

Efeito do pólen fermentado na conservação e bioatividade do iogurte

Elena Pires Freitas Barra

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação
com o Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca
(CEFET/RJ) - Campus Valença-RJ*

Orientado por

Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Professor Doutor Miguel Meirelles de Oliveira

Bragança

2025

Agradecimentos

Agradeço a Deus o dom da vida, por ter me sustentado e me amparado nos momentos que mais precisei, por ter atendido todas as minhas preces e por ter me concedido tantas bênçãos.

Agradeço à minha mãe, Nilcilea, e à minha irmã, Giovanna, por confiarem em mim e serem meu maior incentivo ao longo desta jornada. Obrigada por me ensinarem, todos os dias, a enfrentar os momentos difíceis, mas agradecer e comemorar os momentos felizes. Obrigada por me rodearem de amor e por nunca saírem do meu lado. Vocês são a razão de todo meu ser.

Agradeço à toda minha família, pelo cuidado ao longo de toda minha vida, por me inspirarem e me incentivarem, por me ensinarem a levar uma vida digna e nunca desistir.

À minha orientadora, Prof. Doutora Letícia Estevinho, minha mais profunda admiração e gratidão por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência e por exercer com maestria a arte de ensinar.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Miguel Meirelles, agradeço por todos os ensinamentos ao longo da minha trajetória acadêmica, desde a graduação à conclusão do Mestrado. Obrigada por me incentivar e por compartilhar seu conhecimento.

Agradeço ao Prof. Doutor Luis Dias, por toda paciência, ensinamentos e disponibilidade sempre que precisei.

Agradeço à Doutora Vanessa por toda experiência compartilhada e pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço as mestres, Lais, Hellen e Maira, pelo companheirismo profissional, pelo apoio incondicional e por se tornarem uma verdadeira família ao longo desses meses.

Agradeço à mestre Beatriz, por ser minha fortaleza tão longe de casa, por ser sinônimo de amor, paciência e bondade. Por ser reflexo do cuidado de Deus comigo e por sempre estar ao meu lado.

Agradeço à minha melhor amiga, Marina, por corresponder com zelo, paciência e carinho uma amizade que percorre 8.000 km e se mantém inabalável.

Agradeço ao meu companheiro de jornada, Caíque, por todo carinho e paciência. Por me incentivar, me acalmar nos momentos de aflição e por tornar essa jornada mais leve e feliz.

Agradeço a todos meus amigos que estiveram ao meu lado, me apoiando e me encorajando a todo o momento.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte desta conquista. Àqueles que sonharam e realizaram esse sonho comigo, que me fizeram mais forte e resiliente ao longo do processo. Cada um tem um significado enorme em minha vida, de forma única e especial.

Elena Pires Freitas Barra

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo geral.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 2	4
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1. Iogurte	4
2.1.1. Mercado e consumo	6
2.1.2. Bactérias ácido-láticas.....	7
2.1.3. Processo de produção do iogurte.....	9
2.2. Aditivos alimentares	10
2.2.1. Aditivos alimentares naturais	12
2.2.2. Aditivos alimentares aplicados na produção de iogurte.....	13
2.2.3. Sorbatos.....	15
2.3. Pólen	16
2.3.1. Pólen fermentado.....	18
2.3.2. Principais propriedades do pólen fermentado	18
2.4. Fermentação	20
2.4.1. Tipos de fermentação	21
CAPÍTULO 3	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Amostra	24
3.2. Tratamento da amostra	24
3.3. Fermentação do pólen	24
3.3.1. Otimização das condições de fermentação.....	24

3.4. Preparação dos extratos	26
3.5. Produção dos iogurtes	27
3.6. Análises microbiológicas	29
3.6.1. Contagem de bolores e leveduras.....	29
3.6.2. Pesquisa e contagem de Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	30
3.6.3. Pesquisa e contagem de esporos de clostrídios sulfito redutores	30
3.6.4. Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	30
3.6.5. Contagem total de aeróbios mesófilos	31
3.6.6. Pesquisa e contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase-positiva	31
3.6.7. Contagem de bactérias lácticas	31
3.7. Análises químicas	32
3.7.1. Preparação para soluções	32
3.8. Análises físico-químicas	34
3.8.1. Análises físico-químicas ao fermentado	34
3.8.2. Análises físico-químicas ao iogurte	37
3.9. Análise Sensorial	40
3.10. Análise Estatística	41
CAPÍTULO 4	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Otimização das condições de fermentação	42
4.2. Composição química dos extratos de pólen e de iogurte	48
4.2.1. Composição química dos extratos de pólen <i>in natura</i> e pólen fermentado ..	48
4.2.2. Composição química dos extratos de iogurte.....	50
4.3. Análise microbiológica do pólen, do fermentado e do iogurte	52
4.3.1. Análise microbiológica do pólen <i>in natura</i> e do fermentado.....	52
4.3.2. Análise microbiológica do iogurte	55
4.4. Análises físico-químicos do fermentado e do iogurte	59
4.4.1. Análise físico-química do fermentado	59
4.4.2. Análise físico-química do iogurte	60
4.5. Análise sensorial das amostras de iogurtes	68

4.5.1. Sexo e Faixa Etária.....	68
4.5.2. Cor.....	69
4.5.3. Aroma.....	71
4.5.4. Sabor.....	72
4.5.5. Textura	74
4.5.6. Impressão Global.....	76
4.5.7. Análise estatística dos parâmetros sensoriais.....	77
CAPÍTULO 5.....	79
5. CONCLUSÃO	79
CAPÍTULO 6.....	81
6. REFERÊNCIAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via metabólica homofermentativa (à esq) e heterofermentativa (à dir.) em BALs.....	7
Figura 2 – Esquema de produção do iogurte.	9
Figura 3 – Fermentação alcoólica.....	21
Figura 4 – Fermentação láctica	22
Figura 5 – Ensaio da fermentação do pólen.....	26
Figura 6 – Extração do pólen após a fermentação.....	27
Figura 7 – Ebulição do leite para produção do iogurte.....	28
Figura 8 – Iogurte controlo com 0,03% de sorbato de potássio; iogurte com 0,25% e 0,5% de extrato de pólen fermentado, respetivamente.....	28
Figura 9 – Fluxograma de produção dos iogurtes.	29
Figura 10 – Retas de calibração obtidas para os compostos de fermentação analisados por HPLC: sacarose, glucose e frutose.....	36
Figura 11 – Crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos 19 ensaios.	42
Figura 12 – Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no ensaio 15.....	46
Figura 13 – Crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante a fermentação.	47
Figura 14 – Evolução do peso do frasco durante a fermentação.	47
Figura 15 – Resultado obtidos para o sexo dos provadores.	69
Figura 16 – Resultado obtidos para a faixa etária dos provadores.	69
Figura 17 – Resultado para a cor na amostra 827.....	70
Figura 18 – Resultado para a cor na amostra 394.....	70
Figura 19 – Resultado para a cor na amostra 561.....	71
Figura 20 – Resultado para o aroma na amostra 827.	72
Figura 21 – Resultado para o aroma na amostra 394.	72
Figura 22 – Resultado para o aroma na amostra 561.	72
Figura 23 – Resultado para o sabor na amostra 394.....	73
Figura 24 – Resultado para o sabor na amostra 827.....	74
Figura 25 – Resultado para o sabor na amostra 561.....	74
Figura 26 – Resultado para a textura na amostra 394.....	75
Figura 27 – Resultado para a textura na amostra 827.....	75
Figura 28 – Resultado para a textura na amostra 561.....	75
Figura 29 – Resultado para impressão global na amostra 394.	76
Figura 30 – Resultado para impressão global na amostra 827.	77
Figura 31 – Resultado para impressão global na amostra 561.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenho experimental para a otimização das condições de fermentação do pólen.	25
Tabela 2 – Dados da calibração do HPLC para a análise de sacarose, glucose e frutose.	36
Tabela 3 – Taxa de crescimento para os 19 ensaios experimentais.....	45
Tabela 4 – Taxa de crescimento celular.	48
Tabela 5 – Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH) para as amostras de pólen.	50
Tabela 6 – Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH) para as amostras de iogurte.	52
Tabela 7 – Resultados da análise microbiológica ao pólen in natura e ao pólen fermentado.	53
Tabela 8 – Resultados da análise microbiológica das amostras de iogurte.	58
Tabela 9 – Resultado da dinâmica dos açúcares durante a fermentação.	60
Tabela 10 – Resultados das análises físico-químicas (proteína, gordura, humidade e cinza) das amostras de iogurte.	64
Tabela 11 – Resultados obtidos nas análises físico-químicas das amostras de iogurte.	68
Tabela 12 – Resultados da análise sensorial das amostras de iogurte.	78

