



Estudo do polén apícola comercial

Carla Manuela Pimenta Nogueira

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

Orientado por

Profa Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Bragança

2012



*“Sofremos muito com o pouco que nos falta
e gozamos pouco o muito que temos.”*

William Shakespeare

Agradecimentos

Deixo aqui o agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar á minha orientadora, Professora Doutora Letícia Estevinho, pela grande ajuda ao longo do trabalho, laboratorial e escrito, pela permanente disponibilidade, incentivo e amizade demonstrada.

Ao Professor Doutor Luís Dias pela disponibilidade, os conhecimentos e pela experiencia partilhada.

Aos meus colegas, e funcionárias do Laboratório de Microbiologia, D^a Arminda, D^a Fátima e Ana Paula, pelo acolhimento e disponibilidade e pelas condições materiais indispensáveis á realização da parte experimental deste trabalho.

A todos os Docentes do Instituto Politécnico de Bragança que de uma forma ou de outra, pelos seus ensinamentos, contribuíram para o meu progresso académico.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a tornar este projeto possível.

Finalmente ao Pedro e á minha família, Mãe, Pai e Irmão, pelo constante e incondicional apoio, incentivo ao longo deste percurso académico, pela confiança sempre transmitida, o meu eterno agradecimento.

Índice

Capítulo I.....	1
1 - Introdução	2
2- Pólen	3
2.1- Definições e funções	3
2.2 - Abelha Apis melífera	4
2.3 - Palinologia.....	4
3 – Pólen Apícola	6
3.1 – Recolha, conservação e armazenamento	6
3.2 - Composição físico química e valor nutricional	8
3.3 – Inocuidade do pólen apícola.....	9
3.4 - Benefícios do pólen.....	10
3.5 - Informação ao consumidor – Rótulo.....	10
Capítulo II.....	12
4. Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach.....	13
4.1 Introduction.....	15
4.2. Results and Discussion	16
4.2.1. Labeling and Information to Consumers.....	16
4.2.2. Pollinic Identification.....	17
4.2.3. Chemical Composition.....	18
4.2.4. Microbial Contamination	23
4.2.5. Isolation and Identification of Yeasts.....	25
4.3. Experimental Section	26
4.3.1. Samples	26
4.3.2. Chemicals and Materials	27
4.3.3. Labeling.....	27
4.3.4. Pollinic Identification.....	27
4.3.5. Physicochemical Analyses	28
4.3.5.1. Moisture	28
4.3.5.2. Ash.....	28
4.3.5.3. pH.....	28
4.3.5.4. Reducing Sugars	28
4.3.5.5. Water Activity	29
4.3.5.6. Lipids.....	29
4.3.5.7. Proteins.....	29
4.3.5.8. Carbohydrates.....	29
4.3.5.9. Energy.....	30
4.3.6. Microbiological Determinations.....	30
4.3.6.1. Sample Preparation	30

4.3.6.2. Enumeration of the Total Mesophilic Microorganisms	30
4.3.6.3. Enumeration of Yeast and Moulds	30
4.3.6.4. Sulfite Reducing Clostridium Spores.....	31
4.3.6.5. Fecal coliforms and Escherichia coli	31
4.3.6.6. Salmonella	31
4.3.7. Isolation and Identification of Yeasts.....	31
4.3.8. Statistical Analysis	32
4.4. Conclusions.....	32
4.5. References.....	33
Capítulo III.....	37
5. Avaliação das propriedades Bioativas do pólen comercial	38
5.1 – Material e Métodos.....	38
5.1.1 - Preparação dos Extratos Etanólicos do Pólen	38
5.1.2 - Propriedades bioativas do pólen	39
5.1.2.1 - Compostos Fenólicos Totais.....	39
5.1.2.2 Atividade antioxidante	39
5.1.2.2.1 Método do DPPH.....	39
5.1.2.2.2 Método do Poder redutor	40
5.1.2.3 Atividade antimicrobiana.....	40
6.1 - Propriedades bioativas do pólen.....	42
6.1.2 - Análise aos Fenóis Totais	42
6.1.3 - Análise á atividade Antioxidante (DPPH e poder redutor)	43
6.1.4 - Atividade Antimicrobiana.....	45
7 – Considerações finais	46
8 - Referências bibliográficas	47

Resumo

O pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas, mediante acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel [20]. O pólen é um produto utilizado na alimentação humana como suplemento alimentar pois contém substâncias nutricionais essenciais, como hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, lípidos, vitaminas, substâncias minerais e oligoelementos, além de quantidades significativas de compostos fenólicos principalmente flavonóides. Possui também efeitos benéficos para a saúde humana como a prevenção de problemas da próstata, dessensibilização de alergias, aterosclerose e neoplasias.

O presente estudo teve como objetivo analisar o rótulo, as propriedades físico-químicas e nutricionais, a segurança microbiológica e ainda as propriedades bioativas de oito amostras de pólen adquiridos no mercado.

Da análise ao rótulo verificou-se que 12,5% das amostras não apresentavam todas as menções obrigatórias.

Para as amostras de pólen comercial foram identificadas 11 famílias sendo o tipo *Cistaceae* o dominante.

No que diz respeito às análises físico químicas todos os parâmetros analisados, á exceção da humidade, encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação Brasileira. Os valores para o pH variaram entre 4,23 e 5,03, enquanto que a aw oscilou entre 0,26 e 0,43.

Os teores em proteínas e açúcares redutores variaram respetivamente, entre 12,50 e 25,15% e, entre 26,10 e 41,79%. Os teores em lípidos das amostras em estudo foram baixos, variando entre 2,35 e 3,33%. Estes resultados sugerem que o pólen apícola é um excelente suplemento alimentar.

No que diz respeito á qualidade microbiológica os valores obtidos para os indicadores de qualidade comercial, sanitária e de segurança indicam que o pólen apícola é um alimento seguro. Em 50% das amostras analisadas estavam presentes leveduras, no entanto o número foi baixo. Das leveduras isoladas foram identificadas seis espécies.

Os teores de compostos fenólicos totais variaram entre 16,079 a 45,953 mg GAE/g.

A atividade antioxidante (EC_{50}) dos extratos etanólicos de pólen foi de 1,95mg/mL e 1,62mg/mL quando determinado pelo método do DPPH e pelo método do poder redutor, respectivamente.

Os EEP mostraram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos.

Palavras chave: Pólen apícola, caracterização do pólen, análise polínica, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Abstract

The bee pollen is the result of agglutination of pollen carried by bees from flowers by adding substances salivary and small amounts of nectar or honey [20]. Pollen is a product used in food as a dietary supplement it contains nutritionally essential substances such as carbohydrates, proteins, amino acids, lipids, vitamins, minerals and trace elements, as well as significant quantities of phenolic compounds mainly flavonoids. It also has beneficial effects on human health and the prevention of prostate problems, allergy desensitization, atherosclerosis and cancer.

The present study aimed to examine the label, the physico-chemical and nutritional, microbiological safety and even the bioactive properties of eight pollen samples purchased from the market.

Analysis of the label was found that 12.5% of all samples had not mandatory.

For samples of commercial pollen were identified 11 families being the dominant type Cistaceae.

With regard to physical chemical analyzes all parameters, except for the humidity will, were within the limits established by Brazilian legislation. Values for the pH varied between 4.23 and 5.03, while A_w ranged between 0.26 and 0.43.

The amounts of proteins and reducing sugars ranged respectively between 12.50 and 25.15% and between 26.10 and 41.79%. The lipid content of the samples in the study were low, ranging between 2.35 and 3.33%. These results suggest that the pollen load is an excellent dietary supplement.

With regard to the quality values obtained for microbiological indicators of commercial quality, health and safety suggest that bee pollen is a food secure. In 50% of the samples analyzed were present yeasts, however the number was low. From the yeasts were identified six species.

The content of total phenolic compounds ranged from 16.079 to 45.953 mg GAE / g.

The antioxidant activity (EC50) of ethanol extracts of pollen was 1.95 mg / mL and 1.62 mg / ml when determined by the method of DPPH and method of reducing power, respectively.

The EEP showed antimicrobial activity against all microorganisms.

Keywords: bee pollen, characterization of pollen, pollen analysis, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Índice de Figuras

Figura 1 - Abelha a armazenar pólen (fonte: FNAP, 2010).....	3
Figura 2 - Exemplos de tipos polínicos de pólen (fonte: Carpes 2008).....	5
Figura 3 - Capta-pólen (fonte: FNAP, 2010)	6
Figura 4 - Secador de pólen (fonte: FNAP, 2010).....	7
Figure 5 - Percentage of the yeasts isolated from the samples.....	25
Figure 6 - Place of origin of the commercial bee pollen. The origin of Sample A was not specified in the labeling.....	27
Figura 7 - Concentração dos compostos fenólicos nas várias amostras.	42
Figura 8 - Valores de EC ₅₀ para o poder redutor e para DPPH.....	43
Figura 9 – Valores da capacidade redutora para os diferentes extratos etanólicos de pólen.....	44
Figura 10 - Efeito bloqueador do radical DPPH em percentagem, dos diferentes extratos etanólicos de pólen.....	44

Índice de Tabelas

Table 1 - Results of the commercial bee pollen labeling analysis.....	16
Table 2 - Palynological spectrum of the eight commercial bee pollen (mean ± standard deviation; n = 3).....	20
Table 3 - Proximate chemical composition (g/100 g of fresh weight) and energetic value (kcal) of the eight bee pollen samples (mean ± standard deviation; n = 3).....	21
Table 4 - Microbial analyses of eight commercial bee pollen samples (mean ± standard deviation; n = 3).....	24
Tabela 5 – Atividade antimicrobiana das várias amostras de pólen contra bactérias e leveduras.....	45

Capítulo I



1 - Introdução

O pólen apícola tem vindo a ser considerado como um alimento diferenciado, devido às suas características terapêuticas e diatélicas benéficas para a saúde humana, embora o mel seja o produto da colmeia mais comum.

O pólen pode ser considerado como uma fonte de energia e de nutrientes para o Homem pois contém substâncias nutricionais como hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, lípidos, minerais, vitaminas e alguns micronutrientes.

A composição do pólen apícola depende da origem botânica e geográfica, bem como das condições climáticas, tipo de solo e do manejo apícola. Por conter todos os aminoácidos essenciais necessários ao organismo humano, este produto é considerado como um alimento completo.

Apicultura é uma atividade valiosa do ponto de vista social, ambiental e económico, no entanto, a produção de pólen apícola em Portugal é muito reduzida, talvez devido, principalmente, ao desconhecimento por parte dos apicultores e dos consumidores, dos atributos que este produto possui. E á falta de métodos de conservação, adequados.

A falta de legislação Portuguesa relativa a este produto da colmeia, torna essencial a sua caracterização, a fim de contribuir para a elaboração de critérios (normas), que permitam valorizar este produto apícola em Portugal.

Este trabalho tem como objetivos:

- Avaliação do rótulo;
- Caracterização botânica;
- Caracterização físico-química e nutricional;
- Avaliação da qualidade microbiológica;
- Avaliação das propriedades bioativas;

2- Pólen

2.1- Definições e funções

O pólen é o gameta masculino das flores das plantas, sendo produzido pelas anteras e atraído pelo ovário com o objetivo de garantir a fecundação e consequentemente a reprodução da planta, assim como a sobrevivência da espécie. Os pólenes são formados por minúsculos grãos (50 μm) [19] com formas e cores diversas, e normalmente com forma esférica. O pólen apícola é recolhido pelas abelhas e levado para o interior da colmeia, sendo utilizado na preparação do alimento das larvas jovens, devido ao seu alto valor nutritivo.

As abelhas recolhem os grãos de pólen das anteras, e agregam-no com o auxílio de néctar e de saliva. Posteriormente é transportado com as patas dianteiras, mais especificamente com a tíbia, até a colmeia, onde o depositam nos alvéolos. Durante o transporte do pólen, as abelhas recorrem às suas características físicas, como os pentes e pêlos que possuem espalhados pelo corpo.

