado obtido da análise polínica está de acordo com os períodos de floração de algumas espécies (*Fagaceae*, *Boraginaceae* e *Rosaceae*) abundantes na região transmontana, nos meses de Junho e Julho, respetivamente (Caminha, 2014 e Azevedo *et al.*, 2010).

Tabela VII – Caracterização polínica da amostra de pólen apícola de Bragança

FAMÍLIA VEGETAL	TIPO POLÍNICO	%
APIACEAE	Tipo <i>Eringyium</i>	0,12
ASTERACEAE	<i>Centaurea</i> sp.	0,35
BORAGINACEAE	<i>Echium</i> sp.	0,24
CISTACEAE	<i>Cistus</i> sp.	0,12
CRASSULACEAE	<i>Sedum</i> sp.	0,12
CURCUBITACEAE	<i>Bryonia dioica</i>	0,35
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	70,69 (D)
PAPAVERACEAE	<i>Papaveraceae</i>	0,12
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i> sp.	0,12
RESEDACEAE	<i>Sesamoides</i> sp. ou <i>Reseda</i> sp.	0,47
ROSACEAE	<i>Rubus</i> sp.	27,07 (S)
THYMELAEACEAE	<i>Daphne gnidium</i>	0,12
Outros		0,12
TOTAL		100

NOTA: **D** – pólen predominante (> 45%); **S** – pólen secundário (16 – 45%); **I** – pólen minoritário importante (3 – 15%); **M** – pólen minoritário (< 3%).

A análise das amostras de pólen evidenciou diferenças ao nível da sua composição polínica para as amostras recolhidas em Trás-os-Montes (Bragança e Vila Real) e Alentejo (Nisa e Portalegre), possivelmente relacionadas com as condições agroecológicas da região, genética da espécie vegetal e a idade da planta (Luz *et al.*, 2010; Rocha, 2013; Carpes *et al.*, 2013). No entanto, foi possível verificar alguma semelhança polínica entre as amostras recolhidas na mesma região: Bragança e Vila Real (Trás-os-Montes); Nisa e Portalegre (Alentejo). De facto, os pólenes recolhidos na região transmontana (Bragança e Vila Real) apresentam semelhanças nos principais tipos polínicos identificados (*Castanea sativa*, *Rubus* sp., *Sesamoides* sp. ou *Reseda* sp. e *Echium* sp.). Observou-se a mesma semelhança para o pólen recolhido na região do Alentejo (Nisa e Portalegre), com alguma presença dos principais tipos polínicos (*Echium* sp., *Rubus* sp., *Olea europaea* e *Cistus* sp.). Ambas as regiões (Alentejo e Trás-

os-Montes) têm os tipos polínicos minoritários da mesma espécie vegetal. Resultados similares foram reportados por Pires *et al.*, (2005), Morais *et al.*, (2011) e Féas *et al.*, (2012), que registaram a predominância das famílias *Leguminosae*, *Fagaceae*, *Boraginaceae*, *Labiatae*, *Ericaceae* e *Cistaceae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*, *Mimosaceae* e *Myrtaceae* nas regiões Norte, Centro e em alguns parques de Portugal, nomeadamente o Parque Natural de Montesinho, localizado no Nordeste Transmontano, abrangendo parte dos concelhos de Bragança e Vinhais no distrito de Bragança.

3.1.2. Teor de humidade

O teor de humidade foi determinado utilizando o método de secagem em estufa a 105°C, aplicado a amostras de pólen recolhidas com recurso a capta-pólenes frontais. As amostras foram recolhidas ao longo de um total de 13 semanas, compreendidas entre os meses de Maio, Junho, Julho e Agosto de 2018. Este período de recolha, coincide com a época do ano em que se pode observar em abundância os tipos polínicos predominantes nas amostras estudadas.

Foram recolhidas amostras de pólen utilizando capta-pólenes frontais nas regiões de Nisa, Bragança, Vila Real e Portalegre (Figura 15).

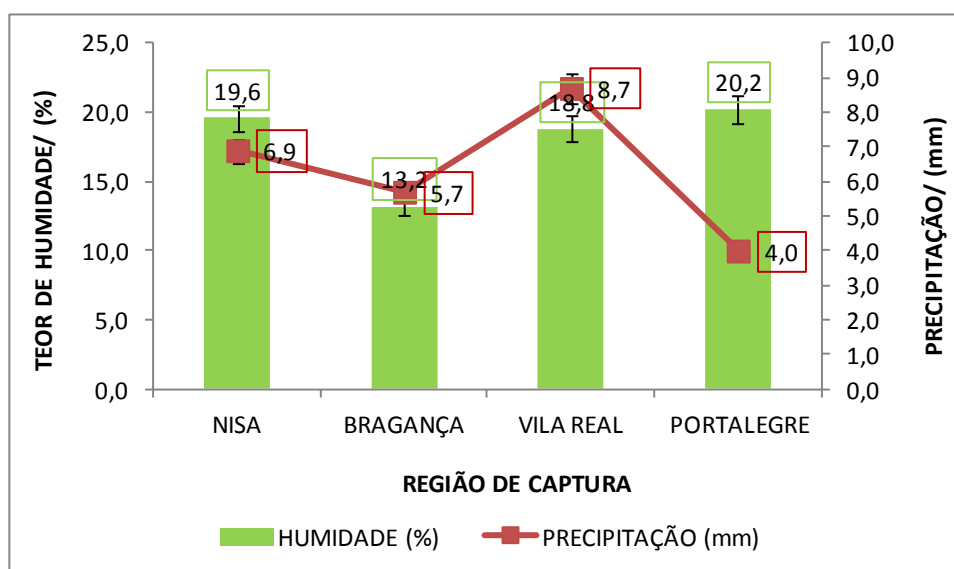


Figura 15 – Teor de humidade do pólen por região de captura e valores de precipitação registados na respetiva data de recolha

Os resultados obtidos para cada região de captura, apresentam uma variabilidade no teor de humidade entre os 20,2%, para a amostra recolhida na região de Portalegre, e os

13,2% para a amostra recolhida na região de Bragança, com diferenças estatísticas significativas, conforme mostra a **Figura 15**.

As variações registadas nos teores de humidade das amostras recolhidas nas diferentes regiões estarão muito provavelmente relacionadas com as condições atmosféricas, nomeadamente pluviosidade e humidade relativa do ar, registadas durante o período de recolha. Esta suposição é suportada por resultados obtidos por alguns autores que registaram teores de humidade distintos para amostras de pólen recolhidas na mesma região. Por exemplo, [Rocha \(2013\)](#) em seus estudos, obteve 17,12% de teor de humidade para amostras de pólen recolhidas na região transmontana, enquanto que, [Tomás \(2013\)](#) reportou teores de 7,5% de humidade para amostras de pólen recolhidas na mesma região.

3.1.3. Método de captura

Durante este estudo, tentou-se também avaliar se o método de recolha do pólen poderia ter alguma influência no teor de humidade do pólen. Assim, nas regiões de Vila Real e de Portalegre recolheram-se amostras de pólen, durante o mesmo período de recolha que foi utilizado para os capta-pólenes frontais, mas com recurso a capta-pólenes de estrada (**Figura 16**).

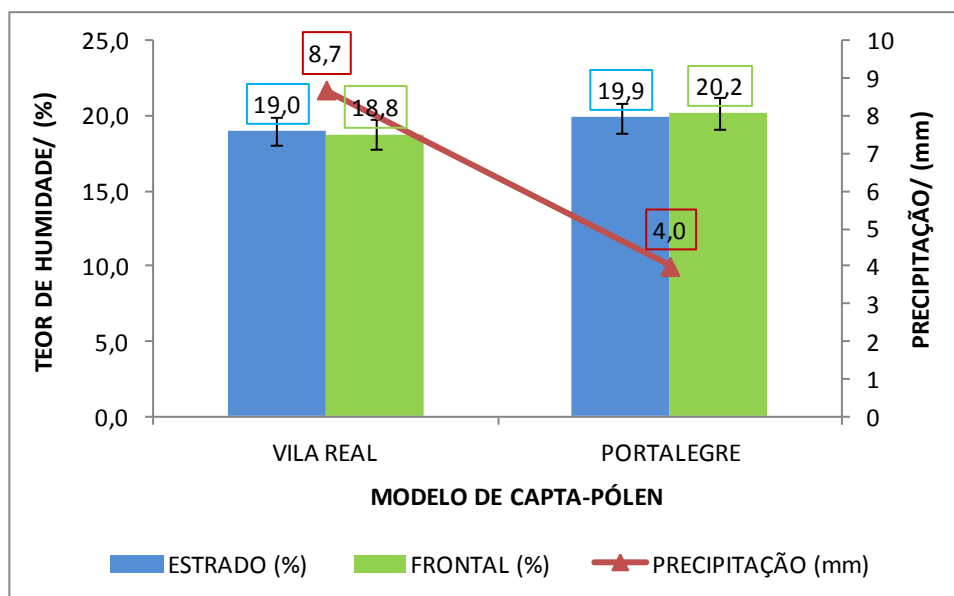


Figura 16 – Teor de humidade do pólen pelo modelo de captura utilizado (capta-pólen de estrada e frontal)

Na região de Vila Real, registaram-se teores médios de humidade de 19,0% e de 18,8%, para as amostras de pólen recolhidas usando capta-pólens de estrada e frontais, respetivamente. Na região de Portalegre, observou-se uma tendência semelhante: o pólen recolhido com capta-pólens de estrada apresentou um teor médio de humidade de 19,9%, tendo-se registado valores de 20,2%, quando se usaram capta-pólens frontais. Deste modo, os resultados sugerem que a técnica de captura do pólen apícola, não influencia o teor de humidade do produto recolhido. Ou seja, para cada região, a época de captura e as respetivas condições atmosféricas (chuva, vento e humidade relativa do ar), parecem ter mais impacto no teor de humidade do pólen capturado do que o método de captura utilizado.

3.2. Impacto dos métodos de preservação

Para a avaliação do impacto da aplicação de diferentes metodologias de preservação na composição química e atividade antioxidante do pólen apícola, foram utilizadas amostras de pólen recolhidas na região de Bragança. As metodologias de preservação utilizadas foram o congelamento, secagem em estufa à temperatura de 35°C, 40°C e 45°C (SEC35, SEC40 e SEC45, respetivamente) e liofilização. Após a aplicação das metodologias de preservação, as amostras de pólen foram analisadas, em diferentes tempos de armazenamento, relativamente à sua composição química (teor de humidade, cinzas, proteínas, gorduras, açúcares e compostos fenólicos totais) e atividade antioxidante (DPPH e poder redutor), de acordo com a metodologia descrita na seção 2.4.

3.2.1. Composição química e atividade antioxidante imediatamente após aplicação dos diferentes métodos de preservação

O teor de humidade no pólen apícola, é um dos parâmetros de maior relevância para a preservação e qualidade deste produto, uma vez que o pólen apícola está sujeito a proliferação de contaminações microbiológicas que podem inviabilizar o seu consumo e comercialização (Tomás, 2013).

Imediatamente após a sua congelação a amostra de pólen (CONG) apresentou um teor de humidade de 13,79% (**Tabela VIII**). O pólen fresco pode fermentar à temperatura ambiente, sendo necessário secar para reduzir a humidade a valores de 7 -

8% (Caminha, 2014). A utilização da técnica de secagem em estufa permitiu reduzir, de forma estatisticamente significativa, o teor de humidade do pólen para 9,62%, 9,81% e 10,13%, quando se utilizaram técnicas de SEC35, SEC40 e SEC45, respetivamente. No caso da liofilização, verificou-se que a sua utilização permitiu reduzir de uma forma ainda mais evidente o teor de humidade, neste caso para 5,79%. Os resultados do teor de humidade obtidos para a congelação do pólen apícola, estão abaixo do valor (18 à 30%) referenciado por Almeida-Muradian *et al.*, (2012) que o pólen fresco normalmente possui após a sua recolha, sendo propenso a fermentar (transformando-se em pão de abelha se estiver nos favos da colmeia), se logo após a recolha não receber algum processo de preservação. Rocha (2013) obteve 25,22% para amostras de pólen congelado recolhidas na região de Trás-os-Montes. Estudos feitos por Campos *et al.*, (2008), mostrou que após a secagem do pólen, reduziu-se o teor de humidade para valores de 4 à 8%. Estudos feitos por Carpes (2008), com pólen desidratado apresentaram um máximo de 7,84% de humidade, para amostras recolhidas no Brasil. A Legislação Brasileira para a qualidade do pólen (Brasil, 2001), recomenda valores máximos de 4% do teor de humidade para o pólen desidratado. A Legislação Suíça e Argentina, refere valores máximos de 8% para a qualidade do pólen desidratado e 10% para a Legislação da Bulgária (Nogueira *et al.*, 2012).

Tabela VIII – Composição química e atividade antioxidante do pólen imediatamente após a aplicação das diversas técnicas de preservação (valores expressos em base seca).

COMPOSIÇÃO QUÍMICA	Imediatamente após aplicação da técnica de preservação				
	Congelamento, -20°C	Secagem, 35°C	Secagem, 40°C	Secagem, 45°C	Liofilização
Humidade (%)	13,79 ± 0,08 d	9,62 ± 0,17 b	9,81 ± 0,14 bc	10,14 ± 0,12 c	5,79 ± 0,14 a
Cinza (%)	2,23 ± 0,01 a	2,31 ± 0,06 ab	2,26 ± 0,03 a	2,27 ± 0,04 a	2,38 ± 0,05 b
Gordura (%)	1,65 ± 0,27 a	1,60 ± 0,11 a	1,63 ± 0,31 a	1,52 ± 0,15 a	2,20 ± 0,90 a
Proteína (%)	26,53 ± 0,37 b	25,39 ± 0,55 ab	25,69 ± 0,36 ab	24,61 ± 0,64 a	26,26 ± 0,48 b
Frutose (mg/g)	181,91 ± 5,73 a	194,73 ± 3,40 b	194,67 ± 3,37 b	191,47 ± 4,89 ab	191,25 ± 4,11 ab
Glucose (mg/g)	154,39 ± 4,33 ab	168,19 ± 3,22 c	162,31 ± 4,42 bc	151,63 ± 4,00 a	161,79 ± 3,62 abc
Compostos fenólicos totais (mg EAG /g)	1,63 ± 0,11 bc	1,48 ± 0,20 a	1,83 ± 0,15 abc	2,02 ± 0,27 bc	2,31 ± 0,13 c
DPPH (EC ₅₀ mg/mL)	0,066 ± 0,00 a	0,042 ± 0,02 b	0,043 ± 0,02 b	0,043 ± 0,02 b	0,049 ± 0,00 c
Poder Redutor (mg EAG /g)	0,332 ± 0,06 a	0,485 ± 0,09 a	0,725 ± 0,06 b	0,907 ± 0,04 c	0,871 ± 0,06 bc

(Nota: na mesma linha, valores assinalados com letras diferentes indicam diferenças significativas, $p < 0,05$).