RESUMO

A crescente procura por alimentos *clean label* tem impulsionado o desenvolvimento de conservantes naturais de elevado valor funcional. Neste estudo teve como objetivo avaliar o potencial do extrato de pólen apícola fermentado como aditivo conservante em iogurte. O pólen foi submetido a um processo fermentativo com leveduras, de acordo com um delineamento experimental Plackett-Burman (19 ensaios), no qual se variaram três fatores: inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* (10^5 – 10^7 UFC/mL), o pH (3,5–4,5) e a massa de pólen (2,5–7,5 g). O ensaio otimizado conduzido com uma concentração inicial de *Saccharomyces cerevisiae* de 10^5 UFC/mL, pH de 4,9 e 5 g de pólen, originou um extrato com incremento significativo nos teores de fenóis totais (44,8 para 72,6 mg equivalentes ácido gálico/g) e na atividade antioxidante (89,8 para 170,9 mg equivalentes Trolox/g), em comparação com o pólen não fermentado. O extrato foi incorporado em iogurtes nas concentrações de 0,25% e 0,5% (m/v), sendo comparado com um controlo contendo sorbato de potássio (0,03%).

Após 28 dias de armazenamento, a formulação com 0,5% manteve níveis de fenóis totais de 14,3 mg equivalentes de ácido gálico/g e atividade antioxidante estável, superando os valores observados na amostra com conservante sintético. Todas as formulações apresentaram perfil microbiológico adequado, com contagens de bactérias ácido-lácticas superiores a 10^7 UFC/mL e ausência de microrganismos patogénicos. Na avaliação sensorial, a incorporação de 0,25% de extrato não comprometeu a aceitabilidade global do iogurte, enquanto a adição de 0,5% resultou numa redução da aceitação, particularmente nos atributos de sabor, textura e aroma. Os resultados obtidos indicam que o extrato de pólen apícola fermentado constitui uma alternativa viável e funcional aos conservantes sintéticos, contribuindo simultaneamente para a conservação e valorização nutricional de iogurtes.

Palavras-chave: Pólen fermentado, Iogurte, Aditivo, Conservante, Bioatividade.

ABSTRACT

The growing demand for clean-label foods has fostered the development of natural preservatives with high functional value. This study aimed to assess the potential of fermented bee pollen extract as a preservative in yogurt. Pollen was subjected to yeast fermentation according to a Plackett–Burman experimental design (19 trials), in which three factors were varied: *Saccharomyces cerevisiae* inoculum (10^5 – 10^7 CFU/mL), pH (3.5–4.5), and pollen mass (2.5–7.5 g). The optimized assay, conducted with an initial *S. cerevisiae* concentration of 10^5 CFU/mL, pH 4.9, and 5 g of pollen, produced an extract with significant increases in total phenolic content (44.8 to 72.6 mg gallic acid equivalents/g) and antioxidant activity (89.8 to 170.9 mg Trolox equivalents/g), compared with unfermented pollen. The extract was incorporated into yogurts at 0.25% and 0.5% (w/v) and compared with a control containing potassium sorbate (0.03%). After 28 days of storage, the 0.5% formulation retained 14.3 mg GAE/g and stable antioxidant activity, surpassing the values observed in the synthetic preservative sample. All formulations presented adequate microbiological quality, with lactic acid bacteria counts above 10^7 CFU/mL and absence of pathogenic microorganisms. Sensory evaluation showed that the incorporation of 0.25% extract did not compromise overall acceptability, whereas the addition of 0.5% reduced acceptance, particularly in flavor, texture, and aroma. These results demonstrate that fermented bee pollen extract is a viable and functional alternative to synthetic preservatives, enhancing both preservation and nutritional value of yogurt.

Keywords: Fermented pollen, Yogurt, Additive, Preservative, Bioactivity.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observa-se uma crescente preocupação dos consumidores com a qualidade nutricional e a segurança dos alimentos incluídos em sua dieta cotidiana. Esse movimento em direção a hábitos alimentares mais saudáveis tem impulsionado transformações significativas no mercado alimentício, com a demanda crescente por produtos naturais e com alto valor nutricional.

Nesse cenário, há uma maior exigência para produtos de “rótulo limpo” (*clean label*), com a valorização ingredientes e aditivos de origem natural, minimamente processados e que ofereçam benefícios funcionais. Assim, uma das estratégias adotadas pela indústria para atender essas novas exigências é a redução do uso de aditivos químicos e conservantes sintéticos nos alimentos industrializados, buscando substituí-los por produtos de origem natural.

Entre os alimentos considerados saudáveis, o iogurte destaca-se como um dos produtos lácteos fermentados de maior relevância no mercado global. Reconhecido por seu elevado valor nutricional, o iogurte também é valorizado pelos benefícios à saúde associados à presença de culturas probióticas. Seu consumo regular tem sido relacionado à melhora do equilíbrio da microbiota intestinal, ao fortalecimento do sistema imunológico e à prevenção de doenças metabólicas e gastrointestinais.

Entretanto, com a tendência de redução no uso de aditivos químicos, torna-se necessário buscar alternativas naturais que prolonguem a vida útil do produto sem comprometer sua qualidade. Nesse contexto, o pólen fermentado, também conhecido como “pão de abelha”, surge como uma alternativa promissora de conservante natural e agente bioativo. Produzido a partir da mistura de pólen de flores com néctar e secreções das abelhas, o pólen passa por um processo de fermentação microbiana, resultando em um produto rico em compostos fenólicos, flavonoides, ácidos orgânicos e enzimas.

Essa composição bioquímica complexa, por sua vez, confere ao pólen fermentado propriedades antioxidantes e antimicrobianas significativas, tornando-o potencial substituto de conservantes sintéticos como o sorbato de potássio, amplamente utilizado em laticínios e outros produtos industrializados.

Diante desse contexto, o presente trabalho propõe investigar o efeito do extrato de pólen fermentado na conservação e bioatividade do iogurte, com o objetivo de avaliar sua

viabilidade como aditivo alimentar natural, capaz de substituir ou reduzir a necessidade de conservantes químicos convencionais. Para isso, serão realizadas a caracterização da composição fenólica e microbiológica do pólen antes e após sua fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, além do desenvolvimento de formulações de iogurte contendo diferentes concentrações do extrato de pólen fermentado, com comparação da qualidade e estabilidade dessas formulações, frente a um controle com sorbato de potássio, por meio de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

A escolha do pólen fermentado como objeto de estudo justifica-se por diversos aspectos. Trata-se de um produto com potencial multifuncional, que pode atuar como conservante natural, além de oferecer propriedades antioxidantes e antimicrobianas, agregando valor funcional ao iogurte. Ademais, por ser um subproduto oriundo da atividade apícola, possui origem natural, renovável e sustentável, alinhando-se às diretrizes da economia circular e da preservação ambiental.

Este estudo também busca preencher uma lacuna na literatura científica. Embora existam investigações sobre a aplicação de extratos vegetais em laticínios, são escassas as pesquisas que avaliem especificamente o uso de pólen fermentado em iogurtes enquanto aditivo natural substituto, sobretudo no que diz respeito à otimização do processo fermentativo e à avaliação sensorial dos produtos desenvolvidos.