A seletividade das abelhas em relação às espécies vegetais tem em conta a qualidade e a quantidade de recursos disponíveis [47], com vista a obter uma maior eficiência da recolha numa determinada área geográfica [48]. As abelhas visitam uma ou varias espécies florais para um pólen completo, e as características específicas deste produto, estão ligadas às espécies florais e cultivares, visitadas pelas abelhas. A composição química dos grãos de pólen e o seu valor nutricional depende da “escolha” da planta a polinizar pelas abelhas. O desenvolvimento das abelhas depende da sua alimentação, tipo de pólen, pois a sua origem botânica interfere na quantidade de vitaminas, proteínas, hidratos de carbono, minerais e açucars [49].



Figura 1 - Abelha a armazenar pólen (fonte: FNAP, 2010)

A importância do pólen é indubitável, quer para a colónia quer para os produtos derivados da colmeia, de fato a quantidade e a qualidade do pólen estão diretamente relacionados com a produção de mel, cera e geleia real de um apiário [26].

2.2 - Abelha *Apis melífera*

Desde a antiguidade as abelhas têm sido valorizadas pelos seus produtos e admiradas pelo seu comportamento. Pertencem á ordem *Hymenoptera*, classificada em duas subordens e várias superfamílias divididas em inúmeras espécies. Conhecem-se mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam mais do dobro que ainda não foram descobertas [50].

As abelhas são descendentes das vespas, estas deixaram de se alimentar de aranhas e de pequenos insetos para consumirem o pólen das flores. A colónia das abelhas é constituída por cerca de 80.000 abelhas, grande parte são operárias, 1 rainha e zangões que variam entra 0 a 400, as colónias podem variar de acordo com a disponibilidade de alimento, época do ano e com a região. As funções da sociedade das colónias estão bem definidas, a abelha rainha tem como funções a postura dos ovos e a manutenção da ordem social na colmeia. As operárias realizam todo o trabalho para manter a colmeia, executando atividades distintas de acordo com a idade devido ao desenvolvimento glandular e das necessidades diferenciadas da colónia. Os zangões são os machos da colónia, sendo a função fecundar a rainha durante o voo nupcial [51].

2.3 - Palinologia

Palinologia deriva dos radicais latinos *pollen*, *pulvis* (pó, farinha fina) e do grego *logos* (conhecimento, palavra), foi criada em 1945 por Hyde e Williams para designar o estudo morfológico do pólen e dos esporos, bem como das suas aplicações e dispersões.

Palinologia representa o ramo da botânica que estuda o pólen através do tempo e da morfologia [95]. Na análise polínica classificam-se as espécies botânicas pelas

características muito variadas que as camadas que envolvem o grão de pólen possuem, como formas ovoides, circulares, rugosas, lisas, segmentadas, entre outras.

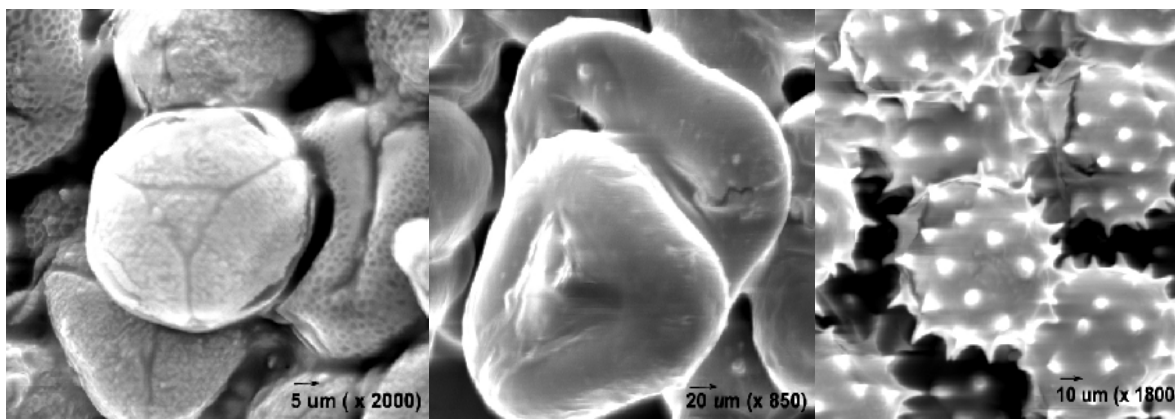


Figura 2 - Exemplos de tipos polínicos de pólen (fonte: Carpes 2008)

Existem diversas espécies botânicas devido á diversidade da flora apícola, mas provavelmente inúmeras espécies ainda não foram observadas pelo produtor apícola ou descritas na literatura científica [52].

Através da análise polínica é possível determinar a qualidade dos produtos da colmeia, como pólen, mel, cera, geleia real e própolis, contribuindo para a valorização destes produtos. Assim sendo, a identificação taxonómica e respetiva catalogação das espécies botânicas de uma determinada região são importantes para maximizar a utilização dos recursos disponíveis e identificar as fontes de alimento [96]. São necessários ainda, muitos estudos a este respeito, para maximizar a quantidade e qualidade deste produto e do restantes produtos da colmeia de forma, a aproveitar os recursos apícolas e algumas ferramentas de investigação já existentes.

3 – Pólen Apícola

O pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas, mediante acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel [53].

3.1 – Recolha, conservação e armazenamento

O pólen ao contrário do mel, não é armazenado na colmeia em quantidades muito superiores às necessidades da colónia [93] e não pode ser recolhido como o mel porque dificilmente se separa da cera. Este é recolhido através de capta-pólen ou caça pólen que se encontra colocado na entrada de voo da colmeia. As abelhas ao entrar na colmeia têm que passar por uma rede (parte integrante do capta pólen), a qual possui uma dimensão que as cargas polínicas que são transportadas pelas patas traseiras cairão para um recipiente colocado por baixo do capta pólen. Este recipiente deve facilitar a circulação de ar e dificultar a humidade para se evitar a detioração do pólen [93].



Figura 3 - Capta-pólen (fonte: FNAP, 2010)

Os apicultores deverão recolher o pólen regularmente. Os capta pólenes só devem ser colocados quando as condições climáticas são favoráveis, para não dificultarem a recolha do pólen e para não contribuírem para a sua degradação [93].

Segundo [55] o rendimento médio de um capta pólen varia entre 50 e 250 g por dia, podendo chegar aos 500 g.

O transporte e o processamento do pólen até á unidade de processamento deve ser feito de forma adequada. O transporte deve ser feito o mais rápido possível e o material de acondicionamento deve permitir a ventilação. Os recipientes não devem ter uma altura superior a 13 cm, de forma a prevenir fenómenos de fermentação e de coagulação no pólen aquando do transporte [93].

A conservação do pólen pode ser feita por dois métodos, a fresco ou a seco. Na conservação a fresco, método usado para a alimentação das colónias, a conservação deve ser feita a -20°C e em sacos plásticos, mantendo-se de modo refrigerado desde a fase de recolha á fase de consumo.

A desidratação do pólen é um método que visa aumentar o tempo de vida de prateleira e manter as suas propriedades [52]. Depois de retiradas algumas impurezas mais grosseiras e após a congelação, o pólen deve ser descongelado gradualmente e á temperatura ambiente durante 3 a 4 horas. De seguida o pólen é seco em estufa de circulação forçada ou secador com temperaturas que não ultrapassem os 40°C durante 12 a 48 horas, dependendo da humidade inicial. O secador possui várias gavetas onde o produto é distribuído de forma uniforme. Periodicamente deve-se proceder á rotação das bandejas para que todo o pólen desseque de forma homogénea. Este processo faz com que o pólen perca cerca de 14-18% do seu peso [54].



Figura 4 - Secador de pólen (fonte: FNAP, 2010)

Depois de seco aplica-se ventilação forçada e limpeza manual para remoção de lixo e retirada de eventuais materiais externos como partes de abelha, larvas secas, bolotas de própolis e restos de resíduos vegetais.

Depois de limpo e selecionado procede-se ao seu armazenamento em frascos de vidro ou de plástico hermeticamente fechados a uma temperatura amena e ao abrigo da luz [52].

Este produto como é rico em proteínas, se não for armazenado (tempo e temperatura) de forma correta, pode perder valor nutricional rapidamente, sofrendo reações de Maillard, por isso torna-se importante controlar e supervisionar todas as etapas de processamento para que este produto apícola valioso não perca nutrientes e propriedades organolépticas [56].

3.2 - Composição físico química e valor nutricional

A composição do pólen não possui um padrão rigoroso, pois varia com a origem floral, condições ambientais, climáticas, idade e estado nutricional da planta e estações do ano [19], fazendo com que o pólen tenha uma maior diversidade do que qualquer outro produto da colmeia.

A Legislação Brasileira possui parâmetros de controlo de qualidade para que o pólen possa ser comercializado a referir: humidade máxima de 4% (pólen desidratado) e 30% (pólen fresco), cinzas máximo de 4%, lípidos mínimo de 1,8%, proteínas mínimo de 8%, açúcares totais entre 14,5% a 55%, fibra bruta mínimo de 2%, acidez livre máximo de 300 mEq.Kg⁻¹ e pH entre 4 a 6 [57].

Portugal carece de legislação referente a este produto apícola, por isso torna-se importante o conhecimento de padrões referentes á sua composição. Apenas alguns países como o Brasil, Espanha, França, Suíça e Argentina possuem limites para os parâmetros de qualidade e reconhecem legalmente o pólen como um complemento alimentar.

O conhecimento da composição física e química do pólen é importante, para garantir a qualidade do produto final [58,1].

O pólen é um produto que pode ser utilizado na alimentação humana como suplemento alimentar visto conter substâncias nutricionalmente essenciais. É constituído por hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, lípidos, vitaminas, substâncias minerais (cálcio, cloro, cobre, ferro, magnésio, iodo, molibdênio, selênio, estrôncio, estanho, boro, flúor, vanádio, cromo, fósforo, potássio, enxofre, alumínio, ferro, manganês, e zinco), água, fibras e oligoelementos, mas também quantidades significativas de substâncias polifenólicas principalmente flavonóides [10,59,60]. Segundo [61] o pólen ainda pode ser caracterizado quanto a presença de resinas, corantes, enzimas e coenzimas.

3.3 – Inocuidade do pólen apícola

A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, vida útil e potencial risco à saúde da população, isto é, possibilidade de ser um veículo de transmissão de doenças de origem alimentar [62]. Devido à importância nutricional e funcional dos componentes presentes nos alimentos, é necessário controlar e supervisionar os distintos processos de elaboração, de tal forma que se garanta que os alimentos processados forneçam ao consumidor, todos os nutrientes na sua forma mais disponível, além de cumprir os requerimentos e conservar as propriedades organolépticas [63].

A época do ano e a permanência do pólen nos apiários tem influência na contaminação por bolores e leveduras. Assim os processos de secagem devem ser otimizados para permitirem a obtenção de produtos livres de contaminantes microbiológicos. É também importante a higienização do material nas diferentes etapas de produção e processamento do pólen.

A composição do pólen nomeadamente o elevado teor em nutrientes permite o crescimento de uma enorme variedade de microrganismos [64]. Neste contexto, deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais, como as micotoxinas, que são produtos tóxicos do metabolismo secundário de fungos que podem colonizar os alimentos durante o seu processamento. Entre as micotoxinas, as aflotoxinas e a ocratoxina A (OTA) são as mais preocupantes devido a sua ocorrência e toxicidade [64].

Os principais fungos produtores pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* [65]. A levedura encontrada mais frequentemente no pólen é *Candida magnoliae* [66]. Relativamente às bactérias a maioria das espécies isoladas foi encontrada no pólen proveniente dos capta-pólenes, sugerindo que as abelhas são a principal fonte de contaminação. Segundo [66] as bactérias que predominaram no pólen e no pão de abelha foram as espécies pertencentes ao género *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilis* e *B. circulans* e o género *B. subtilis* foi encontrado em todas as amostras analisadas por este cientista.

3.4 - Benefícios do pólen

O pólen de abelha é considerado como um alimento saudável apresentando uma vasta gama de propriedades nutricionais e terapêuticas [67,68]. De fato verificou-se que, tem efeitos benéficos para a saúde humana como a prevenção de problemas da próstata [71,20,69,73], dessensibilização de alergias [70], aterosclerose [74], e neoplasias [75]. Outros estudos sugerem redução da incidência de doenças degenerativas como, o cancro e arteriosclerose [76]. A atividade antioxidante confere ao pólen apícola propriedades regenerativas para o organismo e uma vida longa para quem o usa na dieta [67]. Atua também no sistema digestivo regulando a flora intestinal. O ferro e as vitaminas presentes no pólen apícola são importantes na alimentação de pessoas anémicas, contribuindo para aumentar a taxa de hemoglobina dos glóbulos vermelhos [59]. Adicionalmente em doentes com problemas cardiovasculares reduz os níveis séricos de triglicéridos e colesterol [59]. Convém no entanto salientar, que muitos destas propriedades atribuídas ao pólen apícola carecem de suporte científico.