Outro dos parâmetros avaliados, foi o teor de cinza que indica a quantidade de minerais fixos presentes nas amostras, entre os quais, os contaminantes inorgânicos como o alumínio, o níquel e outros (Morgano *et al.*, 2010; Kaminski, 2017). Para o teor de cinzas, observou-se que não houve diferenças relevantes entre os valores apresentados pela amostra CONG (2,23%) e pelas amostras SEC35, SEC40 e SEC45 que apresentaram valores de 2,31%, 2,26% e 2,27%, respetivamente. A amostra preservada pela técnica de LIOF, apresentou um teor de cinza de 2,38%, que apesar de estatisticamente superior ao apresentado pelas amostras CONG, SEC40 e SEC45, representa uma diferença que não chega a 0,20%. Os valores obtidos no presente estudo são ligeiramente superiores aos observados num estudo feito por Rocha (2013) com amostras de pólen recolhidas na região transmontana, onde se registaram valores de 1,98% para o teor de cinzas. Este facto pode ser explicado, tendo em conta que, para além da origem geográfica, o teor de cinza pode ser influenciado por outros fatores, nomeadamente as condições agroecológicas, espécie vegetal e a capacidade de absorção (Martins *et al.*, 2011; Almeida-Muradian *et al.*, 2012). Em termos de legislação, podemos referir que os valores obtidos se encontram acima dos recomendados na legislação brasileira e Suíça: 0,28% e 0,14-0,42%, respetivamente (Brasil, 2001; Bogdanov *et al.*, 2004).

Quanto ao teor de gorduras, as várias amostras sob estudo apresentaram valores estatisticamente semelhantes: 1,65%, 1,60%, 1,63%, 1,52% e 2,20%, para as amostras CONG, SEC35, SEC40, SEC45 e LIOF, respetivamente. Os valores obtidos estão acima dos valores limites (máximos) estabelecidos na Legislação Brasileira (0,82%) e Suíça (0,07 – 0,7%) no teor de gorduras para a qualidade do pólen desidratado (Brasil, 2001; Bogdanov *et al.*, 2004). Apesar disso, estudos feitos por Nogueira *et al.*, (2012) com amostras de pólen comercial recolhidas em Espanha e Portugal, obtiveram valores de 2,81%, ou seja superiores aos por nós registados. Independentemente disso, estes resultados evidenciam a alta disponibilidade polínica da época em que as amostras foram recolhidas, permitindo as abelhas realizarem a devida seleção dos grãos de pólen, de modos a levarem para as colmeias, o melhor alimento disponível.

Imediatamente após a aplicação das técnicas de preservação, as amostras CONG, SEC35, SEC40 e LIOF apresentaram os maiores teores de proteínas (26,53%, 25,39%, 25,69% e 26,26%, respetivamente), sem qualquer diferença estatisticamente

significativa. A amostra SEC45 apresentou um valor de 24,61%, estatisticamente inferior, embora não chegando a uma diferença de 2%. Os valores obtidos neste trabalho, após a aplicação das técnicas de secagem em estufa e de liofilização, são superiores aos registados por [Nogueira et al., \(2012\)](#) num estudo com amostras comerciais provenientes de Espanha e Portugal onde as amostras apresentaram, teores de proteína compreendidos entre 12,50% e 25,15%. Esta diferença no teor de proteínas pode ser dada a época do ano em que foram recolhidas as amostras, região de captura, os fatores agroecológicos e a idade da planta. Por outro lado, não se descarta a possibilidade da mesma diferença ser atribuída pela seleção natural utilizada pelas abelhas, em capturar o pólen ideal para reduzir o déficit nutricional da sua cadeia alimentar. Da mesma forma, num outro estudo onde se utilizou a técnica de liofilização como técnica de preservação, também se obtiveram teores de proteína inferiores (19,4%) aos obtidos no presente estudo ([Tomás, 2013](#)).

As amostras de pólen foram analisadas relativamente à presença de açúcares livres, tendo-se detetado frutose, presente em maiores quantidades, e glucose, em quantidades entre 14 a 21% mais reduzidas. Observou-se ainda que as amostras SEC35, SEC40 e LIOF apresentaram os maiores teores de açúcares (362,91 mg/g, 356,98 mg/g e 353,04 mg/g, respetivamente), ao passo que as amostras SEC45 e CONG apresentaram os menores teores de açúcares (343,10 mg/g e 336,30 mg/g, respetivamente).

A amostra CONG apresentou 181,91 mg/g de pólen para a frutose e 154,39 mg/g para a glucose. As amostras preservadas pela técnica de secagem em estufa apresentaram 194,73 mg/g, 194,67 mg/g e 191,47 mg/g para a frutose e 168,18 mg/g, 162,31 mg/g e 151,63 mg/g para a glucose, com a utilização de temperaturas de preservação de SEC35, SEC40 e SEC45 (35°C, 40°C e 45°C), respetivamente. A amostra preservada pela técnica de LIOF apresentou valores de 191,25 mg/g para a frutose e 161,79 mg/g para a glucose. As técnicas de preservação aplicadas (CONG, SEC35, SEC40, SEC45 e LIOF) mostraram maior teor de frutose na amostra, comparativamente com o teor de glucose observado. Portanto, a presença dos açúcares redutores (frutose e glucose) servem como um indicador de qualidade do pólen desidratado, bem como a recolha seletiva efetuada pelas abelhas ([Kaminski, 2017](#)). Os teores de açúcares totais obtidos são superiores aos registados no estudo de [Estevinho et al., \(2012\)](#), onde se obtiveram entre 20 a 26% do teor de açúcares em amostras de pólen recolhidas em Portugal. Estudos feitos por [Chantarudee et al., \(2012\)](#), também

reportaram teores de açúcares inferiores aos registados no presente estudo: 6,4 g de glucose por cada 100g de pólen seco pelo método do HPLC e 7,2 g de frutose por TLC em amostras de pólen recolhidas na Tailândia. No mesmo sentido aponta um outro estudo feito por [Taha \(2015\)](#), em que obteve entre 15,4 a 17,1 g de glucose e 17,2 a 21,3 g de frutose por cada 100g de pólen em amostras recolhidas na região de Toscana (Itália). Ainda num outro estudo, [Martins et al., \(2011\)](#) obteve valores também inferiores aos detetados neste estudo: 12,6 a 23,6 g / 100 g de pólen para a frutose e 7,0 a 21,9 g /100 g de pólen de glucose pelo método do HPLC em amostras recolhidas no Brasil.

Relativamente aos compostos fenólicos totais, a amostra CONG apresentou 1,63 mg EAG/g de pólen, enquanto que as amostras SEC35, SEC40 e SEC45 registaram 1,48 mg EAG/g, 1,83 mg EAG/g e 2,02 mg EAG/g, respetivamente. Estes resultados mostram que à medida que se aumenta a temperatura de preservação, aumenta ligeiramente o teor de compostos fenólicos totais, verificando-se um aumento estatisticamente significativo de cerca de 35% entre os valores obtidos após a SEC35 e a SEC45. A amostra LIOF apresentou um teor de compostos fenólicos totais ainda superior, embora diferindo estatisticamente apenas da amostra SEC35: 2,31 mg EAG/g. Estes valores estão abaixo dos resultados obtidos em estudos feitos por [Carpes et al., \(2007\)](#), [Nogueira et al., \(2012\)](#), [Melo \(2015\)](#), [Morais et al., \(2011\)](#) e [Féas et al., \(2012\)](#) com valores de 8,1 mg EAG/g (Brasil), 16,08 à 46,0 mg EAG/g (Espanha e Portugal), 13,35 mg EAG/g (Brasil), 12,88 mg EAG/g (Portugal) e 16,40 mg EAG/g de pólen (Portugal).

A atividade antioxidante das amostras de pólen preservadas através das técnicas sob estudo foi avaliado através do método do DPPH e do poder redutor. Assim, quanto maior for o bloqueio de radicais livres de DPPH no extrato, menor será o valor do EC₅₀, significando que a amostra possui maior atividade antioxidante ([Calado et al., 2008](#)). Devido à sua simplicidade e rapidez, o método do DPPH tem sido muito utilizado para a análise da atividade antioxidante em alimentos no geral e em produtos da apicultura, como é o caso do pólen apícola ([Koleva et al., 2002](#); [Campos et al., 2003](#); [Lu et al., 2003](#); [Silva et al., 2006](#); [Leja et al., 2007](#)). Na determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, a amostra CONG apresentou o maior valor de EC₅₀, com 0,066 mg/mL, indicando que esta amostra possui a menor atividade antioxidante. Por outro

lado, a amostra LIOF, apresenta o menor valor de EC_{50} (0,049 mg/mL), significando que esta amostra tem a maior atividade antioxidante. Estas diferenças poderão estar relacionadas com o maior teor de compostos fenólicos detetado na amostra LIOF comparativamente com a amostra CONG, tal como registado por [Tomás \(2013\)](#). Relativamente às amostras preservadas através de secagem em estufa, não se registaram diferenças significativas nos valores de EC_{50} : 0,042 mg/mL, 0,043 mg/mL e 0,043 mg/mL, para as amostras SEC35, SEC40 e SEC45, respetivamente. Estudos feitos por [Arruda \(2013\)](#) e [Melo \(2015\)](#), em amostras de pólen recolhidas no Brasil, registaram valores superiores de EC_{50} : entre 0,45 e 5,74 mg/mL, evidenciando uma menor atividade antioxidante destas amostras, quando comparadas com as usadas no nosso estudo. Estas diferenças podem estar relacionadas com a época do ano em que as amostras foram recolhidas, origem botânica da flor, região de captura e condições agroecológicas ([Morais *et al.*, 2011](#)).

Em relação à atividade antioxidante avaliada pelo método do poder redutor, as amostras congeladas e secas em estufa a 35°C apresentaram os menores valores de poder redutor (0,332 mg EAG/g e 0,485 mg EAG/g, respetivamente), enquanto que as amostras secas a 45°C e liofilizadas registaram os maiores valores para este parâmetro: 0,906 mg EAG/g e 0,871 mg EAG/g, respetivamente. Diferente da determinação pelo método do DPPH, no método do poder redutor, quanto maior for o valor de EAG/g de pólen, maior é a concentração da capacidade antioxidante na amostra. Estes valores parecem estar bem correlacionados com o teor de compostos fenólicos totais, uma vez que as amostras com menor teor de compostos fenólicos (CONG e SEC35), foram também as que apresentaram menor poder redutor, e as amostras que registaram o maior teor de compostos fenólicos totais (SEC45 e LIOF), foram aquelas com maior poder redutor.

Comparando os valores obtidos para a atividade antioxidante das diversas amostras, avaliada através do método do DPPH e do método do poder redutor, verifica-se que a amostra CONG apresentou o maior valor de EC_{50} e também o menor valor de poder redutor, demonstrando ser a amostra com menor atividade antioxidante, independentemente do método usado para avaliar essa mesma atividade. De forma semelhante, a amostra LIOF apresentou o menor valor de EC_{50} (0,049 mg/mL), bem como um dos maiores valores para o poder redutor (0,871 mg EAG/g), evidenciando a

sua maior atividade antioxidante relativamente às amostras congeladas e secas em estufa. No caso das amostras secas em estufa, registaram-se valores de EC₅₀ semelhantes (0,54-0,55 mg/mL), mas o seu poder redutor foi distinto: 0,485 mg EAG/g, 0,725 mg EAG/g e 0,907 mg EAG/g, para as amostras SEC35, SEC40 e SEC45, respetivamente. Este resultado demonstra, tal como observado anteriormente por outros autores (Caveiro, 2017), que os resultados da atividade antioxidante são efetivamente influenciados pelo método usado para a sua avaliação, devendo usar-se vários métodos para avaliar este parâmetro. Apesar disso, os dois métodos utilizados para a avaliação da atividade antioxidante sugerem que, imediatamente após a respetiva aplicação, a liofilização possibilita uma melhor conservação desta atividade biológica por parte do pólen apícola. Este resultado, parece ser suportado por outros estudos que indicam a liofilização como uma técnica adequada para a preservação da atividade antioxidante, anti-inflamatória e propriedades antimicrobianas do pólen (Melo *et al.*, 2016). Por outro lado, a técnica de congelação parece levar a uma redução na atividade antioxidante das amostras de pólen, imediatamente após a sua aplicação.

3.2.2. Composição química e atividade antioxidante ao longo do armazenamento

Para além do seu impacto imediato, pretendeu-se ainda avaliar o possível efeito da aplicação das metodologias de preservação em estudo, na composição química e atividade antioxidante, ao longo de um período de armazenamento de 9 meses.

Relativamente ao teor de humidade das amostras de pólen, pode-se verificar que existe um comportamento distinto, consoante a técnica de preservação aplicada (**Figura 17**).

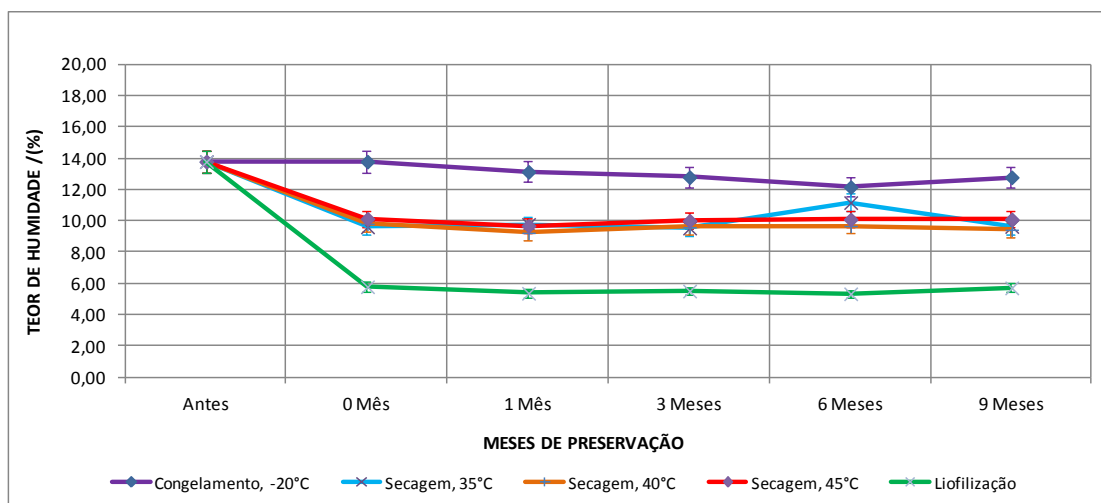


Figura 17 – Evolução do teor de humidade ao longo de 9 meses de armazenamento, das amostras de pólen preservadas através dos métodos de preservação em estudo.