Em termos de relevância prática, esta pesquisa oferece subsídios para a indústria de laticínios interessada em desenvolver produtos com perfil *clean label*, reduzindo a dependência de conservantes sintéticos sem comprometer a segurança microbiológica nem as características sensoriais do iogurte. Contribui ainda para o avanço do conhecimento científico sobre a utilização de subprodutos apícolas como ingredientes funcionais, ampliando suas possibilidades de aplicação em outros segmentos da indústria alimentícia.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Analisar a composição de pólen antes e após a fermentação, e avaliar a aplicação do extrato deste pólen como aditivo natural na conservação e bioatividade de iogurte.

1.1.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil do pólen através da determinação da composição fenólica e qualidade microbiológica;
- Otimizar o processo de fermentação com base num desenho experimental;
- Realizar a fermentação do pólen, monitorizar o processo fermentativo através de métodos convencionais e eletroquímicos;
- Analisar a qualidade do pólen fermentado através de análises físico-químicas, determinação do perfil fenólico e análises microbiológicas;
- Preparar um iogurte substituindo o conservante convencionalmente utilizado na indústria (sorbato de potássio) pela adição do extrato do pólen.
- Preparar um iogurte apenas com adição do antimicrobiano sorbato de potássio;
- Analisar e comparar as características físico-químicas, perfil fenólico e qualidade microbiológica das amostras de iogurte com adição do extrato de pólen fermentado e a amostra controlo com sorbato de potássio.

CAPÍTULO 2

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Iogurte

O iogurte é um produto lácteo amplamente reconhecido por seu valor nutricional e benefícios para a saúde. Em termos gerais, este produto pode ser descrito como produto resultante do processo de fermentação láctea conduzida por determinados gêneros de bactérias, principalmente *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, em leite integral, desnatado ou padronizado (Santos & Ellena, 2021).

A sua composição inclui uma baixa quantidade de lactose, que é decomposta durante o processo de fermentação (Yang et al., 2021). Além disso, o iogurte é uma fonte rica em proteínas, minerais essenciais, como cálcio e fósforo, e vitaminas, com destaque para a vitamina B12. Ainda, a presença de bactérias no iogurte contribui para a promoção da saúde, especialmente para o equilíbrio da flora intestinal (Pietta & Palezi, 2015).

Referindo de forma sumaria a sua história, os primeiros relatos de produção e consumo de iogurte remonta a aproximadamente quatro mil anos atrás, com tribos nômades da Ásia Central e do Oriente Médio que, ao transportar leite em peles de animais, criavam um ambiente adequado para a proliferação de bactérias que, por sua vez, iniciavam o processo fermentativo, resultando no que conhecemos hoje como iogurte (APN, 2013).

Uma das primeiras pesquisas documentadas relacionada com o iogurte foi desenvolvida pelo cientista búlgaro Stamen Grigorov, que avaliou a evolução de um pote de argila contendo iogurte caseiro. Após um ano de estudos, ele identificou a bactéria *Lactobacillus bulgaricus*, a qual recebeu esse nome em homenagem à Bulgária, onde o consumo de iogurte é significativo sendo a base de diversos pratos tradicionais (Fisberg & Machado, 2015).

Gradualmente, o iogurte passou de alimento caseiro e artesanal a uma produção controlada por empresas de alimentos, que introduziram técnicas e maquinaria para criar um produto com menos acidez e mais saboroso (Ban et al., 2020). Também foram estabelecidas medidas rigorosas de controlo sanitário na produção, utilização de

equipamentos específicos e culturas microbianas puras, eliminando microfloras que antes estavam presentes no iogurte caseiro possibilitando a produção em larga escala para comercialização (Fisberg & Machado, 2015).

A comercialização do iogurte teve início na França e na Espanha na década de 1920, mas foi apenas a partir dos anos 1960 que o consumo cresceu significativamente, em decorrência do avanço das técnicas de processamento e à valorização de suas qualidades nutricionais e terapêuticas (Martin et al., 2011). Atualmente, existe uma grande variedade de produtos disponíveis comercialmente, como iogurte congelado, líquido e em forma de bebida, além de outros produtos alimentícios que possuem o iogurte como ingrediente (Weerathilake et al., 2014).

Por se tratar de um produto fermentado, a partir da ação de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, além de outras bactérias ácido-láticas, o iogurte é considerado um “alimento vivo”, podendo conter até cinco bilhões de células por grama (Borges et al., 2010). Nas técnicas modernas, a quantidade e o tipo de bactérias ácido-láticas utilizadas na produção de iogurte são parâmetros altamente controlados, já que eles contribuem para complementar as características do produto final, como cor, odor, aspecto e sabor (Yang et al., 2021).

Em relação aos tipos de iogurte, a Associação Portuguesa de Nutricionistas – APN (2013) faz diferentes divisões de acordo com alguns parâmetros. O primeiro deles é em relação aos ingredientes, sendo classificados como: natural, que é o iogurte sem quaisquer ingredientes adicionados, sem considerar a matéria-prima, cultura microbiana e ingredientes facultativos; açucarado, que se refere ao iogurte natural com adição de açúcar, sacarose ou edulcorantes; e, aromatizados, quando são adicionados ingredientes aromáticos ou aditivos alimentares ao produto.

Também podem ser classificados de acordo com o seu estado de consumo, dividindo-se em sólidos, que são os coagulados diretamente nas embalagens para a venda em pedaços, batido, que são previamente coagulados e posteriormente embalados, e líquidos, em que o iogurte é liquefeito depois de coagulados. Além disso, podem ser classificados conforme o seu teor de gordura: gordos, com um teor mínimo de gordura de 3,5% (m/m) na parte láctea; meio gordos, com um teor mínimo de 1,5% e máximo de 1,8% (m/m); e magros, com um teor máximo de gordura de 0,3% (m/m) (APN, 2013).

2.1.1. Mercado e consumo

Nos últimos anos, houve um aumento constante nas vendas e na valorização dos iogurtes, quer lácteos quanto não lácteo, destacando seu papel como uma opção saudável, saborosa e natural na dieta. Em termos de valor, de acordo com projeções, o mercado de iogurte está avaliado em US\$ 105,61 bilhões para 2024, maior que os US\$ 101,02 bilhões atingidos em 2023. Ainda, a expectativa é que deverá expandir-se para US\$ 135,84 bilhões até 2029, o que representa um crescimento anual composto (CAGR) de 5,16% entre 2024 a 2029 (Mordor Intelligence, 2023).

Globalmente, em média, 57% dos consumidores compram iogurte regularmente, com variações significativas por país. Em 2020, 29% dos consumidores aumentaram o seu consumo de iogurte, principalmente por razões de saúde devido à pandemia do COVID-19, enquanto 60% mantiveram os seus níveis de consumo estáveis e apenas 11% diminuíram. A Ásia lidera o mercado de iogurtes, representando 43% das vendas em valor, seguem-se a China e Japão, o Brasil e os Estados Unidos (Dairy Industries International, 2021).

Em relação aos hábitos de consumo, a saúde é um fator crucial na compra e consumo de iogurte, uma vez que são uma fonte rica em probióticos, os quais oferecem suporte imunológico e benefícios digestivos aos consumidores. A demanda por maior teor de proteínas e fibras, redução de açúcar e gordura, juntamente com opções sem lactose, também é observada, com consumidores demonstrando disposição para pagar mais por benefícios adicionais à saúde (Silva & Pandolfi, 2020).

Atualmente, é dada grande importância à autenticidade orgânica, à procedência, ao rótulo limpo e à origem dos produtos. Além disso, também tem sido dada relevância à área sensorial, através do desenvolvimento de novas combinações de sabores e texturas aprimoradas, especialmente para opções de baixo teor calórico (Valério et al., 2022). Embora os sabores de frutas dominem os lançamentos globais de produtos, há uma tendência de desenvolvimento de novos sabores, sobretudo os vegetais. De facto, ingredientes como a beterraba e cenoura estão a ser cada vez mais utilizados para corar e dar sabor ao iogurte, refletindo uma tendência em direção a sabores mais naturais e ingredientes locais e regionais (António et al., 2023).