3.5 - Informação ao consumidor – Rótulo

O rótulo deve ter como finalidade informar o consumidor de forma clara, para que este não seja induzido em erro, para isso a embalagem deve conter toda a informação prevista na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 156/2008), pode ainda conter outras informações que se julgue pertinentes, logo que a mesma informação não induza o consumidor em erro.

A informação presente na rotulagem deve estar disponível em português, sem prejuízo da utilização de outros idiomas (Decreto-Lei nº 560/1999, Decreto-Lei nº 238/1986), pois a informação para consumo é um dos direitos aclamados na lei do Consumidor (Decreto-Lei nº24/1996).

As menções obrigatórias da rotulagem devem constar na embalagem e são as seguintes: a denominação de venda; a quantidade líquida, esta deverá ser expressa em massa, seguido do símbolo da unidade de medida utilizada, quilograma (kg) ou grama (g); a data de durabilidade mínima que é da responsabilidade de quem elaborou o rótulo, fabricante, embalador ou vendedor na União Europeia, neste item deverá ser ainda indicado o mês e o ano ou só o ano se a durabilidade for superior a 18 meses, antecedida da menção “Consumir de preferência antes do fim de...”. Deve ainda constar o nome ou firma ou denominação social, a morada do fabricante ou do embalador ou de um vendedor estabelecido na UE que é o responsável pelo produto e pela rotulagem. Se o apicultor é o embalador deverá constar o número de apicultor (unidade de produção primária), sujeito a registo na Direção Geral de Veterinária; o número de registo coincide com o número de apicultor. Se se tratar de um estabelecimento, que procede à extração ou processamento para o mercado, o licenciamento é necessário, sendo-lhe atribuído a marca de identificação, número de controlo veterinário, que deve constar na rotulagem (Decreto-Lei nº 560/1999, Decreto- Lei nº 1/2007, Regulamento nº 852/2004). Isto permite ao consumidor saber a quem comunicar, em caso de reclamação ou da necessidade de informações sobre o produto. As condições especiais de conservação são todas as indicações que se julgue pertinentes para preservar a qualidade do produto, como por exemplo conservar o produto em lugar fresco. O local de origem ou proveniência diz respeito ao país ou países de origem em que o pólen foi colhido. O lote precedido da letra “L” indica o conjunto de unidades de venda que foi produzido, fabricado ou embalado, esta indicação é fundamental par a rastreabilidade do produto. A indicação do lote é da responsabilidade do produtor, embalador ou primeiro vendedor estabelecido na União Europeia (Decreto-Lei nº 560/1999, Regulamento nº 178/2002). Toda a informação fornecida ao consumidor através do rótulo deve ser clara de modo a não induzir em erros (artigo 16º do Regulamento nº 178/2002).

Capítulo II

Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach



4. Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach

International Journal of Molecular Sciences, ISSN 1422-0067 (2012)

Abstract: Since the primordial of humanity, pollen has been considered a good source of nutrients and energy. Its promising healing properties have also been referred to. The present study aimed to characterize, for the first time, eight commercial pollens from Portugal and Spain available on the market studying the legislation on labeling, pollinic origin, physicochemical and microbiological analyses and identification of yeasts. Eleven botanical families were found amongst the samples. The most abundant family and the most dominant pollen was *Cistaceae*. The moisture content, ash, a_w , pH, reducing sugars, carbohydrates, proteins, lipids and energy were analyzed and the specific parameters were within the specifications required by some countries with legislation regarding these parameters. Microbiologically commercial pollen showed acceptable safety for the commercial quality and hygiene. All samples showed negative results for toxigenic species. The microorganisms studied were aerobic mesophiles, yeasts and moulds, coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and sulfite-reducing *Clostridium*. During the work, six yeasts species were isolated from pollen, with *Rhodotorula mucilaginosa* being the most abundant, as it was present in four samples.

Keywords: bee pollen; microbiological characterization; physicochemical characterization; pollinic analysis; labeling rules

4.1 Introduction

Bee pollen, commonly designated as the “the life-giving dust”, results from the agglutination of flower pollen, nectar or honey and bees’ salivary substances. Indeed, this natural product is recognized to be a valuable apitherapeutic product with potential for medical and nutritional applications [1]. Bee pollen is promoted as a health food with a wide range of nutritional and therapeutic properties [2], triggering beneficial effects to human health and the prevention of prostate problems [3], allergy desensitization [4], arteriosclerosis [5] and tumors [6]. Its important physiological functions have already been widely praised. It has been reported that bee pollen accelerates mitotic rate, promotes tissue repair, enhances greater toxic elimination and reduces excessive cholesterol levels [7]. Its radical scavenging activity has already been reported [8].

This product is also used as a food supplement since it contains the richest known source of carbohydrates, proteins, amino acids, lipids, vitamins, minerals and trace elements [9], but also significant amounts of polyphenol substances, mainly flavonoids [10]. In fact, some nutritionists state that human beings could live adequately just by eating bee pollen [7].

However, it is important to note that from the anther dehiscence to comb cells, pollen is exposed to microbial contamination. This contamination can be attributed to various factors and sources, honeybees, weather, plant materials, insects and animals, humans and their agricultural devices [11].

In addition, when no prompt and adequate drying is performed by the beekeeper after collection by bees, bee pollen is a major substrate for mycotoxin growth and occurrence of undesirable fermentations [12]. Also, due to its high amount of proteins, if not stored correctly, it can lose the nutritional value quickly, undergoing Maillard reactions [1]. In this context, it is necessary to control and supervise the processes of preparation and storage, in order to ensure that the product supplies consumers with all the available nutrients, maintains its good organoleptic proprieties and has good microbiological quality. The last is of utmost importance, mainly when the bee pollen is intended for human consumption.

Despite the studies that have been conducted on the nutritional characterization and biological properties of bee pollen, the microbiological quality and safety has never

been subjected to a comprehensive study. Also, the labels of the bee pollen flasks have never been analyzed and verified according to the specific legislation.

In this context, the present study aims to assess the chemical composition, pollinic profile, microbiological quality, safety and the labeling of eight commercial bee pollens with various botanical and geographical origins. As far as we know, this is the first study about commercial pollen.

4.2. Results and Discussion

4.2.1. Labeling and Information to Consumers

Consumers should be able to be confident with their choice of foods and be able to buy according to their particular requirements, be it for diet and health, personal taste and preferences, or cost. All the essential information about the product must be visible in the labeling. With the aim of guaranteeing food authenticity and avoid misdescription, the labeling of the purchased samples was verified according to the specific legislation. In Table 1 the results of the labeling analysis are presented.

Table 1 - Results of the commercial bee pollen labeling analysis.

	In the packaging (%)
Trade name	100.0
Net quantity (g or kg)	100.0
Date of minimum durability	100.0
Name, company or business name	87.5
Social grower/packer/seller established in the EU	87.5
Lot	100.0
Address	87.5
Place of origin	87.5
* Storage conditions	75.0
* Information to consumers	75.0

* Items not required on labels.

The mandatory items [13], which should appear on the product label, are the list of ingredients, the sale name, the net quantity in kilograms or grams and the date of

minimum durability. Most still present the company name, address of the manufacturer, packer or seller, established within the EU, special storage conditions, the place of origin or provenance and the batch preceded by the letter “L”. All the products (100%) had the sales name, date of minimum durability, lot and net quantity. Regarding the country of origin of the pollen and indication of trade name or company name of producer/packer/seller established within the European Union, only one of the packages did not present this information, and the remaining 87.5% had these indications.

The pollen samples B, C, D and G are from Portugal, the samples E, F and H are from Spain and sample A had no indication of country of origin. The address of the manufacturer, packer or seller established within the European Union is not indicated in 12.5% of the packaging. Seventy-five percent 75% of packaging presented other consumer information that is not mandatory. Not obligatory information includes the storage conditions. Information about the effect of carbohydrates, amino acids, enzymes, vitamins and minerals in the organism was found in 37.5% of the packaging. The nutritional information was present in 62.5% and consumer information line was indicated in 37.5% of the packaging. The method of use was designated in 62.5% of the analyzed containers.

4.2.2. Pollinic Identification

The results of the pollen analysis are presented in Table 2. The bee pollens' pollinic profile allows scientists to infer the vegetation present in the area and to date and ascertain any biodiversity changes, as for example, the presence and distribution of invasive or exotic plants. From the pollen analysis it can be seen that all samples were heterofloral. In addition, due to the different colors of the pollen grains it can be concluded that the samples included different botanical species.

Eleven families were found in the samples, with *Cistaceae* being the dominant in the three samples A (68.2%), C (83.6%) and E (90.6%) and type *Fabaceae* in two of the samples B (56%) and F (69.8%). The types *Ericaceae*, *Fagaceae*, *Boraginaceae* were dominant in D (58%), G (45.4%) and H (49.6%), respectively. The type *Boraginaceae* (*Echium*) was present in all the analyzed samples, apart from Pollen D. Indeed, this botanical family is present in several regions of Portugal and Spain and has several utilizations in cosmetics and as a functional food [14]. These applications are related with its high levels of alpha linolenic acid

(ALA), gamma linolenic acid (GLA) and stearidonic acid (SDA). In this study four types of pollen belonging to different families were also found that were only present in small amounts (accessory pollen and isolated pollen). This is the case for *Pinus* spp., found in Sample B (12.4%), *Eucalyptus* spp., found in Sample G (9%), *Mimosa* spp., found in Sample D (10%) and *Quercus* spp., found in Pollen G (16%).

None of the botanical families is represented in all the samples studied, since bee pollen can vary according to the region, a factor which depends on the available surrounding bee pasture in the apiary vegetation, as well as on the climate conditions for flowering [15].

4.2.3. Chemical Composition

The chemical composition of the samples is shown in Table 3. The composition of pollen showed variations between samples, which may be due to the different botanical composition, geographical origin of the product, influence of age and environmental conditions [16].

The water content (expresses the total content: the free and bound water) and the water activity (measures the amount of free water) play an important role in the organoleptic characteristics and “shelf lifetime” of bee pollen [17]. When its values are too high, it can potentially promote microbial contamination, mainly by moulds and yeasts [18]. The moisture content varied between $8.40 \pm 0.80\%$ (G) and $6.02 \pm 0.18\%$ (C, D). The pollen’s humidity was above the upper limit (4%) set by the Brazilian legislation for commercial pollen [19], but all values were within the limits allowed in Argentina and Switzerland (8% in both) [20], except for pollen G (8.40 ± 0.82). However, the last was within the established limits of Bulgaria (10%) for commercial bee pollen. Pollen with less than 3% of moisture is undesirable since it can result in discoloration and development of chemical reactions (for example, the Maillard reaction and lipid oxidation), resulting in undesirable odors and a rancid product [21]. The water activity was higher in sample A (0.43 ± 0.025) and lower in sample D (0.26 ± 0.01) and there were no statistically significant differences ($p < 0.001$). These results are similar to those reported by [22] (a_w ranged from 0.32 to 0.55), who studied bee pollen provided by beekeepers. All samples showed low values of a_w , which is characteristic of dehydrated foods, allowing storage stability. Indeed, since pollen is hygroscopic, high values of a_w promote microbiological contamination, more precisely

by yeasts and fungi, which produce mycotoxins and ochratoxins, creating a risk to the consumer [23]

Table 2 - Palynological spectrum of the eight commercial bee pollen (mean \pm standard deviation; n = 3)