No caso da amostra congelada, verificou-se que o seu teor de humidade varia ao longo dos 9 meses de armazenamento entre 13,79% (T0) e 12,16% (T6), embora a variação registada não seja significativa. Esta diminuição no teor de humidade após 9 meses de armazenamento, representa cerca de 7,3%. A preservação pela técnica de SEC35, SEC40 e SEC45, apresentou um teor mínimo de humidade de 9,54% (T3), 9,24% (T1) e 9,69% (T1) e um máximo de 11,17% (T6), 9,81% (T0) e 10,14% (T0), respetivamente. Estas diferenças registadas ao longo do armazenamento entre amostras SEC35, SEC40 e SEC45, podem estar associadas ao facto das três amostras receberem diferentes tempos e temperaturas de secagem em estufa. A secagem em estufa é a técnica de preservação mais utilizada pelos apicultores para desidratar o pólen apícola, sendo que, é uma técnica que leva muito tempo para se chegar ao teor de humidade recomendado que deve possuir o pólen apícola desidratado. A preservação pela técnica de LIOF apresentou uma variação de 5,79% (T0) e 5,34% (T6) de máximo e mínimo, respetivamente, com uma ligeira diminuição (7,8%) no teor de humidade após 6 meses de armazenamento, tendo um aumento de 7,9% comparativamente com o T9. Na literatura, as referências apontam valores não acima de 42°C para desidratar o pólen e que apresenta um teor de humidade final não superior a 4% (Almeida-Muradian *et al.*, 2012). É possível encontrar na literatura, referências que apontam valores compreendidos entre os 2,5% e 6% do teor de humidade que o pólen apícola deve possuir para sua melhor preservação (Casaca, 2010). A Legislação Argentina referencia valores limites entre os 4,0 e 8,0% do teor de humidade (Campos *et al.* 2008; Caminha,

2014). A Instrução Normativa nº3 da Legislação Brasileira (BRASIL, 2001), aponta valores de 4% para o teor de humidade no pólen desidratado. A preservação pelo método de liofilização reduziu o teor de humidade do pólen apícola avaliado, para valores considerados seguros, na Legislação Argentina. Em seus estudos, Ferreira (2012) obteve 17,16% para o pólen liofilizado, 19,82% para o pólen desidratado por corrente de ar frio e 18,29% para o pólen desidratado no frigorífico *frost-free*, para amostras recolhidas no Brasil. O mesmo autor, obteve os menores resultados quando a amostra é submetida ao processo de desidratação por liofilização. Rocha (2013) obteve 17,12% de humidade para o pólen seco.

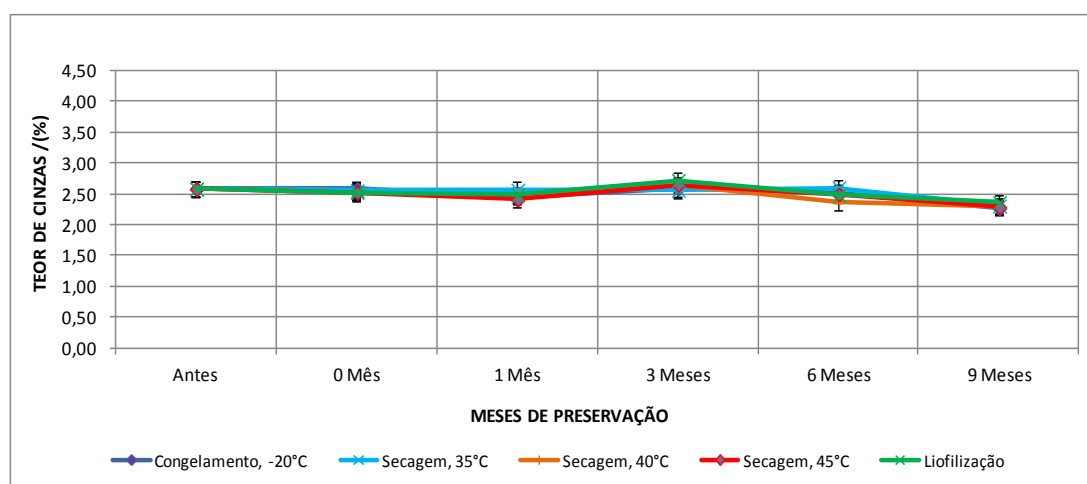


Figura 18 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de cinza do pólen para os diferentes métodos de preservação

No que diz respeito ao teor de cinza, verificaram-se variações significativas do ponto de vista estatístico nas amostras de pólen CONG, SEC45 e LIOF: 2,12–2,27%, 2,18–2,38% e 2,35–2,57%, respetivamente. Apesar disso, as variações são pouco extensas, não ultrapassando os 0,30%. No caso das amostras preservadas através de SEC35 e SEC40, não se verificaram quaisquer variações estatisticamente significativas ao longo dos 9 meses de armazenamento: 2,27–2,32% e 2,13–2,37%, respetivamente. Os valores obtidos neste estudo encontram-se em linha com os registados por outros autores, nomeadamente Almeida-Muradian *et al.*, (2005), Morais (2009), Nogueira *et al.*, (2012) e Rocha (2013), que registaram teores de cinza compreendidos entre 1,98% e 3,2%. É também de salientar que a Instrução Normativa nº3 da Legislação Brasileira para a qualidade do pólen (BRASIL, 2001), refere valores máximos de cinza na ordem

dos 4%, evidenciando que os valores obtidos neste estudo estão dentro dos parâmetros de qualidade recomendados para o pólen apícola.

No que se refere aos teores de gordura, verificou-se que estes variaram de forma pouco extensa e de uma forma não significativa, do ponto de vista estatístico, independentemente da metodologia de preservação aplicada (**Figura 19**).

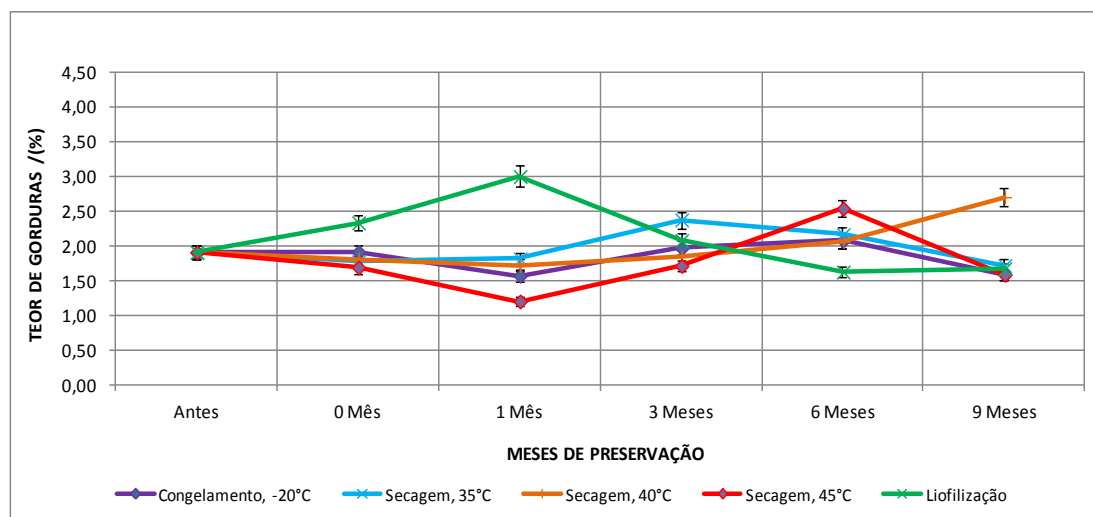


Figura 19 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de gordura do pólen para os diferentes métodos de preservação.

No caso do pólen CONG, o teor de gordura variou entre 1,37% e 1,83%, enquanto que, no caso das amostras SEC35, SEC40 e SEC45, as variações ficaram compreendidas entre 1,60–2,15%, 1,56–2,71% e 1,09–1,28%, respetivamente. Para as amostras preservadas através de LIOF, os teores de gordura variaram entre 1,54 e 2,84%. [Barajas et al., \(2009\)](#) refere em seus estudos que o teor de gordura aumenta ligeiramente à medida que a temperatura de secagem aumenta. [Morais \(2009\)](#) e [Nogueira et al., \(2012\)](#) obtiveram em seus estudos, valores de 2,82% e 2,81% para o pólen comercial recolhido em Espanha e Portugal. Os valores observados ao longo do tempo de armazenamento entre as técnicas de preservação analisadas (**Figura 19**), encontram-se dentro dos valores (1 a 5%) verificados por [Marchini et al., \(2006\)](#), [Carpes \(2008\)](#), [Estevinho et al., \(2012\)](#). Em seus estudos [Taha \(2015\)](#), obteve 1,8 a 5,4% em amostras de pólen recolhidas na Arábia Saudita pela extração em Soxhlet. Outro estudo feito por [Domenici et al., \(2015\)](#), apresentou 1,7 a 3,0% em amostras de pólen coletadas na região de Toscana (Itália), pelo mesmo método de extração. A Instrução Normativa nº3 da Legislação Brasileira ([BRASIL, 2001](#)), refere valores mínimos de teor de

gordura na ordem de 1,8% para a qualidade do pólen apícola. Os valores obtidos neste estudo, encontram-se acima do valor mínimo estabelecido para a qualidade do pólen.

Para o teor de proteína, a análise dos valores obtidos das amostras de pólen preservadas através das várias metodologias sob estudo mostra que, embora se verifique uma diminuição no teor de proteína ao longo do tempo de armazenamento quando a amostra é submetida a técnica de CONG e quando a amostra é submetida a técnica de secagem em estufa a diferentes temperaturas (SEC35, SEC40 e SEC45), estas diferenças não são significativas, do ponto de vista estatístico, (**Figura 20**).

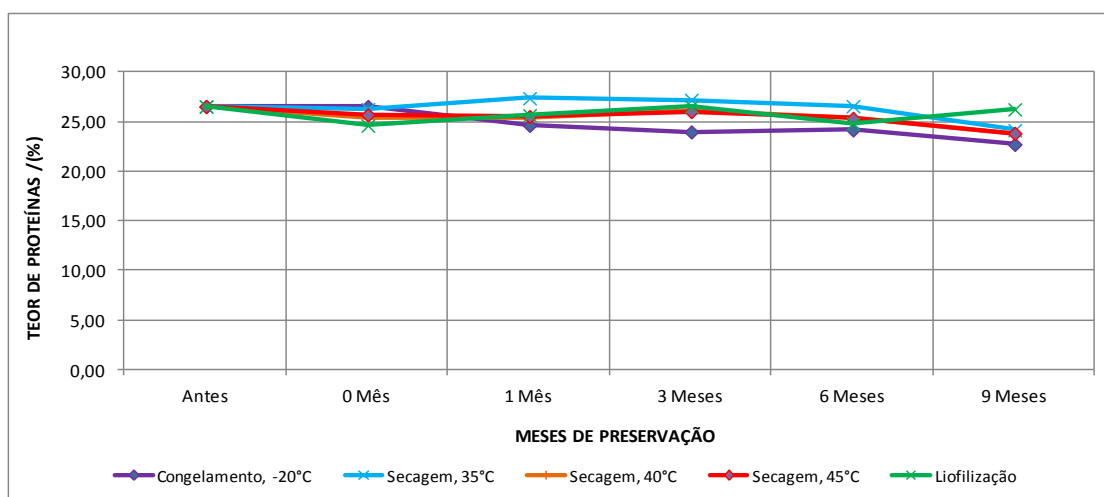


Figura 20 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de proteínas do pólen para os diferentes métodos de preservação

As técnicas de preservação em estudo, apresentam variabilidade no teor de proteína na ordem dos 22,71% mínimos para a amostra CONG (T9), 27,36% e 27,19% de máximo para a amostra LIOF (T1 e T3). A amostra CONG apresentou valores máximos e mínimo de 26,53% (T0) e 22,71% (T9), sem diferenças significativas do ponto de vista estatístico durante o armazenamento. A preservação pela secagem em estufa com as temperaturas de SEC35, SEC40 e SEC45, apresentaram teores de 24,14%, 23,81% e 24,61% de mínimo e 26,05%, 26,02% e 26,53% de máximo, sem diferenças significativas entre si ao longo do armazenamento. A preservação pela técnica de LIOF, apresentou 27,36% e 24,14% de máximo e mínimo, sem diferenças do ponto de vista estatístico ao longo do armazenamento. Os valores obtidos encontram-se acima dos 18,94% e abaixo dos 34,18% do teor de proteína encontrado por [Morais \(2009\)](#), [Estevinho et al., \(2012\)](#), [Féas et al., \(2012\)](#), [Nogueira et al., \(2012\)](#) e [Rocha \(2013\)](#). A Instrução Normativa nº3 da Legislação Brasileira ([BRASIL, 2001](#)), refere um mínimo de 8% do teor de proteínas para o pólen, não referindo o limite máximo que deve

possuir. Ou seja, os valores obtidos do teor de proteínas em todas as técnicas de preservação estudadas ao longo dos tempos de armazenamento, apresentaram valores acima dos exigidos para a qualidade do pólen apícola. Em seus estudos [Ferreira \(2012\)](#), obteve 19,67% para o pólen fresco, 34,32% para o pólen liofilizado, 32,89% para o pólen desidratado via corrente de ar frio e 33,47% para o pólen desidratado via frigorífico *frost-free*. Outro estudo feito por [Tomás \(2013\)](#) obteve um máximo de 19,4% de proteínas para amostras de pólen recolhidas na região transmontana e refere que, estas diferenças do teor proteico poderão estar relacionadas com a origem da flor e a idade da planta de onde foi recolhido o pólen, para além dos fatores agroecológicos e a época do ano em que foi recolhido o pólen. Pelo mesmo método de extração (Kjeldahl), [Almeida-Muradian et al., \(2005\)](#) obtiveram teores de proteína compreendidos entre 17,0 e 25,0% em amostras de pólen recolhidas no Sul do Brasil. [Taha \(2015\)](#), obteve em seus estudos valores entre 14,6 e 19,5% em 100g de pólen em amostras recolhidas na Arábia Saudita. Outro estudo feito por [Domenici et al., \(2015\)](#) obtiveram 25,5 a 28,7% em amostras de pólen recolhidas na região de Toscana (Itália), pelo mesmo método de extração. Esta diferença no teor proteico, para além de estar relacionada aos fatores referidos anteriormente, também pode ser atribuída a seleção natural dos grãos de pólen efetuada pelas próprias abelhas.

Como referido na seção anterior, a análise do perfil de açúcares das várias amostras de pólen revelou a presença de frutose e glucose. Na **Figura 21** encontra-se ilustrada a variação da quantidade total de açúcares (frutose e glucose), para as várias metodologias estudadas, ao longo de um período de armazenamento de 9 meses. É possível verificar que, a partir dos 6 meses de armazenamento, se regista uma redução significativa na quantidade de açúcares totais detetada, sendo essa variação mais evidente aos 9 meses de armazenamento. A maior redução de açúcares totais foi registada no T9, entre as amostras preservadas pela técnica de CONG, SEC40 e SEC45. A variação entre o T6 e o T9 para amostra CONG (410,86 – 271,95 mg/g de máximo e mínimo) provocou uma redução significativa de 33,8% no teor de açúcares totais, ao passo que, entre o T3 e T9 (361,38 e 271,95 mg/g), houve uma redução significativa de 24,7%. Para a amostra SEC35, a diminuição entre o T3 e T6 (343,47 e 314,84 mg/g) foi de 8,3%, ao passo que, entre o T3 e T9 (343,47 e 321,16 mg/g) foi de 6,5% de redução. A amostra SEC40 provocou uma diminuição de 4,7% entre o T3 e T6 (333,70 e 318,04 mg/g), ao passo que, entre o T3 e T9 (333,70 e 287,85 mg/g) a redução foi de 13,7%. A amostra SEC45

provocou uma redução de 14,0% entre o T3 e T6 (344,08 e 296,03 mg/g), tendo uma redução de 17,9% entre o T3 e T9 (344,08 e 282,39 mg/g) no teor de açúcares. A amostra LIOF provocou uma redução de 8,6% entre o T3 e T6 (375,78 e 343,58 mg/g), ao passo que, para o T3 e T9 (3375,78 e 334,01 mg/g) a redução foi de 11,1% no teor de açúcares totais.