2.1.2. Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas (BALs) são microrganismos gram-positivos que podem assumir a forma de cocos (morfologia esférica) ou bacilos (morfologia cilíndrica), não formam esporos e não possuem catalase¹. A sua característica distintiva é a capacidade de realizar a fermentação láctica, produzindo ácido láctico (Kegele et al., 2022).

Os gêneros mais relevantes de BALs incluem *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* spp e *Lactococcus* spp. Em relação a sua classificação, elas podem ser divididas de acordo com as vias metabólicas de hidratos de carbono, separando-se entre homofermentativas ou heterofermentativas (Olmos et al., 2023).

As homofermentativas geram exclusivamente, como produto final da fermentação, o ácido láctico, enquanto as heterofermentativas também geram outros compostos, como ácido acético, dióxido de carbono e etanol, os quais conferem atributos de sabor e aroma aos produtos fermentados. Essas características tornam essas bactérias altamente valorizadas pela indústria de laticínios, como no fabrico do iogurte (Silva et al., 2020). A Figura 1 apresenta um esquema das vias metabólicas.

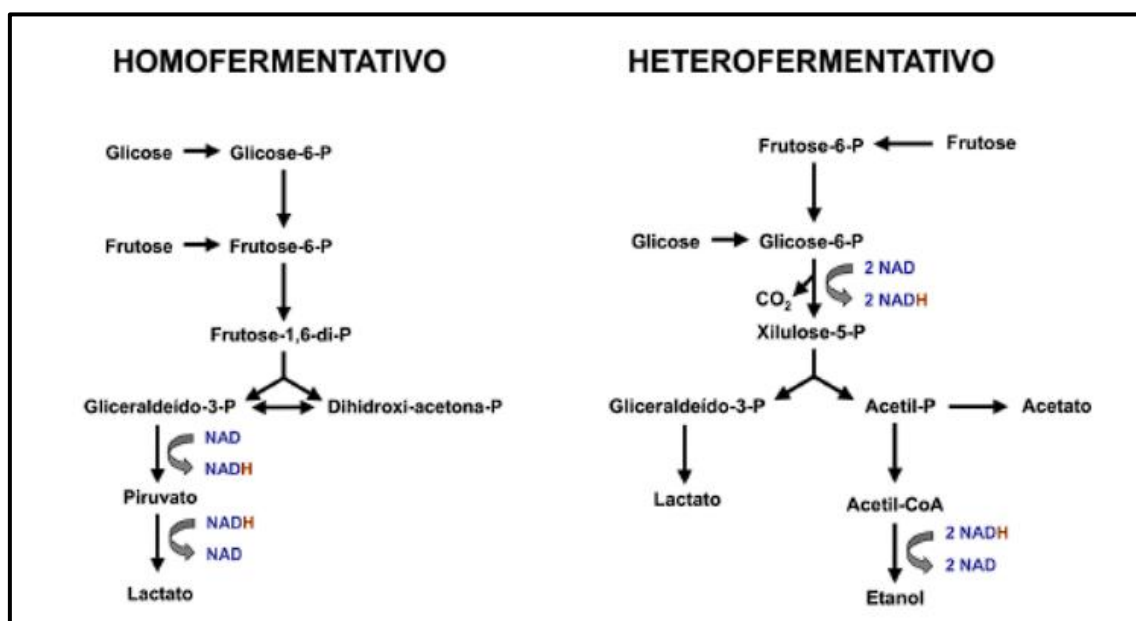


Figura 1 – Via metabólica homofermentativa (à esq) e heterofermentativa (à dir.) em BALs.

Fonte: Paula (2014)

¹ Enzima sintetizada por praticamente todos os seres vivos e que desempenha um papel crucial na decomposição do peróxido de hidrogênio, uma substância nociva para as células, ao passo que a catalase realiza a conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, ambos inofensivos ao organismo. Ao realizar essa decomposição, a catalase neutraliza a toxicidade do peróxido de hidrogênio.

Também é possível categorizá-las como mesófilas ou termófilas. As mesófilas apresentam uma temperatura ideal de crescimento entre 30 e 35 °C, sendo que a produção de ácido lático por estas bactérias é lenta ou até mesmo interrompida em temperaturas abaixo de 20 °C e inibida em temperaturas acima de 39 °C. Já as termófilas multiplicam-se a temperaturas entre 40 e 45 °C, podendo sobreviver em condições de até 55 °C (Pereira et al., 2020a).

Algumas culturas termófilas formam uma relação simbiótica, onde o seu crescimento e produção de ácido lático são estimulados pela interação mútua. Em geral, os bastonetes são responsáveis pela liberação de aminoácidos e peptídeos no leite, impulsionando o crescimento dos cocos, que por sua vez aumentam a produção de ácidos, diminuindo o pH do meio e favorecendo o crescimento dos bastonetes (Silva et al., 2020)

A relação entre temperatura e pH influencia o crescimento destas bactérias, com os bastonetes sendo menos tolerantes a altas temperaturas, mas mais tolerantes a pH reduzido. Conseqüentemente, os cocos iniciam a fermentação em condições de temperatura mais elevada, mas à medida que o meio arrefece e o pH diminui, devido à produção de ácido lático, os bastonetes passam a predominar (Pereira et al., 2020a).

Especificamente na produção do iogurte, as BALs mais utilizadas são *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, ambas espécies termófilas que operam de maneira simbiótica. Também é comum a introdução de outras bactérias ácido-láticas para conferir diferentes características ao produto final, como, por exemplo, a adição de microrganismos probióticos (Ayivi & Ibrahim, 2022).

O *S. thermophilus* é de fácil desenvolvimento no leite, um meio propício para sua proliferação. Ao elevar o pH do meio, são liberadas substâncias como formiato, piruvato, folato, CO₂ e outros ácidos que estimulam o crescimento do *L. bulgaricus*. Este, por sua vez, produz protéases capazes de hidrolisar a caseína em peptídeos, e subsequentemente em aminoácidos, consumidos pelo *S. thermophilus* (Sereia et al., 2022).

Devido à incapacidade de produzir protéases extracelulares, essa cooperação facilita um segundo surto de crescimento para o *L. bulgaricus*. Todo esse processo de crescimento simbiótico durante a fermentação, ocorre a formação de compostos carbonílicos, tais como acetaldeído, acetona, diacetil e etanol, os quais desempenham um papel fundamental nas características sensoriais do iogurte (Bourgeois & Larpent, 1995).

2.1.3. Processo de produção do iogurte

A metodologia de produção do iogurte pode variar, indo desde métodos artesanais/tradicionais até mais avançados ou industriais. No método industrial para comercialização em larga escala, a produção segue o esquema apresentado na Figura 2.