Family	Samples								
		A	B	C	D	E	F	G	H
Asteraceae	Leontodon spp. (%)	-	5.3 \pm 1.9 ³	-	-	1.2 \pm 0.1 ³	-	18.2 \pm 3.4 ²	-
Boraginaceae	Echium spp. (%)	2.0 \pm 0.4 ³	4.6 \pm 1.4 ³	7.5 \pm 1.6 ³	-	4.2 \pm 0.8 ³	1.2 \pm 0.2 ³	6.2 \pm 2.3 ³	49.6 \pm 5.2 ¹
Cistaceae	Cistus spp. (%)	68.2 \pm 8.9 ¹	-	83.6 \pm 9.2 ¹	2.4 \pm 0.5 ³	90.6 \pm 9.3 ¹	-	5.2 \pm 1.5 ³	-
Ericaceae	Erica spp. (%)	-	-	-	58.0 \pm 7.7 ¹	1.7 \pm 0.2 ³	-	-	-
	Cytisus spp. (%)	-	57.0 \pm 9.2 ¹	2.9 \pm 0.3 ³	3 \pm 0.8 ³	-	69.8 \pm 6.7 ¹	-	8 \pm 1.0 ³
Fabaceae	Acacia spp. (%)	-	2.5 \pm 0.6 ³	-	-	1.5 \pm 0.3 ³	-	-	-
	Trifolium spp. (%)	4.4 \pm 1.2 ³	-	4.8 \pm 1.0 ³	16.3 \pm 2.4 ²	-	-	45.4 \pm 7.1 ¹	2.0 \pm 1.0 ³
Fagaceae	Quercus spp. (%)	-	-	-	-	-	-	16.0 \pm 0.8 ²	-
	Castanea spp. (%)	15.8 \pm 3.2 ²	13.8 \pm 2.3 ³	1.2 \pm 0.3 ³	-	-	24.8 \pm 5.1 ²	-	5.2 \pm 1.3 ³
Lamiaceae	Thymus spp. (%)	-	-	-	10.3 \pm 3.9 ³	-	1.4 \pm 0.4 ³	-	9.0 \pm 2.1 ³
Mimosaceae	Mimosa spp. (%)	-	-	-	10.0 \pm 3.6 ³	-	-	-	-
Myrtaceae	Eucalyptus spp. (%)	-	-	-	-	-	-	9.0 \pm 1.9 ³	-
Pinaceae	Pinus spp. (%)	-	12.4 \pm 2.7 ³	-	-	-	-	-	-
Rosaceae	Prunus spp. (%)	5.0 \pm 1.6 ³	4.4 \pm 0.9 ³	-	-	0.8 \pm 0.2 ³	2.8 \pm 0.4 ³	-	-
	Rubus spp. (%)	4.6 \pm 1.3 ³	-	-	-	-	-	-	26.2 \pm 4.3 ²

¹ DP—Dominant Pollen (>45%); ² AP—Accessory Pollen (15%–45%); ³ I—Isolated Pollen (<15%).

Table 3 - Proximate chemical composition (g/100 g of fresh weight) and energetic value (kcal) of the eight bee pollen samples (mean \pm standard deviation; n = 3).

	A	B	C	D	E	F	G	H
Water content	7.63 \pm 0.27 ab	7.91 \pm 0.04 ab	6.02 \pm 0.07 c	6.02 \pm 0.18 c	7.97 \pm 0.07 a	6.95 \pm 0.39 bc	8.40 \pm 0.82 a	7.82 \pm 0.25 ab
Water activity	0.43 \pm 0.03 a	0.35 \pm 0.02 cd	0.33 \pm 0.01 d	0.26 \pm 0.01 e	0.41 \pm 0.004 ab	0.33 \pm 0.02 d	0.40 \pm 0.03 ab	0.38 \pm 0.017 bc
pH	4.92 \pm 0.02 ab	4.62 \pm 0.04 c	4.71 \pm 0.03 bc	5.17 \pm 0.09 a	4.49 \pm 0.14 cd	4.99 \pm 0.17 ab	4.23 \pm 0.14 d	5.03 \pm 0.10 a
Ash	3.16 \pm 0.03 a	1.85 \pm 0.05 cd	2.38 \pm 0.39 bc	2.23 \pm 0.03 bcd	2.16 \pm 0.29 cd	2.83 \pm 0.29 ab	1.67 \pm 0.29 d	0.5 \pm 0.01 e
Proteins	20.84 \pm 1.16 ab	20.03 \pm 1.49 b	25.15 \pm 1.64 a	22.01 \pm 1.43 ab	22.45 \pm 0.89 ab	20.69 \pm 2.64 b	18.79 \pm 1.62 b	12.50 \pm 0.5 c
Lipids	2.66 \pm 0.06 c	2.35 \pm 0.11 d	2.79 \pm 0.10 bc	2.71 \pm 0.03 c	2.86 \pm 0.09 bc	3.33 \pm 0.16 a	3.06 \pm 0.08 ab	2.75 \pm 0.13 c
Carbohydrates	73.35 \pm 1.21 bc	75.76 \pm 1.48 b	69.68 \pm 2.08 c	73.06 \pm 1.39 bc	72.53 \pm 1.04 bc	73.15 \pm 2.88 bc	76.49 \pm 1.95 b	84.25 \pm 0.58 a
Reducing sugars	26.09 \pm 3.60 c	33.19 \pm 2.36 abc	35.68 \pm 5.07 abc	38.62 \pm 2.19 ab	41.79 \pm 3.21 a	34.52 \pm 1.05 abc	26.90 \pm 3.30 c	29.39 \pm 4.71 bc
Energy kcal	400.70 \pm 0.36 d	404.37 \pm 0.59 c	404.43 \pm 1.10 c	404.66 \pm 0.03 c	405.66 \pm 1.51 c	405.30 \pm 1.73 c	408.62 \pm 1.06 b	411.75 \pm 0.63 a

The letters (a, b, c) represent which bee pollens are different by Tukey test with a significance of $p = 0.05$.

The pH and a_w have great importance during the storage of bee pollen, as they influence its texture, stability and shelf life [24]. The pH of the commercial pollens ranged from 5.17 ± 0.09 (D) to 4.23 ± 0.14 (G), the samples B, C and E did not differ significantly from each other ($p < 0.001$). The values are in accordance with the Brazilian law (4.0 to 6.0) and those published by [16,17,22,25,26].

The ash content is an account of the inorganic matter present in bee pollen [15]. For the ash content the values ranged from 0.5 ± 0.01 (H) to 3.16 ± 0.03 (A). The pollen H was statistically significantly different from the others ($p < 0.001$). Of the eight samples, seven are within the range reported by [26], who analyzed bee pollen from Brazil, and [17], who studied pollen from Argentina. Some values were lower than those reported by [10], who found values between 1.90 and 3.91% for Spanish bee pollen. The ash content is influenced by soil type, geographical origin, flora species and capacity of the plant to accumulate minerals [21]. The presence of mineral impurities is due to inefficient cleaning procedures and may increase the ash content, which makes this analysis an important quality index for pollen [10].

Some authors emphasize the value of pollen as an important source of proteins [10]. The protein content showed statistically significant differences ($p < 0.001$), for pollen H, with values ranging from 25.15 ± 1.64 (C) to 12.50 ± 0.58 (H). The great variability of protein content found in bee pollen can be partly explained by the natural variation of the composition that is a consequence of the distinct source plants. In addition, differences within the same plant species growing under different environmental conditions have also been reported [1]. Our results were similar to those obtained by [1,26,27] in pollen samples from Brazil. Lower values for pollen from Spain were found by [10]. However, higher values have already been obtained. The results of [28,29] who analyzed samples from Brazil and Argentina, ranged from 23.59% to 27.70% and 24.17% to 37.32%, respectively. The nitrogen content of Portuguese organic pollen was between 34.00% and 24.23% [22], suggesting that this product is of better quality.

Lipids, mainly the fatty acids esters, are partly responsible for the physicochemical properties [30]. The fat content varied from 3.06 ± 0.08 (G) to 2.35 ± 0.11 (B) with no statistically significant differences ($p < 0.001$) between all pollens apart from B ($p <$

0.001). These values are similar to those reported by [17,22] and slightly inferior to those obtained by [1,19,26].

The higher carbohydrate content, 84.25 ± 0.58 , was observed in pollen H, while pollen Sample C (69.68 ± 2.08) showed the lowest level, the latter showing statistically significant differences ($p < 0.001$). The values are within the limits described by [10], but the values obtained by [27] are superior to ours. The values obtained for energy were between 400.70 ± 0.36 and 411.75 ± 0.63 (kcal/100 g) with no statistically significant differences ($p < 0.001$) among themselves for Pollen B, C, D, E and F.

The reducing sugar content was highest in Pollen E (41.79 ± 3.21) and smallest in Sample A (26.09 ± 3.60). The high reducing sugar content of bee pollen has been associated with the presence of nectar/honey, commonly used by bees as glue for the pollen of plants [27].

4.2.4. Microbial Contamination

The pollen contamination by microorganisms is dependent on the nutritional composition as well as the harvesting practices, cleaning, drying and storage of the product. The results obtained for the levels of microbial contamination are shown in Table 4.

Table 4 - Microbial analyses of eight commercial bee pollen samples (mean \pm standard deviation; n = 3).

	A	B	C	D	E	F	G	H	p-Value
Aerobic mesophiles (cfu/g)	<10 a	<10 a	<10 a	<10 a	<10 a	$8.7 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10^b$	<10 a	<10 a	0.032
Moulds and yeasts (cfu/g)	<10 a	<10 a	<10 a	$8.8 \times 10^2 \pm 6.9 \times 10^b$	<10 a	$9.4 \times 10^2 \pm 7.1 \times 10^b$	$2.6 \times 10^2 \pm 5.2 \times 10^{ab}$	$6.9 \times 10^2 \pm 4.4 \times 10^1^b$	0.001
Fecal coliforms (MPN/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	n.a.
<i>Escherichia coli</i> (MPN/g)	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	n.a.
Sulphite reducing clostridium (MPN/g)	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	n.a.
<i>Salmonella</i> sp. (in 10 g)	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	n.a.

The letters (a, b) represent which honeys were different by Tukey test with a significance of $p = 0.05$.

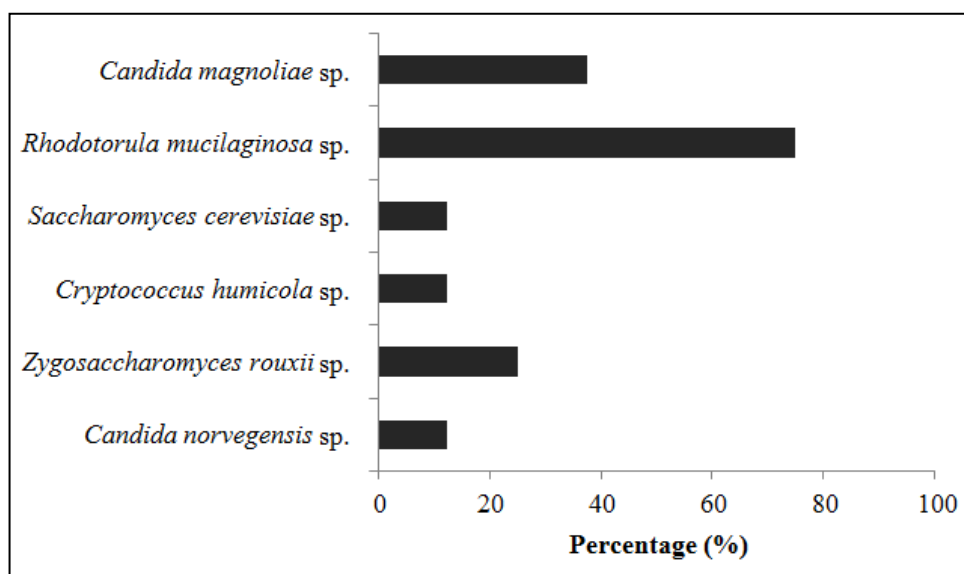
The results obtained for the parameters that indicate commercial quality are in agreement with the Argentinian Food Code, which establishes the maximum of 1.5×10^3 ufc/g for moulds and yeasts. In this study, moulds and yeasts were detected in 50% of the samples, while [17,31] found it in all the samples. [22] detected these microorganisms in 60% of the samples, however, the number per sample was lower. Aerobic mesophiles were found only in 12.5% of the samples, and the number of colony forming units oscillated between <10 and $8.7 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10$. Sample F was significantly different from the others ($p = 0.032$). The number of colony forming units of moulds, yeasts and aerobic mesophiles found by [22] in non-commercial Portuguese bee pollen was inferior. The higher number of microorganisms found in the present study must be related to the higher content of water of the commercial pollen.