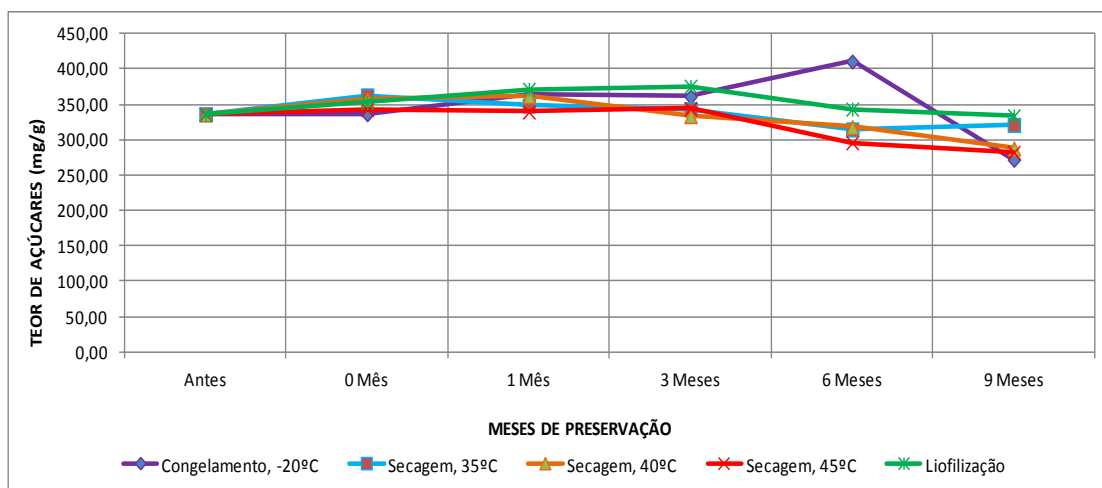


Figura 21 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do perfil de açúcares do pólen para os diferentes métodos de preservação

Ao analisarmos individualmente as variações de frutose e de glucose, ao longo do tempo de armazenamento (**Figura 22**), é possível verificar que a frutose é o monossacarídeo detetado em maior quantidade ao longo de todo o período de armazenamento, independentemente da técnica de preservação que foi utilizada. A análise dos resultados também mostra que é a glucose, o açúcar que mais contribui para a diminuição no teor total de açúcares após 9 meses de armazenamento, tal como foi referido anteriormente.

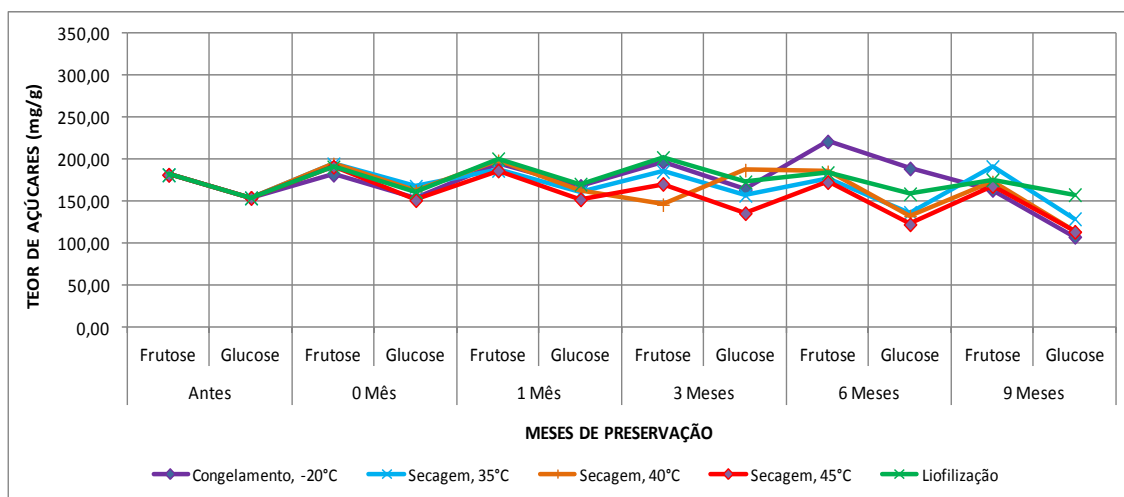


Figura 22 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do perfil de açúcares do pólen para os diferentes métodos de preservação

A amostra CONG apresentou um aumento significativo de 12,2% de frutose (197,36 a 221,49 mg/g) e 15,5% de glucose (164,02 a 189,37 mg/g) entre o T3 e T6, ao passo que, entre o T3 e T9 apresentou uma redução significativa do ponto de vista estatístico de 17,0% para a frutose (197,36 a 163,88 mg/g) e 34,1% para a glucose (164,02 a 108,07 mg/g). A amostra SEC35 apresentou uma redução no perfil de açúcares de 4,4% para a frutose (185,89 a 177,79 mg/g) e 13,0% para a glucose (157,58 a 137,05 mg/g) entre o T3 e T6, ao passo que, a variação entre o T3 e T9 apresentou um aumento de 3,1% para a frutose (185,89 a 191,60 mg/g) e diminuição estatística de 17,8% para a glucose (157,58 a 129,56 mg/g). A amostra SEC40 apresentou um aumento estatístico significativo entre o T3 e T6 de 26,7% para a frutose (146,27 a 185,36 mg/g), tendo por sua vez, uma diminuição estatística significativa de 29,2% para a glucose (187,43 a 132,68 mg/g), a variação entre o T3 e T9 foi significativa, com aumento de 18,4% (146,27 a 173,21 mg/g) para frutose uma diminuição de 38,8% (187,43 a 114,64 mg/g) para a glucose. Para a amostra SEC45, a variação registada entre o T3 e T6, foi de um aumento não significativo (1,3%) para a frutose (170,97 a 173,11 mg/g), tendo uma redução significativa (9,7%) (136,15 a 122,92 mg/g) para a glucose, entre o T3 e T9, registou-se uma redução no perfil de açúcares totais de 1,5% para a frutose (170,97 a 168,40 mg/g) e 16,3% para a glucose (136,15 a 1113,99 mg/g). A amostra LIOF apresentou uma redução no perfil de açúcares com 8,9% para a frutose (202,35 a 184,38 mg/g) e 8,2% para a glucose (173,43 a 159,20 mg/g) entre o T3 e T6, tendo também apresentado redução entre o T3 e T9, com 13,1% para a frutose (202,35 a 175,81 mg/g) e 8,8% para a glucose (173,43 a 158,2 mg/g).

Nesta discussão dos valores obtidos para o teor de açúcares, vale a pena realçar que as maiores reduções foram verificadas para a glucose, após 9 meses de armazenamento, em particular para amostra CONG, SEC40 e SEC45. Para as técnicas de secagem à temperatura mais baixa (SEC35) e LIOF, as reduções foram menores, à semelhança do que se verificou com as proteínas. Este resultado, sugere que a secagem em estufa a temperatura mais reduzida, bem como a liofilização poderão possibilitar uma maior manutenção do valor nutritivo do pólen armazenado durante períodos de armazenamento de 9 meses (ou seja a mais longo prazo). Estes resultados poderão ser resultado de reações de Maillard que decorrem ao longo do armazenamento do pólen.

Relativamente ao teor de compostos fenólicos totais (**Figura 23**), as diferentes técnicas de preservação em estudo levaram a comportamentos diferenciados ao longo do tempo, com diferenças significativas a partir dos 3 meses, sendo mais evidente aos 9 meses de armazenamento.

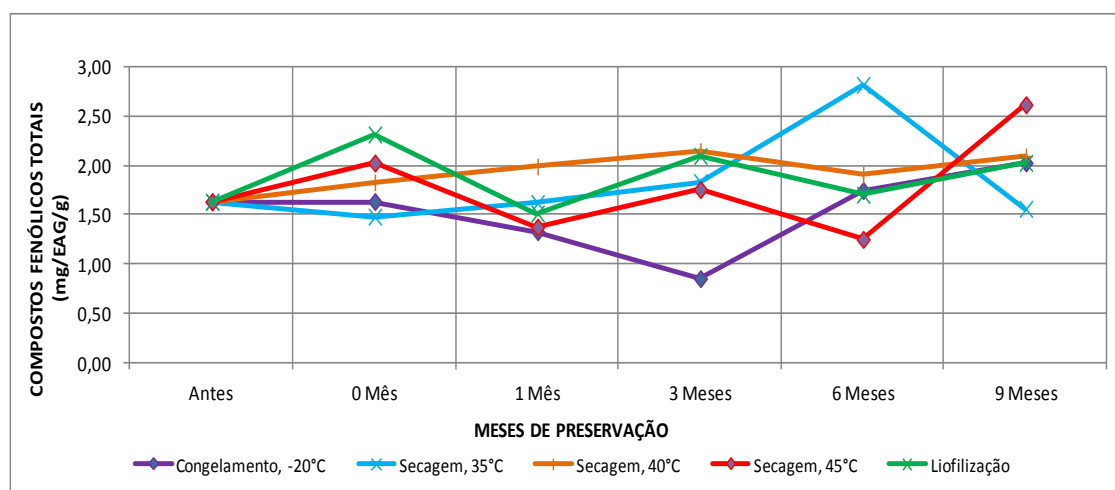


Figura 23 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses do teor de compostos fenólicos totais do pólen para os diferentes métodos de preservação

No caso da amostra CONG, verificou-se uma diminuição de 47,9% no teor de compostos fenólicos totais detetados após 3 meses de armazenamento. A partir dos 3 meses de armazenamento o teor de compostos fenólicos totais variou de 0,85 até 2,02 mg EAG/g, aos 9 meses de armazenamento, correspondendo a um aumento de 138%. A preservação pela técnica de SEC35, levou a um aumento estatístico significativo de 53,7% entre o T3 e T6 (1,83 a 2,81 mg EAG/g), ao passo que, a variação entre o T3 e T9 provocou uma redução de 14,8% (1,83 a 1,56 mg EAG/g). A amostra SEC40 provocou uma redução estatisticamente significativa de 11,2%, entre o T3 e T6,

correspondente a uma variação de 2,14 a 1,90 mg EAG/g, seguida de um aumento de 9,1%, após 9 meses de armazenamento. Após 6 e 9 de armazenamento, a técnica de SEC40 causou uma redução de 2,3% (2,14 a 2,09 mg EAG/g). A preservação pela técnica de SEC45 provocou uma redução de 0,3% entre o T3 e T6 (1,75 a 1,25 mg EAG/g), ao passo que, a variação entre o T6 e T9 levou a um aumento estatístico significativo de 52,1% (1,25 a 2,61 mg EAG/g). A preservação pela técnica de LIOF provocou uma redução estatística de 18,7% entre o T3 e T6 com uma variação de 2,09 a 1,70 mg EAG/g, ao passo que, entre o T6 e T9 a variação foi de 1,70 a 2,02 mg EAG/g tendo causado um aumento de 15,8%. Estudos feitos por [Carpes et al., \(2007\)](#), obtiveram 8,1 mg EAG/g de pólen em amostras recolhidas no Brasil. Os nossos resultados estão muito abaixo dos resultados de um estudo feito por [Nogueira \(2012\)](#) com amostras de pólen comercial recolhidas em Espanha e Portugal, onde obteve uma variação de compostos fenólicos totais entre 16,08 a 46,0 mg EAG/g de pólen. [Tomás \(2013\)](#), obteve 35 mg EAG/g de pólen para os compostos fenólicos totais de amostras de pólen apícola recolhidas no nordeste transmontano.

A atividade antioxidante das amostras de pólen, avaliada pelo método do DPPH, e expressa através do valor de EC₅₀ variou ao longo do tempo de armazenamento, para as diversas metodologias de preservação aplicadas, como se ilustra na **Figura 24**.

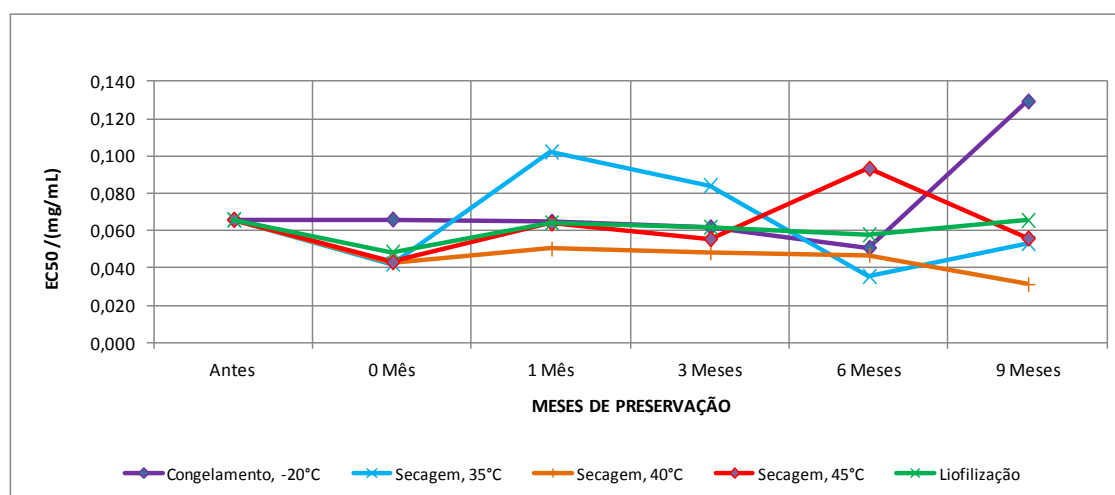


Figura 24 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses da atividade antioxidante do pólen, avaliada pelo método do DPPH, e expressa através do valor de EC₅₀, para os diferentes métodos de preservação.

Os valores de EC₅₀ observados apresentaram uma variação entre 0,031 a 0,129 mg/mL de mínimo e máximo para as amostras SEC40 e CONG, respetivamente, ambas após um período de 9 meses de armazenamento. A amostra CONG apresenta uma

diminuição no valor de EC_{50} após 6 meses (0,066 a 0,051 mg/mL) e um aumento de 60,5% aos 9 meses (0,129 mg/mL) de armazenamento, com diferenças significativas do ponto de vista estatístico entre o T6 e T9. A amostra SEC35, o valor de EC_{50} aumenta 50% após 3 meses de armazenamento (0,042 a 0,084 mg/mL), tendo uma diminuição significativa (0,036 a 0,053 mg/mL) após um tempo de 6 e 9 meses de armazenamento. Para a amostra SEC40, os valores de EC_{50} aumentaram cerca de 10,4% após 3 e 6 meses de armazenamento e diminuíram significativamente (27,9%) do ponto de vista estatístico após 9 meses (0,043 a 0,031 mg/mL) de armazenamento. A amostra SEC45 apresenta um aumento (53,8%) estatístico significativo nos valores de EC_{50} após 6 meses (0,043 a 0,093 mg/mL), tendo diminuído 39,8% (0,056 mg/mL) após 9 meses de armazenamento. A preservação pela técnica de LIOF apresentou um aumento (0,049 a 0,066 mg/mL) após 9 meses de armazenamento e com diferenças estatísticas significativas, tendo diminuído (0,058 mg/mL) aos 6 meses de armazenamento.