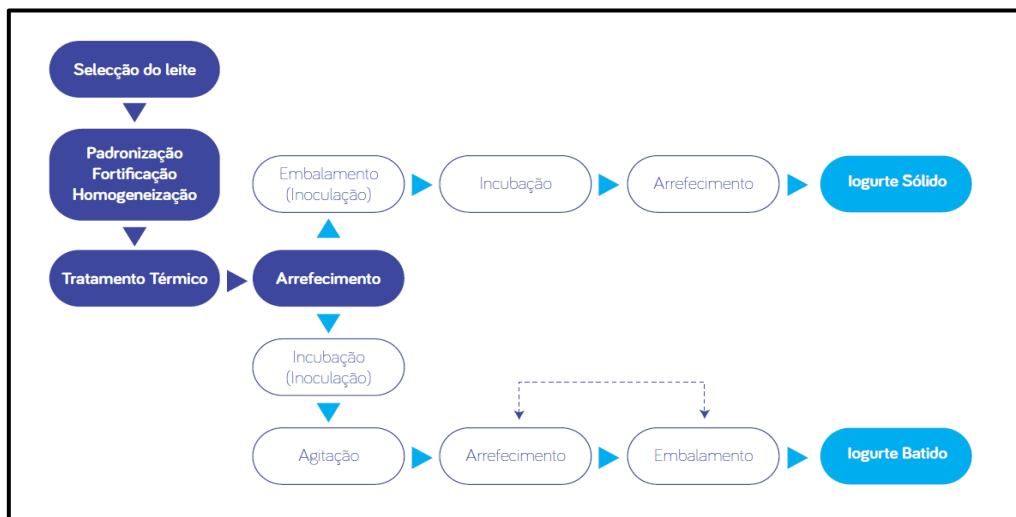


Figura 2 – Esquema de produção do iogurte.
Fonte: APN (2013)

Assim, é possível observar que os vários tipos de iogurte compartilham as mesmas etapas principais de produção, apenas alterando a sequência ou adicionando uma etapa para modificar a sua consistência. Estas etapas principais são o pré-tratamento, que incluem padronização e homogeneização, a pasteurização, o arrefecimento, a fermentação ou incubação com a adição de cultura, o resfriamento, a adição de aromas e sabores, o envase e o armazenamento (APN, 2013).

O pré-tratamento do leite é crucial, já que vários fatores nesta etapa influenciam diretamente a qualidade do iogurte. Aspectos sensoriais e tecnológicos, como sabor, aroma, viscosidade, consistência, aparência, maior vida útil e ausência de soro, são influenciados por fatores como a escolha do leite, sua padronização, aditivos, homogeneização, tratamento térmico, seleção da cultura e configuração do processo (Revers et al., 2016).

O leite cru, matéria-prima principal da produção de iogurte, deve ser mantido refrigerado abaixo de 4°C para evitar a multiplicação de microrganismos indesejados. A primeira etapa é a padronização, realizada para manter uma qualidade consistente (teor de gordura e de sólidos não gordurosos) entre diferentes lotes, utilizando métodos como evaporação, remoção parcial da gordura, mistura com leite concentrado, entre outros

(Alvarenga, 1995).

Em seguida, é realizada a homogeneização, para evitar a formação de aglomerados sólidos durante a incubação e garantir uma distribuição uniforme da gordura do leite. Assim, garante-se uma consistência mais suave e estável nos produtos lácteos fermentados, embora possa afetar a eficiência de separação e a estabilidade ao calor (Silva, 2007).

O próximo processo é o tratamento térmico, por meio da pasteurização, para destruir microrganismos indesejáveis, estimular ou inibir a preparação das culturas e alterar as propriedades físico-químicas do leite relevantes para o fabrico do iogurte. Antes de iniciar a pasteurização, também são adicionados aditivos, como açúcares, edulcorantes e/ou estabilizantes. No caso de polpa ou suco de frutas, elas devem ser adicionadas somente no final, já que podem inibir o processo fermentativo (Alvarenga, 1995).

A pasteurização é realizada a uma temperatura de 90°C a 95°C por cerca de 5 minutos, seguida por um resfriamento para a temperatura de fermentação de 42 a 45°C. A esta temperatura, realiza-se inoculação das culturas iniciais (Ramos et al., 2009). Na produção de culturas no laboratório utilizam-se tecnologia avançada para atender às demandas de sabor e viscosidade, permitindo a produção de uma variedade de iogurte com diferentes características sensoriais. Em seguida, é realizada a incubação, período necessário para a fermentação do leite, cuja duração é determinada pela atividade metabólica do inóculo e pode variar de 3 a 8 horas (Silva, 2007).

Após o processo de fermentação, é essencial resfriar imediatamente o produto utilizando um meio com circulação de água fria. Em seguida, deve-se proceder à adição gradual de polpas ou sucos de frutas, quando no caso. O produto final deve ser armazenado em geladeira ou câmara fria, mantendo uma temperatura de aproximadamente 5°C. Isto é necessário para retardar a degradação física e química, controlar a atividade dos microrganismos fermentativos presentes e interromper a produção de ácido lático (Alvarenga, 1995).

2.2. Aditivos alimentares

Até um passado recente, a comercialização de alimentos era um processo local, isto é, eram comercializados na mesma região em que eram produzidos, devido ao reduzido tempo de vida de prateleira que possuíam e a aspetos logísticos (Honorato et al., 2013). No entanto, com a chegada da globalização e avanços na logística, passou-se

a adicionar substâncias aos alimentos de modo a garantir a sua conservação e qualidade por mais tempo, além do seu transporte por longas distâncias (Jaques, 2020).

Assim surgiram os aditivos alimentares, que, de acordo com a Portaria nº 540/1997 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Agência Sanitária Brasileira, pode ser descrito como qualquer ingrediente adicionado “[...] aos alimentos com o propósito de modificar as suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante várias etapas do processo de produção e manuseio” (BRASIL, 1997).

Também, de acordo com o Regulamento CE nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, um aditivo é definido como uma substância que não se consome isoladamente como alimento e não é utilizada como ingrediente. Em vez disso, é adicionada intencionalmente com um propósito tecnológico, com a finalidade de modificar as características químicas, físicas, sensoriais ou biológicas durante a fabricação, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento (UNIÃO EUROPEIA, 2008).

Os aditivos são empregues na produção de alimentos com o objetivo de manter a qualidade nutricional, prolongar a conservação, melhorar a estabilidade ou as características organolépticas dos alimentos, desde que não alterem a natureza, essência ou qualidade dos mesmos. Dentre as funções dos aditivos estão a conservação, aromatização/saborização, coloração, espessamento/estabilização e acidificação (Honorato et al., 2013).

De acordo com o *Codex Alimentarius*, uma coletânea de padrões internacionais e orientações relativas a alimentos e à sua produção, os aditivos alimentares são identificados pelas letras E, seguindo o esquema de numeração do Sistema Internacional de Numeração (*International Numbering System – INS*) (Polete & Cruz, 2011).

Os corantes são classificados de E100 a E199, os conservantes de E200 a E299, os antioxidantes de E300 a E399, os espessantes de E400 a E499, os reguladores de pH de E500 a E599 e os intensificadores de sabor de E600 a E699. Ainda existem outros aditivos classificados como vários (E900 a E999), que enquadra os edulcorantes, e químicos adicionais (E1100 a E1599) (FAO/WHO, 1995).

Com os progressos na indústria química, a indústria alimentícia passou a utilizar uma variedade de aditivos para melhorar a conservação e atender às demandas do mercado consumidor. Além da estabilidade econômica, fatores como a mudança nos padrões de trabalho, praticidade e aceitação do consumidor têm impulsionado o consumo de alimentos industrializados. Embora os aditivos alimentares desempenhem um papel

crucial no desenvolvimento de alimentos, a sua utilização tem suscitado preocupações entre os consumidores (Souza et al., 2019).

Nos últimos anos, a segurança alimentar tornou-se uma preocupação crescente e os aditivos estão no centro dessas discussões, já que embora contribuam para maior preservação dos alimentos, também representam um risco à saúde. Assim, vêm sendo realizadas pesquisas para a substituição dos conservantes químicos por naturais.

2.2.1. Aditivos alimentares naturais

Os aditivos alimentares naturais são aqueles que podem ser encontrados naturalmente nos alimentos ou extraídos de fontes naturais, diferente dos tradicionais, ou sintéticos, que são sintetizados em laboratório (Pereira et al., 2020b). Os aditivos sintéticos estão amplamente usados na indústria em decorrência de sua estabilidade química, facilidade de aplicação e baixo custo. Contudo, nos últimos anos, tem surgido uma tendência significativa na indústria alimentícia em substituir os aditivos sintéticos por substâncias naturais, devido às preocupações com sua alta toxicidade e problemas alérgicos associados (Zeece, 2020).