The indicators of safety (*Salmonella* sp., sulfite-reducing *clostridia*) and the indicators of sanitary quality (fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) were absent. These results corroborate the observations of [22]. On the other hand, [17] fecal coliforms were found in some samples.

4.2.5. Isolation and Identification of Yeasts

This study is the first to identify the yeasts present in bee pollen. Six yeast species were identified in the samples in which yeasts were initially found (Figure 5).

Figure 5 - Percentage of the yeasts isolated from the samples.



Two of the six species found belong to the genus *Candida* (*norvegensis* and *magnoliae*). The yeast *Rhodotorula mucilaginosa* sp. was the most frequent. It was present in 75% of the samples with yeasts. *Candida magnoliae* sp. And *Zygosaccharomyces rouxii* sp. were identified in 37.5% and 25% of the samples, respectively. *Candida norvegensis* sp., *Cryptococcus humicola* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* sp. were found in 12.5% of the samples. Studies on the yeasts isolated from honey have revealed that the most common is *Candida magnoliae* sp., followed by *Rhodotorula mucilaginosa* sp. [32]. These results corroborate the claim that the microorganisms present in honey are, essentially, from pollen [33]. *Rhodotorula mucilaginosa* is a common environmental inhabitant. This microorganism may act as an indicator of a lack of hygiene standards [34]. To the best of our knowledge, *Candida magnoliae*, that is commonly isolated from the honeycomb, is inoffensive. It has been implicated in just one case of human disease (tenosynovitis in an immunocompetent child) [35]. *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii* are responsible for the deterioration of foods that were processed and packaged in accordance with normal standards of good manufacturing practice.

Candida norvegensis sp. and *Rhodotorula mucilaginosa* sp. can cause health risks, colonize the skin, fingernails, respiratory tract, genital-urinary and cause diarrhea.

These results indicate that the optimization of the hygienic procedures during all the production chain is necessary to improve the quality and safety of the product. In order to reduce the risk of food-borne illness and spoilage, good practices in agriculture (GAP), hygiene (GHP) and manufacturing (GMP) must be implemented.

4.3. Experimental Section

4.3.1. Samples

Eight commercial pollens (A-H) of different floral sources and geographical origins (Figure 6) were purchased from the market and left in the dark at room temperature (± 20 °C) until further analysis.

Figure 6 - Place of origin of the commercial bee pollen. The origin of Sample A was not specified in the labeling.



4.3.2. Chemicals and Materials

The sodium sulfate (Na_2SO_4), anhydrous, powder, extra pure, sulfuric acid (H_2SO_4) and the sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Acros Organic (Geel, Belgium). The petroleum ether and ethanol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The culture mediums were purchased from Himedia (India). The water was purified using a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.3.3. Labeling

The labeling of the pollen bought at the supermarket was analyzed in accordance with the requirements of current Portuguese law [13].

4.3.4. Pollinic Identification

The pollinic identification was performed by the method described by [1]. Briefly, a sample of 2 g, corresponding to more or less 300 pollen pellets, was considered to be representative for botanical origin. The pellets were then divided into sub-samples

according to color (yellow-black, dark brown, green, red, yellow and orange). Each subsample was then weighed to calculate its percentage of the whole sample. The sample was placed between blade and slide using glycerin gel as mounting medium. Identification of pollen grains was performed by optical microscope with total magnification (400× and 1000×). A reference collection of CIMO-Mountain Research Centre (Agricultural College of Braganza) and guides of pollen morphology were used for the recognition of the pollen types. The following terms were used for pollen frequency classes: dominant pollen (DP, more than 45% of the pollen grains counted), accessory pollen (AP, 15%–45%) and isolated pollen (IP, less than 15% of the pollen grains counted) [36].

4.3.5. Physicochemical Analyses

All physicochemical tests were performed in triplicate.

4.3.5.1. Moisture

Approximately 3 g of each sample of the study pollen was dried at a temperature of 100 °C–105 °C to constant weight [37].

4.3.5.2. Ash

The ash content was determined after ignition at 600 ± 15 °C by gravimetry, as reported by [19].

4.3.5.3. pH

The pH was measured in the aqueous phase obtained after mixing 10 g of pollen in 75 mL of distilled water [37].

4.3.5.4. Reducing Sugars

With the aim of performing the acid hydrolysis of the reducing sugars, 60 mg of each pollen was dissolved in a H₂SO₄ solution (10 mL, 1.5 M). The solutions were

heated in a water bath (100 °C) for 20 min. Afterwards, the solution was cooled, neutralized with 12 mL NaOH (10%, w/v), filtered and the volume of the flask (60 mL) was completed with distilled water. The quantification of the reducing carbohydrates was performed spectrophotometrically at 540 nm using a spectrophotometer (UV-VIS spectrometry Unicam Hekios, UK). Glucose was used as standard. For this, 2 mL of distilled water, 1 mL of each hydrolyzate sample and 1 mL of DNS were placed in a test tube. The mixture was heated for 5 min in a water bath (100 °C) and cooled rapidly on ice to room temperature. Next, 5 mL of distilled water was added and the absorbance was read [38].

4.3.5.5. Water Activity

This parameter was determined by placing each pollen sample directly into a water activity meter (Rotronic HygroPalm. Bassersdorf CH-8303).

4.3.5.6. Lipids

Two grams of pollen were macerated in a mortar with anhydrous Na₂SO₄ by detachment of the mixture. Then, it was extracted with *n*-hexane for about 4 h in the Soxhlet apparatus [19].

4.3.5.7. Proteins

Nitrogen content was determined using the Kjeldahl method (230-Hjeltec Analyzer, Foss Tecator, Höganäs, Sweden). The crude protein (CP) content was calculated using the conversion factor of 6.25 ($N \times 6.25$). The crude fat (CF) was determined by gravimetry after extraction with petroleum ether using an automatic Soxtec device (FOSS, Soxtec™ 2050, Höganäs, Sweden).

4.3.5.8. Carbohydrates

The total carbohydrate contents was obtained by difference [100 –(ashes + proteins + lipids)] (%) [36].

4.3.5.9. Energy

The total energy (in kcal) was estimated according to the following equation:
energy (kcal) = $4 \times (\text{g protein} + \text{g carbohydrate}) + 9 \times (\text{g lipid})$ [39].

4.3.6. Microbiological Determinations

To assess the microbiological quality of the samples, the commercial quality parameters (mesophilic microorganisms, yeasts and moulds), the indicators of sanitary quality (fecal coliforms and *Escherichia coli*) and the indicators of safety (sulphite reducing clostridium spores and *Salmonella*) were analyzed. All microbial tests were performed in triplicate.

4.3.6.1. Sample Preparation

Sample preparation was carried out according to [40]. Ten grams of the sample of pollen were weighed on a scale (Mettler PC Model 2000), and homogenized with 90 mL of Ringer's solution (dilution 10^{-1}). For each sample, decimal dilutions were prepared using as diluent successive Ringer's solution.

4.3.6.2. Enumeration of the Total Mesophilic Microorganisms

Enumeration was made on Plate Count Agar (Himedia), incubated at 37 °C for 48 h [41]. Microbial counts were expressed as colony-forming units per gram of bee pollen (cfu/g).

4.3.6.3. Enumeration of Yeast and Moulds

Mould and yeast enumeration was made on DG18 (Himedia) and incubated at 25 °C for 5 days [42]. Microbial counts were expressed as colony-forming units per gram of bee pollen (cfu/g).

4.3.6.4. Sulfite Reducing Clostridium Spores

This analysis includes three steps, according to the protocol of [43]: preparation, inoculation and enumeration. For sulfite-reducing clostridia counting, aliquots of 10, 5, 1 and 0.1 mL of the initial suspension were added to an empty tube, thermally treated at 80 °C for 15 min and covered with Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM) (Himedia), and incubated at 37 °C for 5 days. At the end, the black colonies were counted. The results are expressed as presence of sulfite-reducing Clostridia in 0.01 g. Results were expressed as most probable numbers of sulfite-reducing Clostridium spores per gram of bee pollen (MPN/g).

4.3.6.5. Fecal coliforms and Escherichia coli

The presence of coliforms, fecal coliforms and *E. coli* in bee pollen may be determined by means of the Most Probable Number (MPN) procedure, as described in [44]. Briefly, this method involves serially diluting out the target organisms in the sample, in five replicate aliquots, to extinction. The probable level of the target organisms is then statistically estimated from a Hoskins table. Results were expressed as the most probable numbers of coliforms per gram of bee pollen (MPN/g) and the most probable numbers of *E. coli* per gram of bee pollen (MPN/g).

4.3.6.6. Salmonella

The detection was performed following the protocol of [45]. According to this protocol, the search of *Salmonella* has four steps that include pre-enrichment (Bulfered Peptone Water), selective enrichment (Rappaport Vassiliadi and Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth-MKTTn), planting out (Xylose lysine Deoxycholate Agar-XLD agar) and confirmation Nutrient Agar (NA). Afterwards, biochemical confirmations are performed. Results were expressed as absence or presence of *Salmonella* in 25 g of bee pollen.

4.3.7. Isolation and Identification of Yeasts

The API 20C AUX system, a commercial kit for the evaluation of the assimilation of 19 carbon sources, was used according to the instructions in the identification of the

isolated yeasts. Pure cultures of each test organism were grown on one plate each of Sabouraud agar for 48 h. Each strain was inoculated into 2 mL of a NaCl solution (0.85%, w/v) to achieve a turbidity visually equivalent to a 2 McFarland turbidity standard. One 100 μ L aliquot of this preparation was inoculated into the corresponding C medium tube and each tube of inoculated medium was transfer-pipetted into the corresponding API 20C AUX yeast panel. Each panel was incubated at 30 ± 2 °C for 48 h. All panels were read for growth according to the API 20C AUX-analytical profile index.

4.3.8. Statistical Analysis

Results are shown as mean values and standard deviation. Prior to the statistical analysis, normality tests (Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Liliefors and Jarque-Bera) were carried out. In each parameter, the differences between pollens were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD Test with $\alpha = 0.05$. This treatment was carried out using SAS v. 9.1.3 program.

4.4. Conclusions

This work is a comprehensive survey about the physicochemical composition, pollinic spectrum and microbiological safety of commercial bee pollen from different origins. In parallel the specific legislation of the bee pollens concerning the labeling rules was also verified. The physicochemical parameters (water content, a_w , pH, ash, proteins, lipids, carbohydrates, reducing sugars and energy) of the samples were within the specifications. The indicators studied suggest that the commercial pollen is safe from a microbiological standpoint. Concerning the labeling, all the products presented the sales name, date of minimum durability, lot and net quantity.

Bee pollen has promising therapeutic and nutritional applications and, as such, the investigation of its chemical, nutritional and microbiological composition is a sound research priority.