Após um período de armazenamento de 9 meses, foi possível observar que as amostras preservadas por congelamento apresentaram um valor de EC_{50} de 0,129 mg/mL, que é superior ao das restantes. Para além disso, na técnica de congelamento, o valor de EC_{50} aumentou significativamente após 9 meses de armazenamento, evidenciando uma redução na atividade antioxidante relativamente aos restantes tempos de armazenamento. Por outro lado, foi ainda possível verificar que, também para o tempo de armazenamento de 9 meses, as amostras secas em estufa apresentaram os menores valores de EC_{50} : 0,053 mg/mL, 0,031 mg/mL e 0,056 mg/mL, para a secagem em estufa a SEC35, SEC40 e SEC45, respetivamente. Este resultado evidencia o aumento da atividade antioxidante, após 9 meses de armazenamento, com diferenças estatísticas significativas entre a SEC40 com as restantes técnicas de secagem em estufa. A técnica de liofilização apresentou um aumento significativo no valor de EC_{50} de 0,066 mg/mL após 9 meses de armazenamento, evidenciando uma redução na atividade antioxidante em relação aos restantes tempos de armazenamento.

Através da avaliação do poder redutor (**Figura 25**), foi possível observar valores entre 0,087 e 0,907 mg EAG/g de pólen, após um período de tempo de 9 meses de armazenamento para a amostra SEC45, nos tempos de armazenamento T6 e T0.

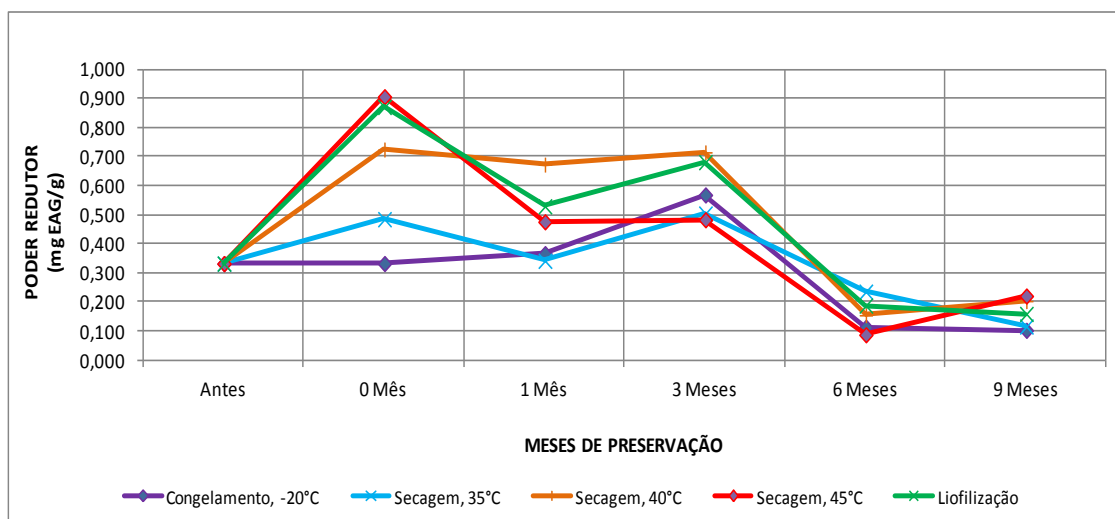


Figura 25 – Evolução ao longo de um período de armazenamento de 9 meses da atividade antioxidante do pólen, avaliada através do método do poder redutor, para os diferentes métodos de preservação

Apesar do aumento do poder redutor que foi verificado imediatamente após a aplicação das técnicas de liofilização e de secagem em estufa para as temperaturas de SEC40 e SEC45, foi possível observar que o poder redutor das amostras de pólen diminuiu significativamente após 6 e 9 meses de armazenamento, independentemente da técnica de preservação aplicada. Para a amostra CONG, foi registado um aumento significativo de 74,1% (0,332 a 0,568 mg GAE/g) após 3 meses de armazenamento e tendo uma diminuição de 66,0% e 69,3% (0,113 a 0,102 mg GAE/g), após 6 e 9 meses de armazenamento. Para a preservação pela técnica de SEC35, verificou-se uma diminuição significativa de 76,3% (0,485 a 0,115 mg GAE/g), após 9 meses de armazenamento, tendo-se registado um aumento de 3,8% (0,504 mg/g) no 3º mês de armazenamento. Na amostra seca à temperatura de 40°C, houve uma diminuição estatisticamente significativa de 78,8% e 72% (0,725 a 0,203 mg GAE/g) após 6 e 9 meses de armazenamento, registando ligeira estabilidade (0,715 mg GAE/g) aos 3 meses de armazenamento. Para a amostra preservada pela técnica de SEC45, causou uma diminuição de 75,7% (0,907 a 0,220 mg GAE/g) estatisticamente significativa ao longo do tempo após 9 meses de armazenamento. Para a amostra preservada pela técnica de LIOF, houve uma diminuição (81,7%) significativa do ponto de vista estatístico ao longo do tempo (0,871 a 0,159 mg GAE/g) após 9 meses de armazenamento, causando uma redução menor (21,7%) aos 3 meses de armazenamento (0,682 mg GAE/g).

4. Conclusões

A realização da presente dissertação de mestrado, desenvolvida no âmbito do projeto de investigação DivInA - Diversificação e Inovação na Produção Apícola -, possibilitou a obtenção de resultados que nos conduzem às seguintes conclusões:

1. A análise polínica revelou que a composição polínica das amostras é influenciada pelo local de recolha, sendo evidentes as diferenças entre as amostras recolhidas na região de Trás-os-Montes (Bragança e Vila Real), onde predominam a *Castanea sativa* e *Rubus sp*, enquanto que nas amostras recolhidas na região do Alentejo (Nisa e Portalegre), predomina o tipo polínico *Echium sp.*;

2. A determinação do teor de humidade das várias amostras de pólen recolhidas ao longo de 13 semanas, nas regiões de Bragança, Nisa, Portalegre e Vila Real evidenciou a importância do local de captura, sugerindo que as condições climáticas no momento, ou antes, da captura influenciam de forma significativa os valores registados. Este facto, embora não represente nenhuma surpresa, reveste-se de grande importância para o apicultor, uma vez que terá influência no custo associado às operações de preservação: maior teor de humidade no momento da recolha implica mais tempo de secagem em estufa ou de liofilização. Deste modo, este aspeto deverá ser tido em consideração pelo apicultor no momento de planear a recolha do pólen;

3. A determinação do teor de humidade de amostras de pólen recolhidas em Portalegre e em Vila Real, recorrendo a dois métodos de captura (capta-pólen de estrado e frontais) evidenciou que a escolha do tipo de capta-pólen usado não influencia de forma significativa o teor de humidade do pólen;

4. De uma forma geral, as técnicas de preservação estudadas permitiram manter o valor nutricional do pólen congelado, imediatamente após a sua aplicação. Para além disso, a liofilização, bem como a utilização de temperaturas mais elevadas durante a secagem em estufa (40°C e 45°C) causaram um incremento apreciável no poder reductor do pólen;

5. As técnicas de preservação estudadas, mostraram impacto significativo nas características químicas do pólen ao longo do armazenamento, nomeadamente no teor de humidade, açúcar (glucose), compostos fenólicos totais e atividade antioxidante;

6. Ao longo do período de armazenamento de 9 meses, a técnica de liofilização apresentou o melhor desempenho relativamente à preservação do valor nutricional das amostras de pólen. Por outro lado as amostras preservadas através da técnica de secagem em estufa à temperatura de 45°C apresentaram, ao fim de 9 meses de armazenamento, um teor mais elevado de compostos fenólicos totais, o que se refletiu num maior poder redutor dessas mesmas amostras. Deste modo, ao tomar a decisão sobre a técnica de preservação a utilizar, o apicultor terá de tomar em consideração alguns aspetos, nomeadamente: o tipo de produto que pretende apresentar ao consumidor, bem como os custos de aquisição dos equipamentos, dado que, de uma forma geral, a aquisição de um liofilizador representará um custo acrescido relativamente ao da compra de uma estufa de secagem.

5. Perspetivas de trabalho

Para um trabalho futuro relacionado com o armazenamento do pólen apícola aplicando diferentes técnicas de preservação, recomendamos:

- avaliar outros métodos de preservação do pólen apícola para ver o que sucede ao longo do tempo de armazenamento;

- avaliar de que forma a temperatura de preservação poderá influenciar no perfil de compostos fenólicos totais, açúcares, bem como na atividade antioxidante;

6. Referências bibliográficas

- Almeida-Muradian, L. B.; Pamplona, L. C.; Coimbra, S.; Barth, O. M. 2005. **Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets.** *Journal of Food Composition and Analysis*, February 2005, v. 18. 105-111
- Almeida-Muradian, L. B.; Penteadó, M. V. C. 2007. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos.** Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Almeida-Muradian, L. B. 2009. **Qualidade dos produtos apícolas e otimização quimiométrica dos métodos de análise do mel por espectroscopia no infravermelho (FT-IR ATR).** Tese (Livre docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Almeida-Muradian, L. B.; Arruda, V. A. S.; Barreto, L. M. R. C. 2012. **Manual de controle de qualidade do pólen apícola.** São Paulo. APACAME.
- Amâncio, D. C. de P. G. 2014. **Compostos bioativos do pólen.** Dissertação (Química Farmacêutica Industrial) Faculdade de Farmácia. Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Argentina. 2004. **Código Alimentário Argentino, de 18 de Julho de 1969.** Regulamentação. Capítulo X, Artigos 767 a 818 dos Alimentos Azucarados da Secretária do Estado da Saúde. *Buenos Aires*,. Art 785, 16-17.
- Arruda, V.A.S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica.** São Paulo, 2013. 192p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- Arruda, V. A. S.; Santos-Pereira, A. A.; Freitas, A. S.; Barth, O. M.; Almeida-Muradian, L. B. 2013. **Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition.** *Journal of Food Composition and Analysis*, v.29, 100-105.
- Barth, O. M. 1989. **O pólen no mel brasileiro.** Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz Rio de Janeiro (Edição Online – 2009).

- Barreto, L. M. R. C.; Funari, S. R. C.; Orsi, R. O. 2005. **Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Federal.** *Boletim de Indústria Animal, Nova Odessa*, v. 62, 167-175.
- Barreto, L. M. R. C.; Funari, S. R. C.; Orsi, R. O.; Dib, A. P. S. 2006. **Produção de pólen no Brasil.** *Cabral Editora e Livraria Universitária, Taubaté.*
- Becker, E. M.; Nissen, L. R.; Skibsted, L. H. 2004. **Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects.** *European Food Research and Technology*, Berlin, v. 219, p. 561–571.
- Bogdanov, S.; Bieri K.; Gremaud, G.; Iff, D.; Känzig, A.; Seiler, K. 2004. **Swiss Food Manual Chapter 23 B: Bienenprodukte - Pollen, BAG (Swiss Federal Office for Public Health), Berne.**
- Bogdanov, S. 2014a. **The Pollen Book Chapter 1.** *Bee Product Science*. Disponível em: <http://www.bee-hexagon.net/en/pollen.htm>. Acessado em Dezembro de 2018.
- Bogdanov, S. 2014b. **The Pollen Book, Chapter 2.** *Bee Product Science*. Disponível em: <http://www.bee-hexagon.net/en/pollen.htm>. Acessado em Dezembro de 2018
- Bortolatto J.; Lora, J. 2009. **Avaliação da composição centesimal do abacaxi (*Ananas comosus (L.) merril*) liofilizado e in natura.** *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde, América do Norte*, 4, dez. Disponível em: <http://periodicos.unesc.net/index.php/saude/article/view/142/147>. Acessado em Dezembro de 2018.
- Brasil. 2001. Instrução Normativa nº3, de 19 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola e outros produtos da colmeia, do Ministério de Agricultura e do Abastecimento.** Anexo V, Seção 1, 18-23, Brasília. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa>. Acessado em Fevereiro de 2019.
- Cabo, P.; Luís G. Dias¹; Vilas-Boas¹, M.; Gomes, M. 2014. **Apicultura em modo de produção biológico em Portugal: evolução, situação atual e futuro.** *In: Propostas agroecológicas ao industrialismo. Recursos compartilhados e respostas, Editado por GIEEA (Grupo de Investigación en Economía Ecológica e Agroecología)*, v. 337-353

- Calado, J. C. P.; Santos, L. C.; Cabral, F. A.; Marcucci, M. C. 2008. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de própolis obtidos através da extração por fluido supercrítico.** *I jornada de iniciação científica e tecnológica UNIBAN Brasil*
- Caminha, E. C. F. 2014. **A recolha de pólen e o impacto na produção de mel na região de Trás-os-Montes e Alto Douro.** *Dissertação* (Mestrado em Gestão de Recursos Florestais). Escola Superior Agrária de Bragança. ESA/IPB. Portugal, 71f.
- Caminha, E. C. F.; Tomás, A. V. F.; Russo-Almeida, P.; Vilas-Boas, M. 2016. **A recolha de pólen e o impacto na produção de mel na região de Trás-os-Montes e Alto Douro.** *In: IV Congresso Ibérico de Apicultura.* Salamanca. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10198/17411>. Acessado em Novembro de 2018.
- Campos, M. G.; Webby, R. F.; Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Da Cunha, A. P. 2003. **Aged induced diminution of free radicals scavenging capacity in bee-pollens and the contribution of constituents favonoids.** *J. Agric. Food Chem.*, 51, 742-745;
- Campos, M. G.; Bogdanov, S.; Almeida-Muradian, L. B.; Szczesna, T.; Mancebo, Y.; Frigerio, C.; Ferreira, F. 2008. **Pollen composition and standardisation of analytical methods,** *Journal of Apicultura Research and Bee World*, v. 47, 154-161.
- Campos, M. G. 1998. **Melato no Mel e sua Determinação Através de Diferentes Metodologias.** *Tese* (Doutoramento) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 178p.
- Campos, M. G, Webby, R. F., Markham, K. R., Mitchell, K. A., Cunha, A. P. 2003. **Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.3, p.742-745.
- Carpes, S. T.; Begnini, R.; Alencar, S. M.; Masson, M. L. 2007. **Study of preparations of bee pollen extracts.** Antioxidant and antibacterial activity. *Ciencia e Agrotecnologia.* 31, 1818-1825.