Uma parcela significativa de consumidores está cada vez mais preocupada com os ingredientes presentes nos alimentos, tanto em termos de sua origem quanto dos efeitos que têm ao serem consumidos (Felipe & Bicas, 2016). Isso tem levado a uma crescente consciência de que a ingestão de alimentos naturais ou minimamente processados, aliada a hábitos saudáveis, pode promover uma melhor qualidade de vida e a redução do risco de doenças metabólicas, como obesidade e diabetes, entre outras. Assim, a procura por "rótulos limpos", ou seja, sem a presença de aditivos sintéticos, tornou-se uma tendência e um desafio para a indústria de alimentos (Pereira et al., 2020b).

Essa mudança tem motivado pesquisa em busca de novas fontes naturais com potencial para serem utilizadas como aditivos alimentares. O esforço para se adaptar às demandas do mercado consumidor atual tem motivado pesquisadores a explorar fontes de aditivos naturais e técnicas de recuperação emergentes (Lachno et al., 2019). Estudos recentes têm revelado o potencial de diversas fontes naturais para a extração ou recuperação de aditivos, apesar dos desafios envolvidos, como sua estabilidade e interação com os compostos dos alimentos e no organismo humano. Antioxidantes, corantes, compostos aromáticos e agentes de textura estão entre as categorias de aditivos mais estudadas (Zeece, 2020).

Fontes vegetais, sobretudo algumas espécies de pimentas, como a Habenero (*Capsicum chinense*), têm sido a principal fonte para a obtenção de compostos aromáticos naturais. No âmbito de corantes, estes podem ser extraídos principalmente de resíduos industriais, como resíduos de casca de tomate e tomates maduros não vendidos, algas ou microalgas marinhas, e outras fontes, como amora, arroz integral, cogumelos e casca de limão (Pereira et al., 2020b).

A investigação sobre a extração de antioxidantes naturais tem sido ampla, sendo avaliadas várias matrizes, por exemplo: extrato de orégano, aspargos, madeira de carvalho, sálvia, resíduos industriais de romã, entre outros. Além disso, algas ou microalgas e matrizes vegetais, como flores, têm sido exploradas para a recuperação de aditivos naturais que podem ser utilizados como agentes de textura (Pereira et al., 2020b).

2.2.2. Aditivos alimentares aplicados na produção de iogurte

À semelhança de outros produtos industrializados, o iogurte pode ser acrescido de diferentes aditivos, de modo a alterar uma ou mais características do produto. De acordo com a regulamentação brasileira (Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro 2007 do MAPA), a quantidade de ingredientes adicionados ao iogurte não pode ultrapassar 30% m/m. Já na norma portuguesa (Portaria nº 742, de 24 de julho de 1992, do Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo), este teor não pode ser superior a 25% m/m do produto final (BRASIL, 2007; PORTUGAL, 1992).

Dentre os aditivos que podem ser aplicados na produção de iogurte, destacam-se os edulcorantes, estabilizantes, espessantes, corantes, aromatizantes e conservantes (Dantas et al., 2021). Os edulcorantes podem ser definidos como substâncias que não são açúcares (sacarose), mas que conferem sabor adocicado aos alimentos, não aumentando a quantidade de calorias. A maior parte dos edulcorantes são compostos quimicamente sintetizados, como são adoçantes potentes, são uma escolha econômica devido à pequena quantidade necessária para alcançar o sabor desejado (Souza et al., 2019).

Entre os principais edulcorantes, destaca-se o aspartame (E951), um composto cuja capacidade de adoçar é até 200 vezes maior que a sacarose, a sucralose (E955), um dos adoçantes artificiais mais utilizados e até 600 vezes mais doce que a sacarose, e o ciclamato de sódio (E952), cuja principal característica é sua alta estabilidade a diversas temperaturas, o que permite a sua utilização como um adoçante sem calorias numa variedade de alimentos, como confeitos, bebidas, vegetais e frutas processadas (Silva et

al., 2021a).

Os estabilizantes são substâncias definidas com capacidade de proporcionar uma dispersão uniforme quando misturadas a dois ou mais componentes imiscíveis (Honorato et al., 2013). Este grupo inclui diversos compostos, como carragenato, alginato, goma guar, ágar, metilcelulose, goma arábica e carboximetilcelulose. Essa característica advém do fato de que os estabilizantes são, predominantemente, macromoléculas facilmente dissolvidas em água, o que aumenta a sua viscosidade formando um gel. Embora muitas delas tenham origem vegetal, em alguns casos podem ser derivadas de fontes animais (Pereira et al., 2019).

Os agentes espessantes desempenham um papel crucial ao controlar a umidade e conferir fluxo, estrutura e estabilidade aos produtos alimentícios. São um dos principais ingredientes alimentares que controlam significativamente as propriedades de textura de produtos alimentícios (Pagno et al., 2014). As propriedades reológicas dos espessantes em solução são influenciadas por diversos fatores, como a concentração do composto ativo, carga elétrica, temperatura, dissolução, grau de dispersão, entre outros. Essas características são moldadas pela interação entre as macromoléculas na estrutura da matriz. (Silva et al., 2021).

Os aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias que possuem características aromáticas e/ou sápidas, com a capacidade de atribuir ou intensificar o sabor e/ou aroma dos alimentos. Esses ingredientes podem ser categorizados como naturais (por ex. extratos, óleos essenciais, bálsamos, etc.) e sintéticos. Os aromatizantes sintéticos, por sua vez, são subdivididos em sintéticos artificiais ou sintéticos idênticos aos naturais (Honorato et al., 2013).

Já os corantes são substâncias que conferem, intensificam ou restauram a cor de um alimento. Eles podem ser categorizados em: corante orgânico natural, obtido a partir de fontes vegetais, ocasionalmente animais; corante orgânico sintético, produzido por síntese orgânica; corante artificial; corante orgânico sintético idêntico ao natural, em que a estrutura química se assemelha à do princípio corante isolado de fonte natural; e, corante inorgânico, que advém de substâncias minerais (BRASIL, 2007).

Por fim, temos os conservantes, substâncias que retardam ou previnem as reações envolvendo microrganismos e enzimas responsáveis pela deterioração dos alimentos. No âmbito dos conservantes utilizados na produção de iogurtes, os sorbatos têm grande destaque, cuja principais características são apresentadas a seguir.

2.2.3. Sorbatos

Os sorbatos são ácidos orgânicos amplamente empregues como conservantes, dada à sua solubilidade, baixa toxicidade e capacidade de realçar o sabor (Vincenzi et al., 2021). Estes destacam-se pela sua versatilidade, sendo capazes de inibir o desenvolvimento de uma ampla gama de microrganismos e aplicáveis em diversos produtos alimentícios para manter a sua frescura e sabor (Fani, 2021).

São especialmente eficazes contra fungos filamentosos e leveduras, bem como contra bactérias como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, bactérias psicrotróficas deteriorantes, como *Pseudomonas* spp., e coliformes. Além disso, os sorbatos podem atuar sinergicamente com outros conservantes (Silveira, 2005).

Adicionalmente, os sorbatos têm a capacidade de impedir a atividade de diversos tipos de enzimas microbianas, interferindo em alguns de seus processos vitais, como transporte, crescimento e replicação. Enzimas como isocitrato, malato, α -cetogluturato e aspartase são afetadas pela ação do sorbato (Fani, 2021). Além disso, diversos estudos também indicam que os sorbatos têm a capacidade de inibir a germinação de esporos de fungos. Entre os sorbatos, o ácido sórbico e seus sais, como sorbato de sódio, sorbato de potássio e sorbato de cálcio, destacam-se como principais conservantes na indústria alimentícia (Vincenzi et al., 2021).

O ácido sórbico (E200), um ácido graxo insaturado conhecido como ácido hexa-2,4-dienóico, é naturalmente encontrado em vegetais, mas também pode ser sintetizado quimicamente para ser utilizado como aditivo alimentar. Disponível comercialmente na forma refinada, geralmente como pó ou granulado branco, é especialmente apropriado para alimentos sujeitos a temperaturas em torno de 85°C, dada a sua estabilidade mesmo a temperaturas mais elevadas (Jesus et al., 2021).