4.5. References

1. Almeida-Muradian, L.B.; Pamplona, L.C.; Coimbra, S.; Barth, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 105–111.
2. Yamaguchi, M.; Hamamoto, R.; Uchiyama, S.; Ishiyama, K.; Hashimoto, K. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral diaphyseal and metaphyseal tissues of rats *in vitro* and *in vivo*. *J. Health Sci.* **2006**, *52*, 43–49.
3. Shoskes, D.A. Phytotherapy in chronic prostatitis. *Urology* **2002**, *60*, 35–37.
4. Mizrahi, A.; Lensky, Y. *Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy*; Springer-Verlag: New York, NY, USA, 1997.
5. Wojcicki, J.; Samochowiec, L.; Bartlomowicz, B.; Hinek, A.; Jaworska, M.; Gawronska-Szklarz, B. Effect of pollen extract on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **1986**, *62*, 39–45.
6. Zhang, X.; Habib, F.K.; Ross, M.; Burger, U.; Lewenstein, A.; Rose, K.; Jatou, J. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth *in vitro*. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 735–738.
7. Morais, M.; Moreira, L.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *39*, 1096–1101.
8. Baltrušaitytė, V.; Venskutonis, P.R.; Čkštarytė, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem.* **2007**, *101*, 502–514.
9. Isidorov, V.A.; Isidorova, A.G.; Szczepaniak, L.; Czyżewska, U. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1056–1063.
10. Villanueva, M.T.O.; Marquina, A.D.; Serrano, R.B.; Abellan, G.B. The importance of bee-collected pollen in the diet: A study of its composition. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2002**, *53*, 217–224.
11. Hani, B.; Dalila, B.; Saliha, D.; Harzallah, D.; Ghadbane, M.; Khennouf, S. Microbiological sanitary aspects of pollen. *Adv. Environ. Biol.* **2012**, *6*, 1415–1420.
12. Garcia-Villanova, R.J.; Cordón, C.; González, A.M.; Aparicio, P.; Garcia, M.E. Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7235–7239.
13. Decreto-Lei n.º 156/2008. Available online: <http://www.nationalstemcentre.org.uk/dl/cb88b8db>

- 986af7cf354b280a1117755295a0d278/14762-Echium.pdf (accessed on 18 July 2012).
14. National Non-Food Crops Centre. "Echium". Available online: <http://www.nationalstemcentre.org.uk/dl/cb88b8db986af7cf354b280a1117755295a0d278/14762-Echium.pdf> (accessed on 18 July 2012).
 15. Luz, C.; Bacha, G., Jr.; Fonseca, R.L.E.; Sousa, P. Comparative pollen preferences by africanized honeybees *Apis mellifera* L. of two colonies in Para de Minas, Minas Gerais, Brazil. *Ann. Braz. Acad. Sci.* **2010**, *82*, 293–304.
 16. Herbert, J.R.; Shimanuki, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie* **1978**, *9*, 33–40.
 17. Coronel, B.B.; Grasso, S.C.; Pereira, G.; Fernández, A. Caracterización bromatológica del pólen apícola Argentino. *Cienc. Docencia. Tecnol.* **2004**, *15*, 141–181.
 18. Morgano, M.A.; Milani, R.F.; Martins, M.C.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration. *Food Control* **2011**, *22*, 1604–1608.
 19. Carpes, T. Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas do Polén Apícola de *Apis mellifera* da região Sul do Brasil. Ph.D. Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, September 2008.
 20. Krell, R. *Value Added Products from Beekeeping*; FAO Agricultural Services: Rome, Italy, 1996.
 21. Bonvehí, J.S.; Jordà, R.E. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 725–732.
 22. Estevinho, L.M.; Rodrigues, S.; Pereira, A.P.; Feás, X. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 429–435.
 23. González, G.; Hinojo, M.J.; Mateo, R.; Medina, A.; Jiménez, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *105*, 1–9.
 24. González-Martin, I.; Hernández-Hierro, J.M.; Barros-Ferreiro, N.; Córdon-Marcos, C.;
 25. García-Villanova, R.J. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. *Talanta* **2007**, *72*, 998–1003.
 26. Marchini, L.C.; Reis, V.D.A.; Moreti, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Ciênc. Rural* **2006**, *36*, 949–953.
 27. Bastos, D.H.M.; Rocha, C.I.; Cunha, I.B.S.; Carvalho, P.O.; Torres, E.A.S. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades

- nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revist. Inst. Adolfo Lutz* **2003**, *62*, 239–244.
28. Carpes, T.; Cabral, I.; Rosalen, P.L.; de Alencar S.M.; Masson M.L. Caracterização do potencial antimicrobiano dos extractos de pólen apícola da região Sul do Brasil. *Alimentos Nutrição Araraquara* **2009**, *20*, 271–277.
 29. Melo, I.L.P.; Freitas, A.S.; Barth, O.M.; Almeida-Muradian, L.B. Correlation between nutritional composition and floral origin of dried bee pollen. *Revist. Inst. Adolfo Lutz* **2009**, *168*, 1–9.
 30. Vit, P.; Santiago, B. Chemical composition of fresh bee pollen collected in the Misintá páramo from the Venezuelan Andes. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2008**, *58*, 411–415.
 31. Ayaz, F.A.; Glew, R.H.; Millson, R.M.; Huang, H.S.; Chuang, L.H.; Sanz, C.; Hayrihoglu-Ayaz, S. Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. Var. *acephala* DC.). *Food Chem.* **2006**, *96*, 572–579.
 32. Hervatin, H.L. Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas. M.Sc. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, September 2009.
 33. Carvalho, C.M.; Rocha, A.; Estevinho, M.L.F. Identification of honey yeast based on RFLP analysis of the ITS region. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2005**, *5*, 11–17.
 34. Snowdon, J.A.; Cliver, D.O. Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *31*, 1–26.
 35. Stratford, M. Food and beverage yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*; Querol, A., Fleet, G.H., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2006; pp. 335–379.
 36. Cascio, G.; Dalle Carbonare, L.; Maccacaro, L.; Caliari, F.; Ligozzi, M.; Cascio, V.; Fontana, R. First case of bloodstream infection due to *Candida magnoliae* in a Chinese oncological patient. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *10*, 3470–3473.
 37. Louveaux, J.; Maurizio, A.; Vorwohl, G. Methods of Melissopalynology. *Bee World* **1978**, *59*, 139–157.
 38. Zenebon, O.; Tiglea, N.S.P.P. *Métodos Físico-Químicos Para Análise de Alimentos*, 4th ed.; Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, Brazil, 2008; p. 1020.
 39. Silva, R.N.; Monteiro, V.N.; Alcanfor, J.A.X.; Assis, E.M.; Asquieri, E.R. Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2003**, *23*, 337–341.
 40. Barros, L.; Heleno, S.A.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C.F.R. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT-Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 544–550.
 41. Instituto Português da Qualidade. *Géneros Alimentícios. Análise Microbiológica. Colheita de Amostras*; NP-1828:1982; Instituto Português da Qualidade: Caparica, Portugal, 1982.

42. Instituto Português da Qualidade. *Microbiologia Alimentar—Regras Gerais Para a Contagem de Microrganismos a 30 °C*; NP-3788:2002; Instituto Português da Qualidade: Caparica, Portugal, 2002.
43. International Standards Organization. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds—Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95*; US ISO 21527–2:2008; International Standards Organization: Winterthur, Switzerland, 2008.
44. International Standards Organization. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Sulfite-Reducing Bacteria Growing under Anaerobic Conditions*; ISO 15213:2003; International Standards Organization: Winterthur, Switzerland, 2003.
45. International Standards Organization. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection and Enumeration of Coliforms—Most Probable Number Technique*; ISO 4831:2006; International Standards Organization: Winterthur, Switzerland, 2006.
46. International Standards Organization. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp.*; ISO 6579:2002; International Standards Organization: Winterthur, Switzerland, 2002.



Capítulo III

Avaliação das propriedades Bioativas do pólen comercial

5. Avaliação das propriedades Bioativas do pólen comercial

Presentemente, o interesse nos compostos fenólicos, tem aumentado devido às capacidades antioxidantes e de sequestro dos radicais livres, prejudiciais à saúde humana [97]. O pólen apícola contém nutrientes essenciais, contendo assim, substâncias polifenólicas com possível atividade antioxidante.

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade que cada fenol exerce sobre determinado meio. O radical DPPH tem sido muito usado para se avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres em produtos apícolas, tais como pólen [84,98,85]. Esse método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH a 517 nm na presença de um antioxidante dador de hidrogénio, devido á formação de um não radical. O pólen apícola tem também atividade antimicrobiana, porém ele é mais conhecido pela sua atividade antioxidante, sabe-se no entanto, que o mecanismo de ação antimicrobiana deste produto é complexo e provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana [19].

5.1 – Material e Métodos

5.1.1 - Preparação dos Extratos Etanólicos do Pólen

Os extratos foram obtidos pesando 20 g de pólen que foi macerado num cadinho, posteriormente adicionou-se etanol a 80%, a mistura permaneceu no escuro durante 72h. Após este tempo filtrou-se e recolheu-se o filtrado. Procedeu-se do mesmo modo por mais 24h. No final juntaram-se os dois filtrados, obtendo-se assim o extrato etanólico de pólen (EEP). Evaporou-se o etanol num evaporador a vácuo rotativo (Rotavapor Buchi RE 111 with a Buchi46 1 water-bath, 2002) e pesaram-se os extratos. O extrato de pólen foi guardado á temperatura ambiente e no escuro, para posterior utilização.

5.1.2 - Propriedades bioativas do pólen

5.1.2.1 - Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais seguiu o método de Folin-Ciocalteu proposto por [77], utilizando o ácido gálico como padrão de referência [78,19].

Adicionou-se ao extrato etanólico de pólen (0,5 mL) 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na₂CO₃ (10% (m/V)). Manteve-se a mistura no escuro à temperatura ambiente durante uma hora. De seguida efetuou-se a leitura das absorvâncias a 700 nm num espectrofotómetro (Unicam Espectrometria UV-Visível Hekios, Reino Unido). O conteúdo de fenóis totais expressou-se em mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato (GAEs).

5.1.2.2 Atividade antioxidante

5.1.2.2.1 Método do DPPH

O método do DPPH (efeito bloqueador do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) baseia-se na redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil na presença de um antioxidante dador de hidrogénio, para se tornar uma molécula estável. Assim, uma diminuição de absorvância a 515 nm é produzida pela adição do antioxidante [79,80]. A atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por [81]. As soluções etanólicas de pólen (15mg/mL) foram diluídas com etanol a 80% a concentrações finais de 8; 6;4;3;2;1;0,5;0,1 e 0,05 mg/mL, faixa de concentrações necessárias devido às particularidades do pólen. Adicionou-se 0,3 mL de cada uma das concentrações de extrato etanólico de pólen a 2,7 mL de DPPH (6.0x10⁻⁵ M). Esta solução permaneceu no escuro 60 minutos, à temperatura ambiente.

As absorvâncias foram lidas a 517 nm num espectrofotómetro (Unicam Espectrometria UV-Visível Hekios, Reino Unido). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{Inibição} = [1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}] / \text{abs}_{\text{branco}} \times 100$$

5.1.2.2.2 Método do Poder redutor

O método do poder redutor consiste na redução de Fe³⁺/ferrocianeto para a forma ferrosa, quando existe na presença de redutores como substâncias antioxidantes. Logo, o Fe²⁺ pode ser monitorizado pela medida da absorvância a 700 nm pela formação do azul da Prússia [80,81]. Dependendo do poder redutor de cada extrato etanólico de pólen a cor amarelada que possui a solução vai variando entre os tons verde e azul.

Neste trabalho para quantificar o poder redutor utilizou-se a metodologia descrita por Moreira et al (2008) [77]. As soluções etanólicas de pólen (15mg/mL) foram diluídas com etanol a 80% a concentrações finais de 8; 6;4;3;2;1;0,5;0,1 e 0,05 mg/mL, faixa de concentrações necessárias devido às particularidades do pólen. Adicionou-se a cada concentração das amostras 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL ferrocianeto de potássio (10mg/mL) e incubou-se a mistura a 50 °C durante 20 minutos. Após este período, adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético (100mg/mL) e centrifugou-se durante 10 minutos (10.000rpm). Ao sobrenadante (2,5 mL) foi adicionado 2,5 mL de água desionizada e 0,5 mL de cloreto de ferro (1,0mg/mL).

As absorvâncias foram lidas a 700 nm num espectrofotómetro (Unicam Espectrometria UV-Visível Hekios, Reino Unido), o aumento da absorvância sugere um aumento do poder redutor. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

$$\% \text{Inibição} = [1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}] / \text{abs}_{\text{branco}} \times 100$$

5.1.2.3 Atividade antimicrobiana

Os microrganismos usados foram estirpes isoladas a partir de alimentos identificados no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança. Utilizaram-se duas bactérias gram positivas (*Staphylococcus epidermidis* sp e *Staphylococcus aureus* sp) e uma bactéria gram negativa (*Pseudomona Aeruginosa* sp) e duas leveduras *Candida albicans* sp e *Candida krusey* sp. Os inóculos das bactérias e das leveduras foram preparados individualmente, através de suspensão em

meio líquido, caldo nutritivo e YPD (Extrato de Levedura), respetivamente. Os microrganismos cresceram numa incubadora orbital (modelo SI50), as bactérias a 37 °C durante 24h e as leveduras a 25 °C durante 48h.

A avaliação da atividade do pólen contra bactérias e leveduras, e a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), que se define como a concentração de extrato mínimo capaz de inibir o crescimento de microrganismos, baseou-se no método de micro-diluição em microplaca [7], com algumas modificações.

A solução de extrato de pólen foi preparada com uma concentração de 50mg/mL, dissolvendo-se o extrato em DMSO (dimetil sulfóxido, p.a., Riedel-de Haên).