- Carpes, T. 2008. **Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas do Pólen Apícola de *Apis mellifera* da região Sul do Brasil.** Tese (Doutoramento). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, Setembro. 255f.
- Carpes, S. T., Prado, A.; Moreno, I. A. M.; Alencar, S. M.; Mourão, G. B.; Masson, M. L. 2008. **Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil.** Química Nova, v.31, n.7, p.1660-1664.
- Carpes, S. T., Alencar, S. M., Cabral, I. S.R., Oldoni, T. L.C., Mourão, G.B., Haminiuk, C.W.I., Luz, C.F.P., Masson, M.L. 2013. **Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil.** Characterization of polyphenols of bee pollen. *Journal of Food*, **11** (2), 150-161.
- Casaca, J. D. 2010. **Manual de Produção de Pólen e Própolis – FNAP – Federação Nacional dos Apicultores de Portugal.** Programa Apícola Nacional. Agosto, Portugal.
- Caveiro, E. M. S. 2017. **Caracterização de méis comerciais rotulados com a designação de mel de urze.** *Dissertação* (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) Escola Superior Agrária de Bragança. Instituto Politécnico de Bragança. Portugal
- Chantarudee, A.; Phuwapraisirisan, P.; Kimura, K.; Okuyama, M.; Mori, H.; Kimura, A.; Chanchao, C. 2012. **Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 12.
- Choi, E. M. 2007. **Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract.** *Phytotherapy Research*, v.21, 471-475.
- Condón, M. 2005. **Palinologia y Caracteres Físico- Químicos del Pólen Apícola Producido en España. Propuesta de Parámetros objetivos de calidad.** Tese (doutoramento em Química Analítica, Nutrição e Bromatologia). Universidade de Salamanca, Faculdade de Farmácia. Salamanca, Espanha.
- Domenici, V., Gabriele, M., Parri, E., Felicioli, A., Sagona, S., Pozzo, L., & Pucci, L. 2015. **Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins.** *Italian Journal of Food Science*, 27(2), 248–259.

- Esin, B.; Hoseyin, B. M.; Musa, Ö. 2006. **Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens.** *Journal of Food Engineering*, v. 77, 992-996.
- Estevinho, M. L. M. F.; Rodrigues, S.; Pereira, A. P.; Feás, X. 2012. **Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, 429-435.
- Falcão, S., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., Cardoso, S. M. 2010. **Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396, 887-897.
- Féas, X.; Vázquez-Tato, M. P.; Estevinho, M. L. M. F.; Seijas, J. A.; Iglesias, A. 2012. **Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality.** *Journal Molecules*, v. 17, 8359-8377.
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., Estevinho, L. M. 2009. **Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract.** *Food Chemistry*. 114, 1438–1443.
- Ferreira, R. C. 2012. **Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen da *Melipona scutellaris* Latreille submetido a diferentes processos de desidratação.** *Dissertação* (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia. UFRB, Salvador. 105f.
- Finola, M. S., Lasagno, M. C., Marioli, J. M. 2007. **Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina.** *Food Chemistry*, 100, 1649–1653.
- Forcone, A., Aloisi, P. V., Ruppel, S., Muñoz. 2011. **Botanical composition and protein content of pollen collected by *Apis mellifera* L. in the north-west of Santa Cruz (Argentinean Patagonia).** *Gran*, 50, 30-39.
- Frigerio, C. 2009. **Optimização e influência na bioactividade do processo de secagem por radiação infravermelha de amostras de pólen apícola.** *Dissertação* (Mestrado) Universidade de Farmácia do Porto. 55f.

- Hamalainen, M.; Nieminen, R.; Vuorela, P.; Heinonen, M.; Moilanen, E. 2007. **Anti-inflammatory effects of flavonoides: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kB activations, whereas flavones, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and No Production in activated macrophages.** *Mediators of inflammation*, v. 2007, 1-10.
- Hervatin, H. L. 2009. **Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola *in natura* e desidratado sob diferentes temperaturas.** *Dissertação* (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos Departamento de Ciências de Alimentos. Campinas. 99f.
- Hubinger, Silvine Zanni. 2009. **Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosméticos de ação antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (*Leguminosae Caesalpinioideae*).** *Dissertação* (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Brasil. 150f.
- Kaminski, Tamsyn. 2017. **Características de qualidade do pólen apícola desidratado.** *Dissertação* (Mestrado em Alimentação e Nutrição do Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição), Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
- Khalil, F. A., e Elsheikh, N. M. 2010. **The effects of dietary Egyptian propolis and bee pollen supplementation against toxicity of sodium fluoride in rats.** *Journal of American Science*, v. 6, 310–316.
- Koleva, I. I.; Van Beek, T. A.; Linssen, J. P. H.; Groot, A.; Evstatieva, L. N. 2002. **Screening of plant extracts for antioxidant activity: a coparative study on three testing methods.** *Phytochemical Analysis*, v.13, p.8-17,
- Komosinska-Vassev, K.; Olczyk, P.; Kafmierczak, J.; Mencner, L.; Olczyk, K. 2015. **Bee pollen: chemical composition and therapeutic application.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015.
- LeBlanc, B. W.; Davis, O. K.; Boue, S.; de Lucca, A.; Deeby, T. 2009. **Antioxidant activity of sonoran desert bee pollen.** *Food Chem.* 115, 1299–1305.
- Leja, M.; Mareczek, A.; Wyzgolik, G.; Klepacz-baniak J.; Czekonska K. 2007.

Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, v.100, n.1, p.237-240.

- Lengler, S. 2002. **Pólen apícola.** Universidade Federal de Santa Maria. Porto Alegre RS, 2 ed. Disponível em: <www.brasilapicola.com.br/node/106>. Acessado em Fevereiro de 2019.
- Lengler, S. 2007. **Os Produtos das Abelhas e seus Efeitos na Saúde Humana.** Artigo Técnico - CBA. Departamento de Zootecnia. Rio Grande do Sul.
- Li, Q-Q.; Wang, K.; Marcucci, M. C.; Sawaya, A. C. H. F.; Hu, L.; Xue, X-F.; Wu, L-M.; Hu, F-L. 2018. **Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites.** *Journal of Functional Foods*, v. 49, 472–484
- Lopes, J.; Stanciu, O. G.; Campos, M. G.; Almaraz-Abarca, N.; Almeida-Muradian, L. B.; Marghitas, L. A. 2011. **Bee pollen antioxidante activity – a review: achievements and further challenges.** *Journal of Pharmacognosy*, v.2, n.2, p.25-38.
- Lu, L. C.; Chen, Y. W.; Chou, C. C. 2003. **Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan.** *Journal of Food and Drug Analysis*, v.1, p.277–282.
- Luz, C.; Bacha, G., Jr.; Fonseca, R.L.E.; Sousa, P. 2010. **Comparative pollen preferences by africanized honeybees *Apis mellifera* L. of two colonies in Para de Minas, Minas Gerais, Brazil.** *Ann. Braz. Acad. Sci.* 82, 293–304.
- Marchini, L. C.; Reis, V. D. A.; Moreti, A. C. C. C. 2006. **Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo.** *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 36, 949-953.
- Martins, M. C. T.; Morgano, M. A.; Vicente, E.; Baggio, S. R.; Rodriguez-Amaya, D. B. 2011. **Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states.** *Journal of Apicultural Science*, 55 (2), 107–116.
- Melo, A. A. M. 2015. **Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 341f.

- Melo, I. L. P.; Almeida-Muradian, L. B. 2011. **Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31.
- Meloni, P. L. S. 2003. **Desidratação de frutas e hortaliças.** *In:* Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria. 10. Fortaleza-Ce, Frutal. **Apostila desidratação de frutas e hortaliças.** Disponível em: <www.ebah.com.br/content/ABAAABUFQAC/apostila-desidracao-frutas-hortalicas> Acessado em Dezembro de 2018.
- Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (2016). **Programa Apícola Nacional 2017-2019.** Disponível a partir de https://www.gpp.pt/images/Programas_e_Apoios/Apoios_de_Mercado/PAN/PAN2017-2019.pdf
- Morais, M. B. C. 2009. **Caracterização e avaliação biológica do pólen português.** *Dissertação* (Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar). Escola Superior Agrária de Bragança, ESA-IBP Bragança, Portugal.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., Estevinho, L. M. 2011. **Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity.** *Food and Chemical Toxicology* 49, 1096–1101.
- Morgano, M. A.; Martins, M. C.; Rabonato, L. C.; Milani, R. F.; Yotsuyanagi, K.; Rodrigues-Amaya, D. B. 2010. **Inorganic Contaminants in Bee Pollen from Southeastern Brazil.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.58, p. 6876-6883.
- Münstedt, K.; Bogdanov, S. 2009. **Bee products and their potential use in modern medicine.** *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1, 57-63.
- Nogueira, C. M. P. 2012. **Estudo do pólen apícola comercial.** *Dissertação* (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Escola Superior Agrária de Bragança. ESA-IBP Bragança, Portugal. 62f.
- Nogueira, C. M. P.; Iglesias, A.; Feás, X.; Estevinho, L. M. F. M. 2012. **Commercial Bee Pollen With Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, 11173-11187.

- Oliveira Júnior, J. V. 2009. **Secador de pólen**. *Mensagem doce online*. São Paulo, n. 104.
- Omnia, M. A.; Hatem, B.; Rania, H. M. A. 2014. **Biochemical effects of propolis and bee pollen in experimentally - induced hyperammonemia in rats**. *Benha Veterinary Medical Journal*, v. 27, 264–276.
- Pires, S. M. A., Rodrigues, T., Rocha, A., Pajuelo, A., Pereira, O. 2005. **Pollen spectra of honeys from Trás-os-Montes e Alto Douro**. *Revista Portuguesa Zootecnia XII*, 1, 87-99.
- Quinteiro, L. M. C.; Nobre, A. L. R.; Ferreira, A. B. B.; Godoy, R. L. O.; CASTRO, I. M. 2003. **Microextração em fase sólida: fundamentos e aplicações em análise de alimentos**. *B.CEPPA, Curitiba*, v. 21, Janeiro/Junho. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1145/946>. Acessado em Novembro de 2019.
- Rocha, J. F. M. 2013. **Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola**. *Dissertação* (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Escola Superior Agrária de Bragança. ESA-IPB. Bragança, Portugal. 111f.
- Rodríguez, G. O.; Ferrer, B. S.; Ferrer, A.; Rodríguez, B. 2004. **Characterization of honey produced in Venezuela**. *Food Chemistry*, v. 84, 499–502.
- Serafini, L. F. 2013. **Atividade antioxidante dos extratos de manjerona e pólen apícola: efeitos na qualidade de hambúrguer**. *Dissertação* (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 136f.
- Silva, T. M. S.; Câmara, C. A.; Lins, A. C. S.; Barbosa-Filho, J. A.; Silva, S. E. M.; Freitas, B. M.; Santos, F. A. B. 2006. **Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke**. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, p.507–511.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A.; Jr. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M.

- S.; Chaves, M. H. 2007. **Fenóis totais e atividade de cinco plantas medicinais.** *Química Nova*, v. 30, 351-355.
- Souza, R. C. S.; Yuyama, L. K. O.; Aguiar, J. P. L.; Oliveira, F. P. M. 2004. **Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica.** *Acta Amazonica*, v. 34, 333-336.
- Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L.; Bento, A.; Pereira, J. A. 2008. **Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras”.** *Food Science and Technology* 41, 739-745, 2008.
- Souza, B. R. 2014. **Quantificação das vitaminas do complexo B (B1, B2) e vitameros das vitaminas B3 e B6 em amostras de pólen apícola desidratado provenientes da Região Sul do Brasil.** *Dissertação* (Mestrado em ciências farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 125f.
- Taha, E. K. A. 2015. **Chemical composition and amounts of mineral elements in honeybee-collected pollen in relation to botanical origin.** *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 75–81.
- Tomás, A. V. F. 2013. **“Pão de abelha” do Nordeste Transmontano: caracterização química, nutricional e atividade antioxidante.** *Dissertação* (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais). Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca. Bragança. Portugal. 85f.
- Yıldız, O.; Can, Z.; Saral, Ö.; Yuluğ, E.; Öztürk, F.; Canpolat, S.; e Kolaylı, S. 2013. **Hepatoprotective potential of Chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats.** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, v. 2013, 461478.

ANEXOS

ANEXO 1. Tabela IX – Análise do valor nutricional e atividade antioxidante das amostras de pólen apícola após aplicação das diversas metodologias de preservação ao longo do tempo.

MÉTODO DE PRESERVAÇÃO	Imediatamente após aplicação da técnica de preservação				
	Congelamento, -20°C	Secagem, 35°C	Secagem, 40°C	Secagem, 45°C	Liofilização
Humidade (%)	13,79 ± 0,08 d	9,62 ± 0,17 b	9,81 ± 0,14 bc	10,14 ± 0,12 c	5,79 ± 0,14 a
Cinza (%)	2,23 ± 0,01 a	2,31 ± 0,06 ab	2,26 ± 0,03 a	2,27 ± 0,04 a	2,38 ± 0,05 b
Gordura (%)	1,65 ± 0,27 a	1,60 ± 0,11 a	1,63 ± 0,31 a	1,52 ± 0,15 a	2,20 ± 0,90 a
Proteína (%)	26,53 ± 0,37 b	25,39 ± 0,55 ab	25,69 ± 0,36 ab	24,61 ± 0,64 a	26,26 ± 0,48 b
Frutose (mg/g)	181,91 ± 5,73 a	194,73 ± 3,40 b	194,67 ± 3,37 b	191,47 ± 4,89 ab	191,25 ± 4,11 ab
Glucose (mg/g)	154,39 ± 4,33 ab	168,19 ± 3,22 c	162,31 ± 4,42 bc	151,63 ± 4,00 a	161,79 ± 3,62 abc
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g)	1,63 ± 0,11 bc	1,48 ± 0,20 a	1,83 ± 0,15 abc	2,02 ± 0,27 bc	2,31 ± 0,13 c
DPPH (EC50 mg/mL)	0,066 ± 0,00 a	0,042 ± 0,02 b	0,043 ± 0,02 b	0,043 ± 0,02 b	0,049 ± 0,00 c
Poder Redutor (mg EAG/g)	0,332 ± 0,06 a	0,485 ± 0,09 a	0,725 ± 0,06 b	0,907 ± 0,04 c	0,871 ± 0,06 bc
Após um período de armazenamento de 1 mês					
Humidade (%)	13,13 ± 0,10 d	9,78 ± 0,08 c	9,23 ± 0,05 b	9,68 ± 0,13 c	5,37 ± 0,07 a
Cinza (%)	2,12 ± 0,02 a	2,31 ± 0,03 cd	2,25 ± 0,02 b	2,18 ± 0,06 ab	2,36 ± 0,03 d
Gordura (%)	1,37 ± 0,28 a	1,64 ± 0,13 a	1,56 ± 0,22 a	1,09 ± 0,26 a	2,84 ± 0,85 b
Proteína (%)	24,63 ± 0,91 a	25,43 ± 0,56 ab	25,52 ± 0,85 ab	25,64 ± 1,24 ab	27,36 ± 1,17 b
Frutose (mg/g)	194,82 ± 3,15 ab	187,16 ± 4,58 a	198,50 ± 4,90 ab	186,94 ± 8,04 a	200,87 ± 1,78 b
Glucose (mg/g)	168,62 ± 1,98 b	161,45 ± 1,87 ab	163,35 ± 3,81 b	152,61 ± 6,21 a	170,66 ± 0,98 b
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g)	1,33 ± 0,04 a	1,62 ± 0,39 ab	1,99 ± 0,06 b	1,37 ± 0,08 a	1,51 ± 0,10 ab
DPPH (EC50 mg/mL)	0,064 ± 0,01 a	0,102 ± 0,00 b	0,050 ± 0,00 a	0,064 ± 0,01 a	0,065 ± 0,01 a
Poder Redutor (mg EAG/g)	0,366 ± 0,03 a	0,342 ± 0,03 a	0,673 ± 0,12 c	0,476 ± 0,05 ab	0,529 ± 0,03 bc
Após um período de armazenamento de 3 mês					
Humidade (%)	12,79 ± 0,13 c	9,54 ± 0,23 b	9,60 ± 0,07 b	10,01 ± 0,31 b	5,51 ± 0,37 a
Cinza (%)	2,25 ± 0,01 a	2,32 ± 0,11 a	2,37 ± 0,01 a	2,38 ± 0,03 a	2,57 ± 0,04 b
Gordura (%)	1,72 ± 0,06 a	2,15 ± 0,68 a	1,67 ± 0,08 a	1,24 ± 0,02 a	1,96 ± 0,39 a

ANEXO 1. Tabela IX (cont.) – Análise do valor nutricional e atividade antioxidante das amostras de pólen apícola após aplicação das diversas metodologias de preservação ao longo do tempo.