O sorbato de potássio (E202), é um sal branco de alta solubilidade solúvel em água e obtido por meio da neutralização do ácido sórbico com hidróxido de potássio. Este composto atua como conservante, inibindo o crescimento de leveduras e fungos em produtos como vinho, queijo, iogurte, carnes secas, sucos de frutas, refrigerantes e produtos assados (Fani, 2021). Além disso, é frequentemente adicionado a suplementos dietéticos à base de ervas para prevenir o crescimento de fungos e bactérias, prolongando assim a vida útil do produto (Barros et al., 2021).

Como aditivo alimentar, o sorbato de potássio é utilizado como conservante em concentrações que variam de 0,025% a 0,100%, o que resulta numa ingestão de 25 mg a

100 mg por 100 g de alimento. Para um adulto médio, com 70 kg, a ingestão diária máxima é de 25mg/kg, ou 1,750 mg ao dia. Além disso, possui cerca de 74% da ação antimicrobiana do ácido sórbico, a pH de 6,5 (Fani, 2021).

O sorbato de sódio (E201) é o sal de sódio do ácido sórbico, caracterizado por ser insípido, inodoro e com solubilidade parcial em água. Sua síntese envolve a reação do ácido sórbico com hidróxido de sódio. Com amplo uso como conservante em bebidas e alimentos, o sorbato de sódio prolonga a vida útil dos produtos ao inibir o crescimento de leveduras e fungos, com eficácia máxima em ambiente com valores de pH de 6,5 (Fani, 2021).

O sorbato de cálcio (E203) é o composto formado pelo cálcio e o ácido sórbico. Trata-se de um sal de ácido graxo poli-insaturado, produzido comercialmente por meio de diversos métodos químicos. É frequentemente empregado em produtos lácteos, desempenhando uma função similar ao ácido sórbico. Além disso, é utilizado na fabricação de revestimentos antifúngicos, devido à sua notável estabilidade frente à oxidação, embora o seu uso seja bastante restrito (Fani, 2021).

2.3. Pólen

Pólen é o nome dado ao conjunto formado por grãos minúsculos originados nas flores de plantas angiospermas e gimnospermas. Estes grãos são o elemento reprodutor masculino gerado nas anteras das flores e desempenham um papel crucial na fertilização, levando à transformação da flor em fruto (Nicolai & Junior, 2012). Apresenta-se na forma de um pó com tonalidades variadas, dependendo da espécie de origem, comumente amarelo ou marrom claro, embora também possam ser encontrados outros tons (Lopes et al., 2022).

Em relação a sua composição, o pólen é formado por aproximadamente 35% proteínas, sendo mais da metade na forma de aminoácidos livres, facilmente assimilados pelo corpo. Além disso, contém cerca de 40% de hidratos de carbono, representados por diversos tipos de açúcares, 5% de gorduras, 3% de minerais e uma quantidade de umidade que varia entre 7 a 10%. Os restantes componentes são elementos minoritários, incluindo ácido nicotínico, pantotênico e fólico, além de cianocobalamina e vitaminas A, C, D e E (Bogdanov, 2001).

Sobre a sua estrutura, o grão de pólen apresenta uma estrutura tri ou bicelular, envolvida por uma camada dupla, que sua composição morfológica quanto química. A

camada externa, conhecida como exina, é composta por esporopolenina, uma substância de alta resistência, que se degrada apenas por oxidação. Essa camada exhibe padrões morfológicos característicos específicos de acordo com a espécie de abelha e/ou grupo de plantas utilizadas na produção do pólen. Por outro lado, a camada interna, chamada intina, é composta principalmente por celulose, que é menos resistente que a exina e possui maior uniformidade de formato (Oliveira et al., 2001).

A exina apresenta os principais elementos morfológicos que permitem a identificação dos grãos de pólen, sendo dividida numa camada externa, conhecida como sexina, que pode ser mais ou menos esculpida, e uma porção interna, chamada nexina, que é relativamente homogênea e sem esculturas (Dettke & Santos, 2011).

Um fator essencial no ciclo reprodutivo das plantas que produzem pólen é a polinização, um processo que envolve a transferência dos grãos de pólen das anteras para os estigmas das flores. Algumas plantas são autógamias, o que significa que são capazes de realizar a polinização de forma independente, dentro de uma mesma flor, como é o caso da cevada, trigo e feijão (Costa et al., 2008). Por outro lado, existem plantas alógamas, nas quais a polinização ocorre entre flores distintas, um fenômeno chamado de polinização cruzada. Nesses casos, é necessária a intervenção de um agente, que pode ser abiótico, como água e vento, ou biótico, envolvendo a participação de animais conhecidos como polinizadores (Rech et al., 2014).

No caso de agentes bióticos, o pólen é transportado de uma flor para outra por animais ao alimentarem-se dos seus grãos. Entre os animais polinizadores, as abelhas melíferas destacam-se como os principais agentes, uma vez que o pólen possui um papel central em sua dieta, crucial para o desenvolvimento das larvas (Barbosa et al., 2017). Embora uma colônia de abelhas adultas possa subsistir por um período prolongado sem pólen, se alimentando exclusivamente de mel ou xarope de açúcar, estas não seriam capazes de criar larvas, já que o pólen é indispensável para esse processo (Costa-Maia et al., 2010).

As abelhas melíferas coletam o pólen das flores e misturam-no com a sua saliva e néctar, formando uma carga que é transportada para a colmeia. Este pólen, conhecido como pólen fermentado, ou “pão de abelha”, é um produto com alto potencial como alimento funcional e aditivo alimentar (Kieliszek et al., 2018).

2.3.1. Pólen fermentado

Após a recolha do pólen nas flores e seu transporte para dentro da colmeia pelas abelhas, estas adicionam mel e enzimas digestivas, processo que tem como objetivo facilitar o armazenamento e a compactação nos favos. De acordo com Vit et al., (2016), essas adições fazem com que o pólen sofra uma série de transformações microbiológicas e bioquímicas, incluindo a multiplicação de bactérias ácido-láticas que induzem a fermentação láctica, resultando no aumento da acidez e na redução do pH. Esta fermentação não apenas aumenta a capacidade de conservação do pólen, mas também o transforma numa substância conhecida como pólen fermentado ou "pão de abelha".

O pólen fermentado é uma das principais fontes de alimento para as abelhas, sendo rico em minerais, proteínas, gorduras e outros compostos essenciais para o crescimento e a produtividade da colônia. Os níveis de lipídios, carboidratos e proteínas que o pólen fermentado possui são indispensáveis na dieta das abelhas, sendo impossível o seu desenvolvimento saudável sem este alimento (Luz et al., 2022).

De acordo com Standifer et al., (1980), o pólen fermentado é uma fonte de proteínas que contém uma variedade de nutrientes essenciais, como aminoácidos fundamentais, vitaminas (C, B1, B2, E, H), enzimas, como a amilase e fosfatase, pigmentos, flavonoides e uma série de minerais, incluindo ferro, cálcio, fósforo, magnésio, entre outros. Embora a composição proteica do pólen natural seja inicialmente mais alta do que a do pólen fermentado, a degradação da estrutura do grão durante o processo de fermentação aumenta a biodisponibilidade das proteínas, compensando essa diferença.

O pólen fermentado possui uma quantidade significativamente maior de ácido láctico, devido ao processo fermentativo, em comparação com o pólen natural, resultando num pH mais baixo e numa acidez mais pronunciada. Essa acidez contribui para a sua autoconservação, inibindo o crescimento de fungos e outros microrganismos, ao contrário do pólen natural, que exige secagem imediata após a coleta para que não se deteriore (Zuluaga et al., 2015).