Numa microplaca estéril de 96 poços, foram colocados nos poços das colunas 2-8 e de 11-12, 100 µL de meio YPD (Extrato de Levedura) e nos poços das colunas 9-10 foram colocados 200 µL de meio com exceção da coluna, 1 à qual foram acrescentados 200 µL do extrato a testar, de concentração conhecida. De seguida, foram retirados 100 µL do conteúdo dos poços da primeira coluna para a seguinte, repetindo-se este procedimento até a coluna 8, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Em seguida, adicionaram-se 20 µL de uma suspensão de microrganismos aos poços das colunas de 2-8 e de 11-12 a testar. Os poços 9 e 10 foram realizados como controlo.

De seguida selaram-se as placas com um filme respirável (sealing film e BF-400-S) e foram incubadas durante 48 horas a 25°C para as leveduras e a 37°C durante 24h para as bactérias. Percorrido este período, foi adicionado 20 µL de uma solução de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium, para microbiologia, Fluka, Sigma - Aldrich) a partir da coluna 2, inclusive. A placa foi re-incubada por mais 3 horas à mesma temperatura e observou-se visualmente a mudança de cor [82], devido á introdução do TTC, que indica o crescimento dos microrganismos.

6 - Resultados e discussão

6.1 - Propriedades bioativas do pólen

6.1.2 - Análise aos Fenóis Totais

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos estão sumariados na figura 7. Verificou-se que o teor em compostos fenólicos das várias amostras analisadas foi heterogéneo (variação de 87,5%).

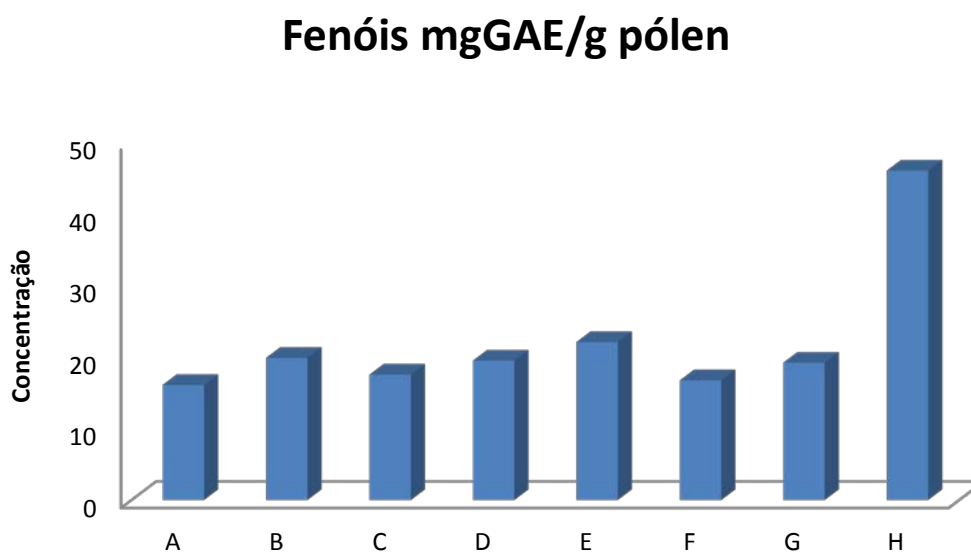


Figura 7 - Concentração dos compostos fenólicos nas várias amostras.

Estes variaram entre 16,079 e 48,903 mg GAE/g. A amostra de pólen H foi a que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais e a amostra A a menor quantidade. [83] obteve valores 8,1 mg GAE/g para o pólen do Brasil. [84] verificou que em amostras de pólen de Portugal e de Nova Zelândia a concentração de fenóis variou entre 10 a 32,5 mg GAE/g. [85] e [89] obtiveram resultados muito semelhantes aos do nosso estudo, com um teor de fenóis totais que oscilou entre 15,91 a 34,85 mg GAE/g. [19] em amostras de pólen do Brasil obteve para os fenóis valores entre 19-28 e 48,90 mg GAE/g.

6.1.3 - Análise á atividade Antioxidante (DPPH e poder redutor)

Os resultados da atividade antioxidante das diferentes amostras, estão resumidas nas figuras 8,9 e 10. Uma das formas de expressar a atividade antioxidante é através do EC_{50} , isto é, a concentração mínima necessária para que o antioxidante reduza em 50% o DPPH e o poder redutor, e foi calculada a partir do gráfico da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de [86,87,88].

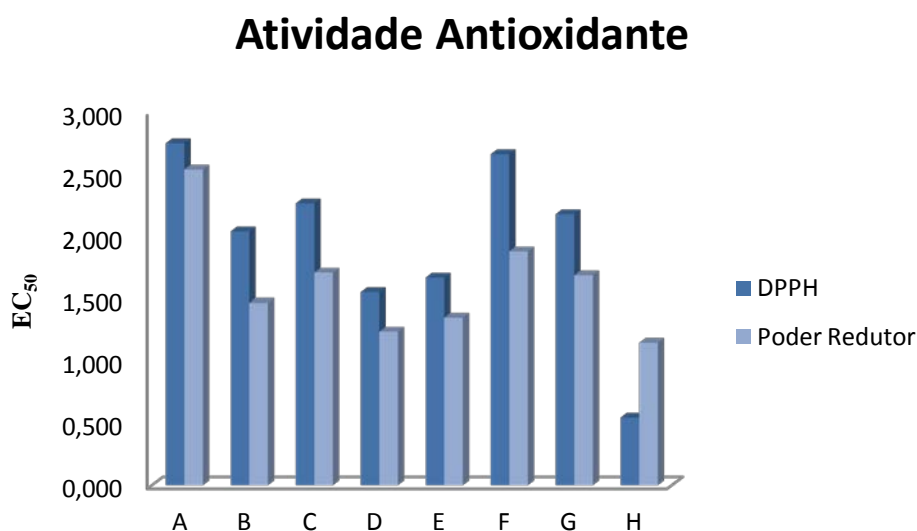


Figura 8 - Valores de EC_{50} para o poder redutor e para DPPH.

Os valores de EC_{50} determinados pelo método do DPPH variaram entre 2,745 e 0,545mg/ml, para as amostras A e H, respetivamente. A percentagem de inibição induzida pelas diferentes amostras, variaram entre 45,990% e 54,126%. Os resultados de EC_{50} obtidos pelo método do poder redutor oscilaram entre 1,146 e 2,534mg/ml.

Assim sendo, a amostra A foi aquela que evidenciou menor atividade antioxidante, quantificada por ambos os métodos, seguida da amostra F. A amostra que necessitou de menor quantidade para obter um efeito bloqueador de 50% foi a amostra H.

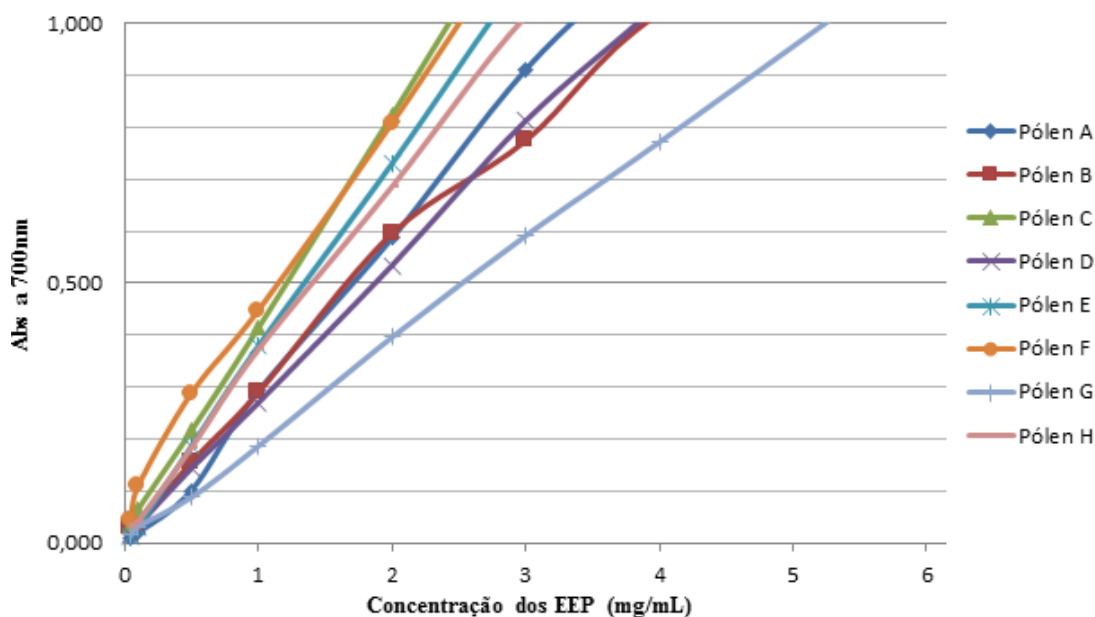


Figura 9 – Valores da capacidade redutora para os diferentes extratos etanólicos de pólen

[89] em pólen brasileiro obteve resultados semelhantes para a atividade antioxidante com valores que oscilaram entre 11,35mg/ml a 75,90mg/ml para o DPPH e valores entre 0,24 a 3,22mg/ml para o poder redutor.

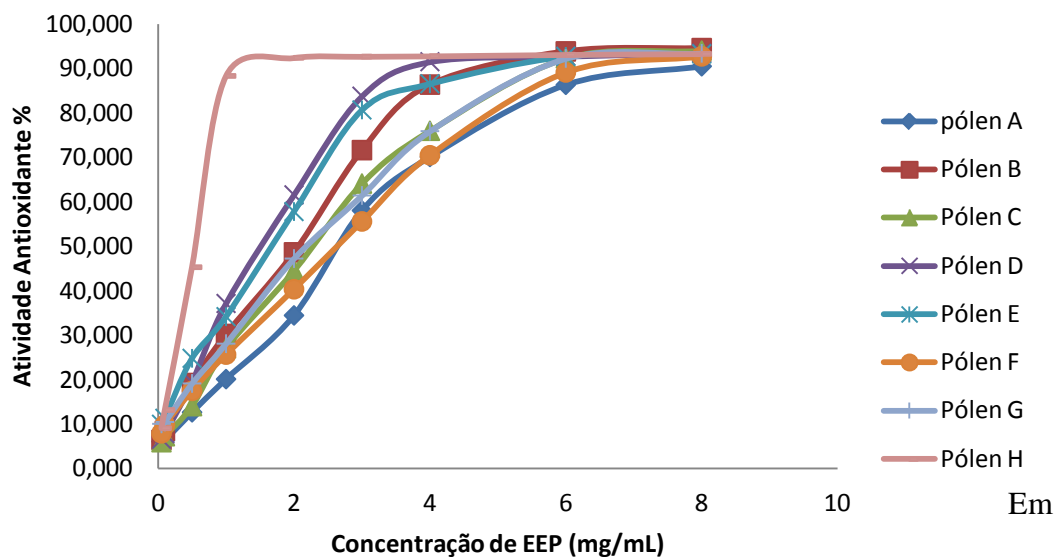


Figura 10 - Efeito bloqueador do radical DPPH em percentagem, dos diferentes extratos etanólicos de pólen.

todas as amostras de pólen testadas, verificou-se uma relação entre a concentração de extrato e o poder redutor (capacidade de reduzir o catião Fe^{3+} a forma de Fe^{2+} , isto é, a absorvância aumentou com o aumento da concentração dos extratos.

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana das várias amostras de pólen contra bactérias e leveduras.

Bactérias	Leveduras
-----------	-----------

6.1.4 - Atividade Antimicrobiana

Podemos verificar que todos os extratos etanólicos mostraram atividade antimicrobiana dependente da estirpe e de pólen testado. Os resultados obtidos estão representados na tabela 5. *S. aureus* sp (gram +) foi a mais resistente, seguida da *S. epidermidis* sp (gram +) com valores de CMI de 0,250%, enquanto que *P. aeruginosa* sp (gram -) demonstrou maior sensibilidade com valores a oscilarem entre 0,063 e 0,250%. Os pólenes que evidenciaram menor atividade antimicrobiana, contra bactérias, foram E, F e G. O pólen B foi o mais eficaz na inibição do crescimento das bactérias Gram + e Gram -, no entanto o CMI foi superior na Gram + (*S. aureus* sp). [7], obteve concentrações de inibição mais baixo para bactérias Gram + e mais elevado para bactérias Gram -, apesar do CMI ser idêntico para o *S. aureus* sp (0,21%).