Proteína (%)	23,97 ± 0,76 a	26,05 ± 0,33 bc	26,02 ± 0,45 b	26,53 ± 0,38 bc	27,19 ± 0,36 c
Frutose (mg/g)	197,36 ± 2,89 cd	185,89 ± 9,06 c	146,27 ± 1,35 a	170,97 ± 5,60 b	202,35 ± 5,22 d
Glucose (mg/g)	164,02 ± 3,69 bc	157,58 ± 8,64 b	187,43 ± 0,33 d	136,15 ± 3,13 a	173,43 ± 3,05 c
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g)	0,85 ± 0,32 a	1,83 ± 0,23 b	2,14 ± 0,06 b	1,75 ± 0,10 b	2,09 ± 0,13 b
DPPH (EC50 mg/mL)	0,049 ± 0,00 a	0,084 ± 0,00 a	0,048 ± 0,00 a	0,022 ± 0,29 a	0,062 ± 0,00 a
Poder Redutor (mg EAG/g)	0,568 ± 0,02 abc	0,504 ± 0,05 ab	0,715 ± 0,02 c	0,483 ± 0,05 a	0,682 ± 13 bc
Após um período de armazenamento de 6 mês					
Humidade (%)	12,16 ± 0,36 b	11,17 ± 2,57 b	9,67 ± 0,08 b	10,09 ± 0,09 b	5,34 ± 0,11 a
Cinza (%)	2,21 ± 0,01 a	2,27 ± 2,93 a	2,13 ± 0,28 a	2,24 ± 0,00 a	2,35 ± 0,05 a
Gordura (%)	1,83 ± 0,28 a	1,92 ± 0,21 a	1,88 ± 0,09 a	2,28 ± 0,99 a	1,54 ± 0,04 a
Proteína (%)	24,17 ± 0,61 a	25,38 ± 0,67 a	28,04 ± 1,21 a	24,81 ± 1,02 a	26,57 ± 1,04 a
Frutose (mg/g)	221,49 ± 6,70 c	177,79 ± 1,65 ab	185,36 ± 0,85 b	173,11 ± 1,23 a	184,38 ± 1,76 b
Glucose (mg/g)	189,37 ± 3,62 d	137,05 ± 3,23 b	132,68 ± 4,61 ab	122,92 ± 5,08 a	159,20 ± 0,32 c
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g)	1,74 ± 0,04 b	2,81 ± 0,13 c	1,90 ± 0,09 b	1,25 ± 0,04 a	1,70 ± 0,08 b
DPPH (EC50 mg/mL)	0,051 ± 0,00 c	0,036 ± 0,00 a	0,047 ± 0,00 b	0,093 ± 0,00 d	0,051 ± 0,00 c
Poder Redutor (mg EAG/g)	0,113 ± 0,01 ab	0,235 ± 0,01 d	0,203 ± 0,01 bc	0,087 ± 0,02 a	0,187 ± 0,04 cd
Após um período de armazenamento de 9 mês					
Humidade (%)	12,76 ± 0,07 e	9,64 ± 0,04 c	9,43 ± 0,08 b	10,10 ± 0,07 d	5,72 ± 0,05 a
Cinza (%)	2,27 ± 0,00 a	2,31 ± 0,01 ab	2,28 ± 0,02 a	2,28 ± 0,03 a	2,36 ± 0,03 b
Gordura (%)	1,59 ± 0,29 a	1,72 ± 0,11 a	2,71 ± 1,23 a	1,59 ± 0,35 a	1,67 ± 0,09 a
Proteína (%)	22,71 ± 0,29 a	24,14 ± 0,43 a	23,81 ± 1,46 a	23,82 ± 1,20 a	26,24 ± 0,68 a
Frutose (mg/g)	163,88 ± 2,43 a	191,60 ± 2,67 c	173,21 ± 2,40 b	168,40 ± 2,90 ab	175,81 ± 5,91 b
Glucose (mg/g)	108,07 ± 2,53 a	129,56 ± 1,41 b	114,64 ± 3,57 a	113,99 ± 3,91 a	158,20 ± 5,54 c
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g)	2,06 ± 0,20 b	1,55 ± 0,10 b	2,07 ± 0,13 a	2,69 ± 0,15 b	1,97 ± 0,06 c
DPPH (EC50 mg/mL)	0,129 ± 0,00 d	0,053 ± 0,00 b	0,031 ± 0,00 a	0,056 ± 0,00 b	0,066 ± 0,00 c
Poder Redutor (mg EAG/g)	0,102 ± 0,24 a	0,115 ± 0,13 a	0,154 ± 0,23 b	0,220 ± 0,51 b	0,159 ± 0,30 ab

International Symposium Bee Products: 7th – 10th May/2019

Preservation techniques and their impact on bee pollen chemical and microbiological composition

Authors

Filipe H. C. Lema¹, Imen Mekki¹, Soraia I. Falcão¹, Andreia V. F. Tomás¹, Paula Rodrigues¹, Vítor M. R. Martins^{1,2}, Miguel Vilas-Boas¹ [*vmartins@ipb.pt](mailto:vmartins@ipb.pt)

Working address

1: Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.

2: QOPNA & LAQV-REQUIMTE - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Abstract

In Portugal, beekeeping is closely related to the agriculture sector, often acting as a complement to the exploration income. The pollen is one of the hive products and it has been receiving a lot of attention from researchers. Honeybees produce bee pollen through the agglutination of flower nectar with salivary substances, together with little amounts of nectar or honey. Bees collect pollen based on the hive food necessities and store it separately from honey.

Although bee pollen has been used as a food supplement for many years, due to its antioxidant, antibacterial, and antifungal properties, it continues being undervalued. As a result, there is a relatively small range of bee pollen products in the Portuguese market, in comparison with the considerably larger number of honey products, for example. This can be partially explained by the lack of information that beekeepers have regarding aspects such as the beneficial effects of bee pollen and about the influence of preservation techniques in the chemical composition and quality of bee pollen. Therefore, this work pretends to contribute to a better understanding of the possible impact of various

preservation techniques on the bee pollen chemical composition and microbiological quality and safety parameters.

The bee pollen was collected using pollen traps and subsequently submitted to distinct preservation techniques, such as oven drying at 35 °C, 40 °C, and 45°C, freezing, and freeze-drying. The effect of these preservation techniques on the bee pollen chemical composition was evaluated through the determination of the moisture, ash, protein, and crude fat contents. The effect on the microbiological parameters included the analysis of: total viable counts (aerobic mesophiles), lactic acid bacteria, yeasts and moulds, coliforms / *E. coli*, *Salmonella* spp. and sulphite-reducing clostridia.

Acknowledgment: This work was financed by the Rural Development Program 2014-2020, PDR 2020, through the project DivInA, PDR2020-101-031734.

The impact of preservation techniques on bee pollen nutritional value, microbiological stability, and antioxidant properties

Filipe Lema¹, Imen Mekki¹, Andreia Tomás¹, Soraia Falcão¹, Paula Rodrigues¹, Vítor Martins^{1,2}, Miguel Vilas-Boas¹ *vmartins@ipb.pt

¹ Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

² QOPNA & LAQV-REQUIMTE -Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Abstract

After its collection the bee pollen can present moisture contents that can range from 18% to 25%. These moisture contents, combined with the high nutritional value of bee pollen, provide conditions highly favourable to microorganism growth, undesirable pollen fermentation, and reduction of the nutritional value, caused by Maillard reactions. Thus, after collection it is necessary to reduce the bee pollen moisture content in order to maintain its overall nutritional quality and microbiological safety. Moreover, several studies have recently highlighted the beneficial biological properties of bee pollen, which may also be influenced by the preservation techniques applied to reduce the bee pollen moisture content. Therefore, the main objective of this work is to provide an insight regarding the potential influence of the applied preservation techniques on the nutritional value, microbiological quality, and antioxidant properties of bee pollen.

The bee pollen, which was collected in beehives located in the northeastern Portuguese region of Bragança, presented a moisture content of 13.8%. Subsequently, the fresh pollen was submitted to various preservation techniques, namely oven drying at three distinct temperatures (35°C, 40°C, and 45°C) and freeze-drying. The pollen samples dried at 35°C, 40°C, and 45°C presented moisture contents of 9.6%, 9.8%, and 10.1%, while the freeze-dried sample had a moisture content of 5.8%. The nutritional value, microbiological quality, and antioxidant properties of the preserved bee pollen was assessed throughout time during a period of 6 months. In general, the different treatments showed no significant immediate impact on the nutritional value and microbiological loads of bee pollen, but some changes were observed on the antioxidant properties, particularly for the oven-dried bee pollen. Also, during the storage period, mostly in microbiological parameters, such as total viable counts and lactic acid bacteria, and antioxidant properties. Also, impact on the microbiological loads of bee pollen, but changes were observed after one month of storage, mostly in total viable counts and lactic acid bacteria.

Keyword: pollen; preservation techniques; nutritional value; microbiological stability; antioxidant properties

Acknowledgment: This work was financed by the Rural Development Program 2014 2020, PDR 2020, through the project DivInA, PDR2020-101-031734.

Nutritional and palynological screening of bee pollen from different regions of Portugal

Andreia Tomás¹, **Filipe H. C. Lema**¹, Vítor Manuel R. Martins¹, José L. Teixeira², Paulo Russo-Almeida², Miguel Vilas-Boas¹

1: Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

2: Laboratório Apícola-LabApis-Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Departamento de Zootecnia, 5000-801 Vila Real, Portugal

Pollen is a product with an increasing market potential, particularly in the nutraceutical and food supplements segment. Besides of its image association with natural products, it is a source of proteins, rich in minerals, antioxidant compounds and essential amino acids. This composition richness is also the reason why honeybees rely in its collection to feed the colony. Bees fly from flower to flower and agglutinate the pollen grains through the addition of salivary substances and small amounts of nectar, which are then transport into the hive as a pollen load, the bee pollen.

This work is part of the project DivInA, Diversification and Innovation in Beekeeping, (financed by the Rural Development Program 2014-2020), and aims to diversify the outcomes of the Portuguese beekeepers in order to increase its profitability and guarantee the sustainability of its economic activity.

In this communication, the nutritional value and palynological profile of 31 pollen samples, collected from four regions of Portugal, during spring and summer of 2018, are presented. The nutritional parameters include ash, moisture, total fat, total protein, and total carbohydrate contents. The palynological analysis was achieved by microscopy and comparison with the pollen database available in the laboratory.

Besides the variation in humidity of the samples, which ranged from 9 to 30%, the major nutritional parameters of the samples were in agreement with the values reported in the literature. Nevertheless, it seems clear that the differences registered in the evaluated nutritional parameters reflect the floral differences between samples.

Acknowledgment: This work was financed by the Rural Development Program 2014-2020, PDR 2020.

Bee pollen nutritional value and microbiological stability: influence of preservation techniques

Imen Mekki¹, **Filipe H. C. Lema**¹, Andreia Tomás¹, Soraia I. Falcão¹, Vítor Manuel R. Martins^{1,2},
Paula Rodrigues¹, Miguel Vilas-Boas¹

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

²QOPNA & LAQV-REQUIMTE -Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Abstract

Bee pollen is often considered a highly nutritive foodstuff. After its collection, the bee pollen can present moisture contents ranging from 18% to 25%, depending on the gathering season and trapping technique [1]. These moisture contents, combined with the high nutritional value of bee pollen, provide conditions highly favourable to microorganism growth and undesirable pollen fermentation. Moreover, when not preserved adequately, its nutritional value can be quickly reduced, due to Maillard reactions [2]. Thus, after collection it is necessary to reduce the bee pollen moisture content in order to maintain its overall nutritional quality and microbiological safety. The main objective of this work is to provide an insight regarding the potential influence of the applied preservation techniques on the nutritional value and microbiological quality of bee pollen.

The bee pollen, which was collected in beehives located in the northeastern Portuguese region of Bragança, had a moisture content of 13.8%. Subsequently, the fresh pollen was submitted to various preservation techniques, namely oven drying at three distinct temperatures (35°C, 40°C, and 45°C) and freeze-drying. The pollen samples dried at 35°C, 40°C, and 45°C presented moisture contents of 9.6%, 9.8%, and 10.1%, while the freeze-dried sample had a moisture content of 5.8%. The nutritional value of the preserved bee pollen was assessed throughout time during a period of 6 months, through the determination of the moisture, ash, protein, crude fat, and carbohydrate contents. The effect on the microbiological quality was also analysed, and included the parameters: total viable counts (aerobic mesophiles), lactic acid bacteria, yeasts and moulds. In general, the

different treatments showed no significant immediate impact on the microbiological loads of bee pollen, but changes were observed after one month of storage, mostly in total viable counts and lactic acid bacteria.

Keywords: bee pollen, nutritional value, microbiological quality, stability

References

- [1] Casaca, J. D. (2010). Manual de produção de pólen e própolis. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal (Eds.), Lisboa.
- [2] Almeida-Muradian, L. B.; Pamplona, L. C.; Coimbra, S.; Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J. Food Compos. Anal.*, 18, 105–111.

Acknowledgment: This work was financed by the Rural Development Program 2014-2020, PDR 2020, through the project DivInA, PDR2020-101-031734.