Todos os extratos demonstraram atividade antifúngica. O pólen H é aquele que apresenta menor eficácia na inibição do crescimento de ambas as leveduras em estudo. Alguns autores [90,91] demonstraram que a atividade antimicrobiana está relacionada com teor em compostos fenólicos totais, apesar de [7] não observar tal relação. O pólen H possui maior teor de compostos fenólicos totais e foi o menos efetivo contra leveduras, isto sugere que outros fatores possam estar envolvidos. A natureza lipofílica dos fenóis pode muitas vezes reduzir as suas propriedades antimicrobianas [19].

As amostras B e G apresentam menor eficácia na inibição do crescimento da levedura *C. albicans* sp (0,250%) em relação á levedura *C. krusey* sp (0,125%).

[19] e [57] verificaram que o pólen não inibiu o crescimento dos microrganismos por eles estudados. No entanto [7] verificou inibição para todos os microrganismos estudados.

Amostra	<i>P. aeruginosa</i> (CMI%)	<i>S. epidermides</i> (CMI%)	<i>S. aureus</i> (CMI%)	<i>C. albicans</i> (CMI%)	<i>C. krusey</i> (CMI%)
A	0,063	0,250	0,250	0,125	0,125
B	0,125	0,063	0,250	0,250	0,125
C	0,188	0,250	0,250	0,125	0,125
D	0,063	0,250	0,250	0,125	0,125
E	0,250	0,250	0,250	0,125	0,250
F	0,250	0,250	0,250	0,125	0,125
G	0,250	0,250	0,250	0,250	0,125
H	0,094	0,250	0,250	0,250	0,250

7 – Considerações finais

No presente estudo caracterizou-se e avaliaram-se as propriedades do pólen apícola. Os resultados obtidos sugerem as seguintes considerações finais:

- Foram encontrados onze tipos polínicos nas amostras de pólen analisados.
- A *Cistaceae* seguida da *Fabaceae* foram as famílias predominantes nas amostras de pólen analisadas.
- 87,5% dos rótulos das amostras encontravam-se em conformidade com a Legislação Portuguesa.
- O teor de humidade, em todas as amostras foi superior ao limite estabelecido na Legislação Brasileira, o que indica ser necessário melhorar a secagem e o armazenamento do pólen.
- Os valores de proteína, lípidos e açúcares redutores indicam que o pólen é um bom suplemento alimentar.
- Os resultados obtidos para os vários parâmetros microbiológicos analisados indicaram que o pólen apícola comercial é seguro do ponto de vista microbiológico.
- Das leveduras isoladas foram identificadas seis espécies, *Rodothorula* foi dominante seguida do género *Candida*.
- Os teores de compostos fenólicos totais variaram entre 16,079 e 45,953 mg GAE/g.
- A atividade antioxidante (EC₅₀) dos EEP oscilou entre 0,545mg/mL e 2,745 mg/mL, 1,146mg/mL e 2,534 mg/mL para o método do DPPH e para o método do poder redutor, respetivamente.
- Os EEP mostraram atividade antimicrobiana para os microrganismos testados, dependente do microrganismo e da amostra em estudo.

Os resultados indicam que o pólen possui inúmeras propriedades bioativas pelo que, poderia ser utilizado em terapêutica e na alimentação como funcional. Com este estudo pensamos ter fornecido informações sobre o pólen apícola o que poderá contribuir para ele agregar valor comercial.

8 - Referências bibliográficas

47. Seeley, T.D. Ecologia da abelha, um estudo de adaptação na vida social. Ed. Paixão, Porto alegre. 2006.

48. Ramirez e Montenegro, G. Certificación del origen botânico de miel y pólen corbicular pertenecientes a la comuna de Litueche, VI Región de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*. 2004, 31, 197-211;
49. Moreti, A.C.C.C.; Marchini, L.C.; Souza, V.C.; Rodrigues, R.R. Atlas de pólen de plantas apícolas. Rio de Janeiro: Papel e Virtual. 2002, 93;
50. Pereira, A. S.; Seixas, F.R.M.S.; Neto, F.R.A: Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, São Paulo. 2002, 25, 321-326;
51. Wiese, H. Novo manual de apicultura. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS. 1995, 292;
52. Barreto, L. M. R. C.; Funari, R. C.; Orsi, R.O.; Dib, A. P. S. Produção do pólen no Brasil. Taubaté, SP, Cabral Editora e Livraria Universitaria. 2006, 100;
53. Silva, E.V.C; Oliveira,E.M; Gomes, L.M. Elaboração e caracterização de biscoito enriquecido com pólen coletado pelas abelhas *Apis mellífera*. *Higiene Alimentar*. 2009, 23, 171-177;
54. Serra Bonvehí, J.; Escolá Jordá, R. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 1997,45, 725-732;
55. Sabatini, A. G.; Carpana, E. Apicultura, o sabor de uma história : os produtos da apicultura. 2002, 108;
56. Torres, A.; Guinand, J.; Guerra Modernell, M. Propiedades nutricionales y estabilidad de los componentes de los alimentos. In: Guerra Modernell, M., coord. Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos. Madrid, Miranda: CYTED. 2003, 1, 1-18;
57. Vasconcelos, M. R. S. Pólen apícola do Estado de Alagoas: composição físico- química, origem botânica e atividade antioxidante. Dissertação, Universidade Federal de Alagoas, Brazil, Abril, 2009;
58. Modro, A.F.H. Flora e caracterização polínifera das abelhas *Apis mellifera* L. na região de Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006;
59. Lengler, S. Pólen apícola. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, Brazil, 2002;
60. Donadieu, Y. Le pollen - Therapeutique naturelle. Editora Librairie Maloine S. ^a, Paris, França. 1983, 99;

61. Moreti, A. C. Pólen: alimento protéico para as abelhas – complemento alimentar para o homem. Instituto de Zootecnia de São Paulo, 2004;
62. Franco B.D.G.M.; Landgraf, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996, 182;
63. Torres, A.; Guinand, J.; Guerra Modernell, M. Propiedades nutricionales y estabilidad de los componentes de los alimentos. In: Guerra Modernell, M., coord. Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos. Madrid, Miranda: CYTED, 2003, 1, 1-18;
64. Gonzalez-G, Hinojo MJ, Mateo R, Medina A, Jimenez M Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int J Food Microbiol.* 2005, 105, 1-9;
65. Rodrigues, M.A.A.; Keller, K.M.; Keller, L.A.M.; Oliveira, A.A.; Almeida, T.X.; Marassi, A.C.; Krüger, C.D.; Barbosa, T.S.; Lorenzon, M.C.A.; Rosa, C.A.R. Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de ilha Grande, Angra dos Reis, RJ* *Rev. Bras. Med. Vet.* 2008, 30, 249-253;
66. Gilliam, M. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie.* 1979, 10, 43-53;
67. Campos, M.G.; Cunha, A.; Markham, K.R. Bee pollen: composition, properties and application. In: MIZRAHI, A.; LENSKY, Y., eds. Bee products: properties, applications and apitherapy. New York: Plenum Press. 1997, 93-100;
68. Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K Anabolic effects of Bee Pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral-diaphyseal and -metaphyseal tissues of rats in vitro and in vivo. *Journal of Health Science.* 2006 52, 43- 49;
69. Shoskes, D. A. Phytotherapy in chronic prostatitis. *Urology.* 2002, 60, 35-37;
70. Mizrahi, A., Lensky, Y. Bee products: proerties, applications and apitherapy, Plenum Press: New York, 1997.
71. Buck AC, Rees RW, Ebling L. Treatment of chronic prostatitis and prostatodynia with pollen extract. *Br J Urol.* 1989, 64, 496-9;
72. Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K Anabolic effects of Bee Pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone

- components in the femoral-diaphyseal and -metaphyseal tissues of rats in vitro and in vivo. *Journal of Health Science*. 2006 52, 43- 49;
73. Shoskes, D.A.; Manickam, K. Herbal and complementary medicine in chronic prostatitis. *World Journal of Urology*. 2003, 21, 109-113;
 74. Wojcicki, J.; Samochowiec, L.; Bartlomowicz, B.; Hinek, A.; Jaworska, M.; Gawronska-szkarz, B. Effect of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 1986, 62, 39-45;
 75. Zhang, X.; Habib, F.K.; Ross, M.; Burger, U.; Lewenstein, A.; Rose, K.; Jatou, J. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth in vitro. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1995, 38, 735-738,
 76. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. 2000, 130;
 77. Moreira L., Dias L. G., Pereira J. A., Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46, 3482-3485;
 78. Meda, A., Lamien, c.n., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 2005, 91, 571-577;
 79. Ferreira, I. C. F. R.; Queiroz, Ma. J. R. P.; Vilas-Boas, M.; Estevinho, L. M.; Begouin, A.; Kirsch, G. Evaluation of the antioxidant properties of diarylamines in the benzo[b]tiophene series by free radical scavenging activity and reducing power. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2006, 16, 1384-1387;
 80. Ferreira, I. C. F. R.; Baptista, P.; Vilas-Boas, M.; Barros, L. Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*. 2007, 100, 1511-1516;
 81. Ferreira I. C.F.R, Aires E, Barreira J C.M., Estevinho L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. 2009, 114, 1438-1443;
 82. Tsukatani T., Suenaga H., Higuchi T; Akao T.; Ishiyama M., Ezoe K.; Matsumoto K. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in

- microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*. 2008, 75, 109-116;
83. Carpes, S. T.; Begnini, R.; Alencar, S. M.; Masson, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts. Antioxidant and antibacterial activity. *Ciencia e Agrotecnologia*. 2007, 31, 1818-1825;
 84. Campos, M.G.; Webby, R.F.; Markham, K.R.; Mitchell, K.A.; Da Cunha, A.P. Aged induced diminution of free radicals scavenging capacity in bee-pollens and the contribution of constituents favonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 742-745;
 85. Leja, M.; Mareczek, A.; Wyzgolik, G; klepacz-Baniak J.; Czekonska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*. 2007, 100, 237-240;
 86. Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S.; Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry*. 2002, 127, 183-198.
 87. Pereira J. A.; Pereira A. P. G.; Ferreira I. C. F. R.; Valentão P.; Andrade P. B.; Seabra R.; Estevinho L.; Bento A. Table Olives from Portugal: Phenolic Compounds, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 8425-8431;
 88. Chang L.W., Yen W.J, Huang S. C., Duh P.D. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry*. 2002, 78, 347-354;
 89. LeBlanc, B.W.; Davis, O.K.; Boue, S.; de Lucca, A.; Deeby, T. Antioxidant activity of sonoran desert bee pollen. *Food Chem.* 2009, 115, 1299–1305;
 90. Pereira, J.A.; Oliveira, I.; Sousa, A.; Valentão, P.; Andrade, P.; Ferreira, I.; Ferreres, F.; Bento, A.; Seabra, R.; Estevinho, L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45, 2287–2295;
 91. Estevinho, L.; Pereira, A.N.; Moreira, L.; Dias, L.G.; Pereira, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46, 3774-3779;

92. AOAC,1995. Official methods of analysis (16th edn.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists;
93. FNAP, Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Manual de criação de rainhas autóctones em Portugal, 2009;
94. FNAP, Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Manual de produção de Pólen e Própolis, 2010.
95. Zafra, A. O. El polen en su salud. Puebla, Pue: Florimiel. 1979, 61;
96. Moretti, A. C. C. C; Carvalho, C. A. L; Marchini, L, C; Oliveira, P. C. F. Espectro polínico de amostras de mel de *Apis mellífera* L., coletadas na Bahia. *Bragantia*, Campinas. 2000, 59, 1-6;
97. García, M.; Pérez-Arquillue, C.; Juan, T.; Juan, M. I.; Herrera, A. Note: Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. *Food Science and Technology International*, London. 2001, 7, 155-158;
98. Silva, T.M.S., Camara, C.A., Silva Lins, A.C., Barbosa-Filho, J.M., Sarmiento da Silva, E.M., Freitas, B.M. Szczęsna, T. Long-chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *Journal Apicultural Science*. 2006, 50, 65–79.