**ENCONTRO DOS JOVENS INVESTIGADORES DO INSTITUTO POLITÉCNICO
DE BRAGANÇA - EJI2019**

Preservation methods and their impact on the chemical composition and antioxidant activity of bee pollen

Filipe Lema¹, Andreia Tomás¹, Vítor Martins^{1,2*}, Miguel Vilas-Boas¹

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

²QOPNA & LAQV-REQUIMTE, Aveiro, Portugal

*e-mail: vmartins@ipb.pt

Abstract

The moisture content of bee pollen is a crucial parameter for its preservation and quality. After collection, fresh pollen is frozen and then subjected to preservation methods prior to commercialization. Some studies have shown that the choice of the preservation method can have an impact on chemical composition and pollen antioxidant activity. Thus, this work aims to evaluate the impact of various preservation methods on the chemical composition and antioxidant activity of pollen, immediately after its application and also over a storage period of 6 months. The pollen was collected in Bragança and frozen at -20°C, and then preserved by freeze-drying and oven-drying at 35°C, 40°C, and 45°C. Chemical composition (moisture, ash, fat, protein, fructose, glucose and total phenolic compounds) and antioxidant activity (DPPH and reducing power) were evaluated immediately after applying the preservation method and during 6 months of storage. Besides the expected reduction on the pollen moisture level, the most evident and statistically significant effects were observed on the glucose and total phenolic compounds contents, and antioxidant activity, immediately after applying the preservation technique, as well as after a storage period of 6 months.

Generally, freeze-drying was the preservation technique with less impact on the nutritional value of pollen. However, it had a more pronounced negative impact on the total phenolic compounds content and pollen antioxidant activity, when compared with oven-drying at 35°C.

Keywords: pollen; preservation methods; chemical composition; antioxidant activity.

Funding: This work was supported by the Rural Development Program 2014-2020, PDR 2020, through the project DivInA, PDR2020-101-031734.



Preservation techniques and their impact on bee pollen chemical and microbiological composition

Filipe H. C. Lema¹, Imen Mekki¹, Soraia I. Falcão¹, Andreia V. F. Tomás¹, Paula Rodrigues¹, Vitor M. R. Martins^{1,2}, Miguel Vilas-Boas¹.

1: Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.
2: QOPNA & LAQV-REQUIMTE - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Introduction

Bee pollen has been used as a food supplement for many years because of its antioxidant, antibacterial and antifungal properties, and is currently undervalued in the Portuguese market compared to honey [1]. This may be partly explained by the lack of information on the benefits of pollen and on the influence of preservation methods on composition and chemical quality. Therefore, this work will evaluate the possible impact of various preservation techniques, namely freezing, oven drying at 35°C, 40°C and 45°C and freeze-drying, on the chemical composition and microbiological load of the pollen.

Methodology

Bee pollen samples collected in the Bragança region were submitted to various preservation techniques, namely freezing at -20°C, oven drying at 35°C during 15 hours, oven drying at 40°C during 7 hours and 30 minutes, and oven drying at 45°C during 5 hours and 50 minutes, and freeze-frying. The chemical composition (moisture, ash, crude fat and crude protein) was evaluated according to the methodologies described by Almeida -Muradian *et al.*, [2]. The microbiological loads (aerobic mesophiles, lactic acid bacteria, and yeasts and molds) were determined by the methods described in ISO 4833:2013, ISO 15214:1998, and ISO 21527-2:2008, respectively. All the analysis were performed in triplicate.

Results

Chemical composition

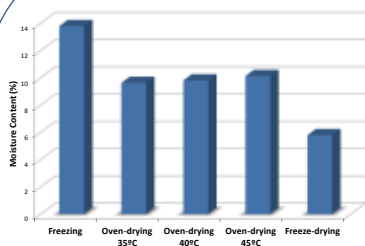


Figure 1- Moisture content of bee pollen samples after applying the preservation techniques.

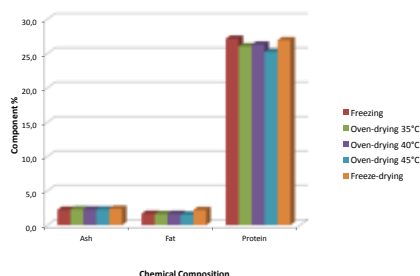


Figure 2- Ash, fat, and protein contents of bee pollen samples after applying the preservation techniques.

Microbiological loads

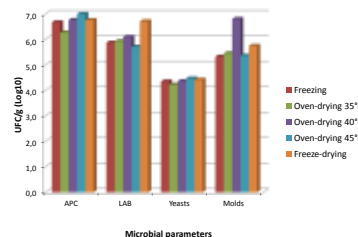


Figure 3- Aerobic mesophiles (APC), lactic acid bacteria (LAB), yeasts, and molds loads of bee pollen samples after applying the preservation techniques.

Conclusions

- ❖ The use of oven-drying and freeze-drying preservation techniques reduced the moisture content of bee pollen to values considered safe;
- ❖ The preservation techniques under evaluation did not seem to have an impact on the chemical composition and microbiological loads of the bee pollen samples;
- ❖ Further studies are being carried out in order to evaluate the effect of these preservation techniques on the stability of bee pollen over time.

References

- Li, Q-Q.; Wang, K.; Mareucci, M. C.; Sawaya, A. C. H. F.; Hu, L.; Xue, X-F.; Wu, L-M.; Hu, F-L. 2018, Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, v. 49, 472-484
- Almeida-Muradian, L. B.; Arruda, V. A. S.; Barreto, L. M. R. C. 2012. *Manual de controlo de qualidade do pólen apícola*. São Paulo. APACAME.

Acknowledgments

This work was financed by the Rural Development Program 2014-2020, PDR 2020.



FILIFE LEMA¹, IMEN MEKKI¹, ANDREIA TOMÁS¹, SORAIA FALCÃO¹, PAULA RODRIGUES¹, VITOR MARTINS^{1,2}, MIGUEL VILAS-BOAS¹

¹ Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

² QOPNA & LAQV-REQUIMTE -Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal (e-mail: vmartins@ipb.pt)



Introduction

The moisture content of bee pollen is one of the most important parameters for the preservation and quality of this product and can vary from 18 to 25%, depending on the technique and time of collection [1]. These moisture content values can contribute to proliferation of microbiological contamination and changes in the nutritional value of pollen, which can make its consumption and commercialization unfeasible [2 and 4]. Therefore, this study pretends to evaluate the impact of different preservation techniques in the nutritional value, microbial stability, and antioxidant properties of bee pollen.

Methodology

Pollen samples were collected in Bragança (Portugal) and frozen at -20°C. The frozen samples, which presented an initial moisture content of 13.8%, were subsequently submitted to various preservation techniques: oven drying at three different temperatures (35°C, 40°C and 45°C) and lyophilization. The samples dried at 35°C, 40°C and 45°C presented a moisture content of 9,6%, 9,8% and 10,1%, respectively, and the lyophilized sample presented a moisture content of 5,8%. Nutritional value (moisture, ash, protein, fat, and sugars), total phenolics, antioxidant properties (DPPH and reducing power), and microbiological quality (aerobic mesophiles, lactic acid bacteria, yeast and mold) of pollen were evaluated over time for a period of 6 months (0, 1, 3 and 6 months) of preservation [3].

Results

CHEMICAL PARAMETERS

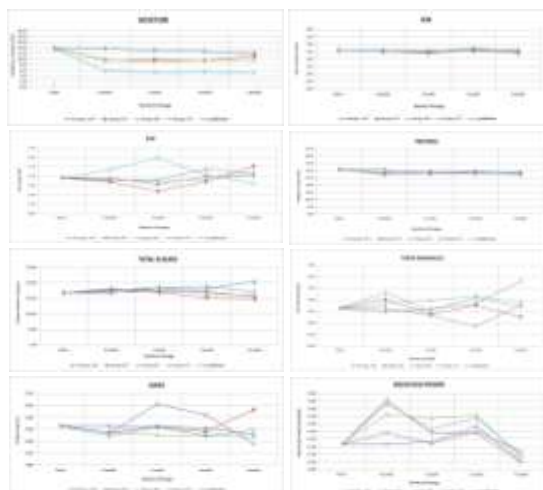


Figure 1. Values of the evaluated chemical parameters (moisture, ash, fat, protein, sugars, total phenolics, DPPH, and reducing power) before applying the preservation treatments and over a storage period of 6 months.

MICROBIAL LOADS

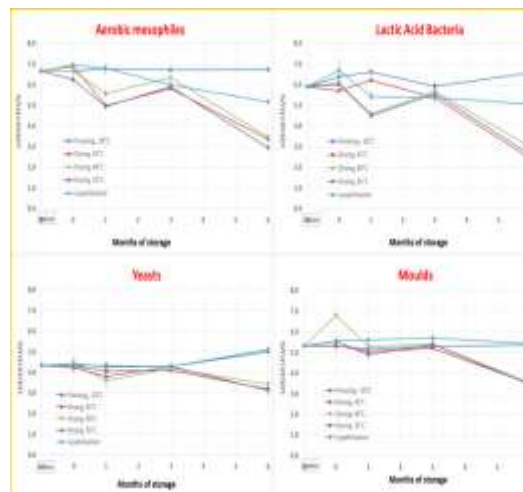


Figure 2. Values of the evaluated microbial parameters (aerobic mesophiles, lactic acid bacteria, yeasts and moulds) before applying the preservation treatments and over a storage period of 6 months.

Conclusions

The different preservation methodologies showed no significant immediate impact on the nutritional value and microbiological loads of bee pollen, but some changes in antioxidant properties were observed, especially in greenhouse dried bee pollen. That is, we can consider the oven drying technique to be suitable for the preservation of bee pollen, with desired microbiological stability that does not compromise its nutritional value.

References

- [1] Casaca, J. D. 2010. **Manual de Produção de Pólen e Própolis – FNAP – Federação Nacional dos Apicultores de Portugal**. Programa Apícola Nacional. Agosto, Portugal.
- [2] Almeida-Muradian, L. B.; Pamplona, L. C.; Coimbra, S.; Barth, O. M. 2005. **Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets**. *Journal of Food Composition and Analysis*, February 2005, v. 18. 105-111
- [3] Almeida-Muradian, L. B.; Arruda, V. A. S.; Barreto, L. M. R. C. 2012. **Manual de controlo de qualidade do pólen apícola**. São Paulo. APACAME.
- [4] Tomás, A. V. F. 2013. **“Pão de abelha” do Nordeste Transmontano: caracterização química, nutricional e atividade antioxidante**. *Dissertação* (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais). Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca. Bragança. Portugal. 85f.

Acknowledgments

This work was financed by the Rural Development Program 2014-2020, PDR 2020, through the project DivIna, PDR2020-101-031734.



Bee pollen nutritional value and microbiological stability: influence of preservation techniques

Imen Mekki¹, Filipe H.C. Lema¹, Andreia Tomás¹, Soraia I. Falcão¹, Vitor M.R. Martins^{1,2},
Paula Rodrigues¹, Miguel Vilas-Boas^{1,*}

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia,
5300-253 Bragança, Portugal

²QOPNA & LAQV-REQUIMTE - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

*email: mvboas@ipb.pt

INTRODUCTION

Bee pollen is an important beehive product, with a rich chemical composition and biological properties, which vary according to the region of production, plant age and agroecological conditions. Its moisture content may vary from 18 - 25%, depending on the technique and the time of collection [1]. Bee pollen is subject to proliferation of microbiological contamination that can make its consumption and commercialization unfeasible when not properly preserved, its nutritional value can be rapidly reduced due to Maillard reactions [2].



METHODOLOGY

Bee pollen samples from Northeast Portugal (Bragança) collected in July 2018 were preserved by: freezing at -20 °C, oven-drying at different temperatures (35 °C for 15 hrs., 40 °C for 7 hrs.30 min., and 45 °C for 5 hrs.50 min.) and lyophilisation. Dried and lyophilised samples were then stored at room temperature, while the remaining samples were kept frozen at -20 °C. Bee pollen samples were evaluated in triplicate for chemical parameters (moisture, ashes, protein, fat, and sugars) [3] and microbial loads (aerobic mesophiles, lactic acid bacteria, yeasts and molds), before the treatments and after 0, 1, 3 and 6 months of preservation.

RESULTS

CHEMICAL PARAMETERS

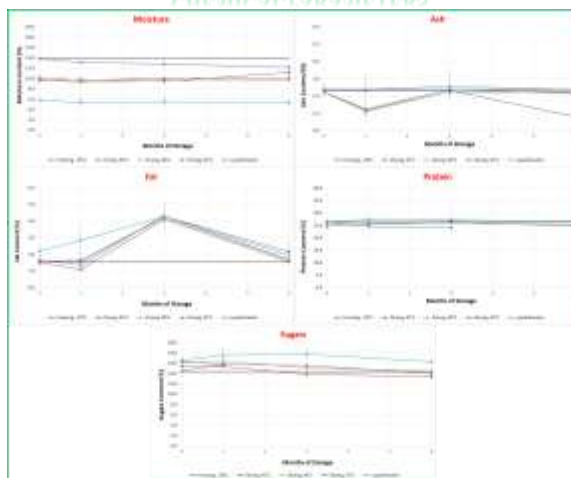


Figure 1. Values of the evaluated chemical parameters (moisture, ash, fat, protein, and sugars) over a storage period of 6 months (dashed line: value before applying the preservation method).

MICROBIAL LOADS

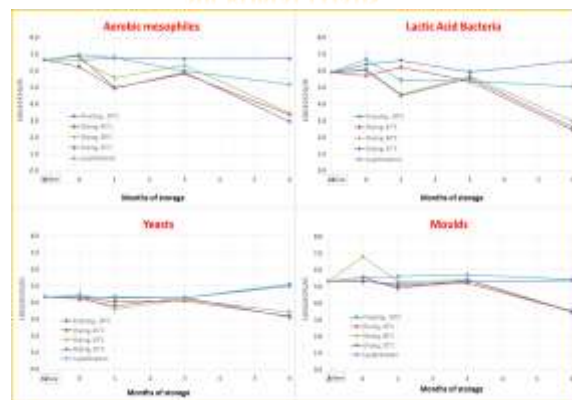


Figure 2. Values of the evaluated microbial parameters (aerobic mesophiles, lactic acid bacteria, yeasts and moulds) before applying the treatments and over a storage period of 6 months.

CONCLUSIONS

The various preservation techniques under evaluation did not seem to have a negative impact on the nutritional value of the bee pollen samples throughout the 6 months of storage period. Moreover, the oven-drying technique (independently of the binomium *temperature x time* used) caused a decrease in the microbial loads after a storage period of 3 to 6 months. Therefore, the oven-drying techniques can be considered as adequate, easy and inexpensive preservation techniques, providing bee pollen with the desired microbiological stability without compromising its nutritional value. The study of the impact of these preservation techniques on the biological activity of bee pollen is underway.

References

- [1] Casaca, J. D. 2010. *Manual de Produção de Pólen e Própolis – FNAP – Federação Nacional dos Apicultores de Portugal*. Programa Apícola Nacional. Agosto, Portugal.
- [2] Almeida-Muradian, L. B.; Pamplona, L. C.; Coimbra, S.; Barth, O. M. 2005. *Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets*. *Journal of Food Composition and Analysis*, February 2005, v. 18, 105-111
- [3] Almeida-Muradian, L. B.; Arruda, V. A. S.; Barreto, L. M. R. C. 2012. *Manual de controlo de qualidade do pólen apícola*. São Paulo. APACAME.

Acknowledgments

This work was financed by the Rural Development Program 2014-2020, PDR 2020.