2.3.2. Principais propriedades do pólen fermentado

As principais propriedades funcionais atribuídas ao pólen fermentado relacionam-se com a sua atividade antibacteriana e antioxidante, ligados principalmente a quantidade de compostos fenólicos que possui. Os compostos fenólicos englobam, principalmente,

flavonas, flavanonas, flavonóis, ácidos fenólicos simples e di-hidroflavonóis, além de outras substâncias derivadas. Estes podem ser categorizadas como metabólitos secundários de grande relevância, com várias capacidades biológicas, incluindo ação antioxidante e antimicrobiana (Silva et al., 2010).

De acordo com Carneiro et al., (2019), o pólen fermentado contém compostos fenólicos, que, por sua vez, estão diretamente ligadas às propriedades antimicrobianas que possui, não apenas contra bactérias, mas também contra leveduras e parasitas. Estes investigadores demonstraram que os extratos de pão de abelha de *M. compressipes manaosensis* inibiram eficientemente *P. aeruginosa*, *M. smegmatis* e *Candida albicans*, além de larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus*, vetor do verme parasita humano *Wuchereria bancrofti*, de maneira dependente da concentração.

Na pesquisa de Pérez-Pérez et al., (2018), foi examinada a atividade em bactérias de extratos etanólicos e metanólicos de pólen fermentado de *Austroplebeia australis*, *Tetragonula carbonaria* e *Tetragonula hockingsi*. Os extratos foram eficazes contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) e gram-negativas (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). A extração usando etanol apresentou melhores resultados em comparação ao metanólico, sendo que a menor concentração inibitória foi registrada para os extratos etanólicos de pólen fermentado de *Tetragonula hockingsi*.

Akhir et al., (2017), em pesquisa, avaliaram a efetividade do extrato etanólico e extrato hexanoico de pólen fermentado de *Heterotrigena itama* na inibição das bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Dentre estas, as bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) foram mais sensíveis aos extratos de pão de abelha, enquanto o extrato etanólico demonstrou atividade antibacteriana superior em comparação com o extrato de hexano.

Já Sulbarán-Mora et al., (2018) investigaram extratos etanólicos de pólen fermentado de *Frieseomelitta*, *Melipona* e *Tetragonisca* spp., cujos resultados evidenciaram que exibiam efeitos antibacterianos contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas não contra *Escherichia coli*. As atividades antibacterianas estavam correlacionadas com o conteúdo fenólico.

Para além da atividade antimicrobiana, os compostos fenólicos também estão entre os antioxidantes naturais mais importantes. Estas substâncias removem os radicais livres, como os ROS, produzidos em excesso, os quais causam danos moleculares no DNA, proteínas e lipídios (Reuter et al., 2011).

Existem múltiplos métodos para avaliar a atividade antioxidante de um extrato nomeadamente, o 2,2-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) considerado o método *in vitro* mais comumente utilizado, devido à sua simplicidade, custo-efetividade e rapidez (Alam et al., 2013). Akhir et al., (2017) avaliaram a atividade antioxidantes do extrato etanólico do pão de abelha de *H. Itama*, usando DPPH e ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). O extrato etanólico mostrou maior atividade de eliminação de radicais DPPH e FRAP (respetivamente, $93,60 \pm 0,03\%$ e $97,95 \pm 0,01\%$) em comparação com o extrato hexanoico, embora ambas tenham evidenciado atividade antioxidante.

Alguns estudos também sugerem a capacidade do extrato de pão de abelha de reduzir a inflamação. Segundo Lopes et al., (2019), extratos etanólicos de pão de abelha de *Melipona fasciculata* e *Scaptotrigona affinis postica* foram administrados num modelo de edema induzido em camundongos em dois estudos separados. As respostas anti-inflamatórias foram independentes do tempo e da dose. Após 5 horas, os tratamentos com pão de abelha foram capazes de reduzir o volume da pata equivalente ao tratamento com indometacina (anti-inflamatório) e ciproheptadina (anti-histamínico). Análises adicionais identificaram o possível mecanismo dos compostos fenólicos para inibir a liberação de histamina e reduzir a síntese de prostaglandinas.

2.4. Fermentação

A fermentação é um processo onde ocorrem reações químicas exotérmicas, enzimáticas e anaeróbicas, que resultam na produção de ATP (adenosina trifosfato), obtido pela quebra de moléculas de glicose. Formam-se também diferentes produtos, dependendo do tipo de processo (Martin & Dea Lindner, 2022). A fermentação é levada a cabo principalmente, por bactérias para gerar energia, não requer oxigênio e ocorre no citoplasma celular, onde cada etapa é facilitada por várias enzimas distintas (Borges, 2008).

A glicólise é um processo de degradação da glicose ($C_6H_{12}O_6$) anaeróbico que culmina na produção de ATP e ácido pirúvico. Durante esse processo, a glicose é degradada, produzindo duas moléculas de ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$). O NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) atua como agente oxidante, convertendo-se em NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) ao capturar hidrogênios livres. O balanço energético resulta em duas moléculas de ATP necessárias para iniciar a glicólise, ao passo que a produção de cada ácido pirúvico resulta na formação de 2 ATPs (Thieman

& Palladino, 2010).

Portanto, na glicólise, o ácido pirúvico atua como aceitador de elétrons do NADH, possibilitando a regeneração do NAD, que pode então ser reutilizado na degradação da glicose, resultando na formação de 2 ATPs. Os produtos finais da fermentação variam de acordo com a molécula orgânica que surge a partir do ácido pirúvico (Martin & Dea Lindner, 2022). Na próxima secção iremos fazer uma descrição sumária de vários tipos de fermentação: láctica, porque é a responsável pela produção do iogurte; alcoólica, porque na fermentação do pólen iremos utilizar *Saccharomyces cerevisiae*, e acética, uma vez que, se a fermentação alcoólica não decorrer de forma adequada pode formar-se ácido acético.

2.4.1. Tipos de fermentação

Existem diferentes tipos de fermentação, sendo a única diferença a molécula orgânica que age como aceitador de elétrons durante a redução do ácido pirúvico. Os três principais tipos de fermentação são a fermentação láctica, fermentação alcoólica e fermentação acética.

A fermentação alcoólica é conduzida por bactérias, leveduras e tecidos vegetais no citoplasma, e resulta na produção de etanol, a partir da quebra de glicose, além da liberação de gás carbônico para o ambiente (Figura 3). A sua importância na indústria é notável devido à capacidade de transformar o etanol numa variedade de produtos, incluindo bebidas alcoólicas, combustíveis, produtos de panificação e de limpeza (Pereira et al., 2020c).

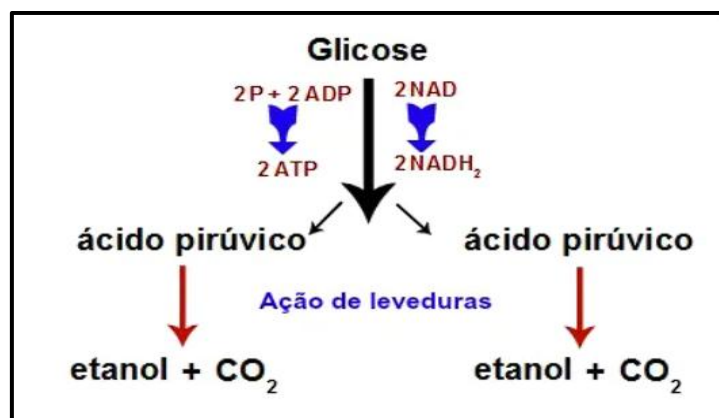


Figura 3 – Fermentação alcoólica.
Fonte: Lopes (2024).

A natureza da matéria-prima utilizada na fermentação influencia diretamente as características das bebidas resultantes, isto porque, diferentes fontes de carboidratos originam bebidas com teores alcoólicos distintos, como vinho (10 a 15%) e cerveja (3 a 5%). As leveduras mais comumente utilizadas para a fermentação alcoólica são as *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces uvarum* (Tomasi et al., 2023).

A fermentação láctica ocorre no citoplasma por meio de bactérias, leveduras e tecidos animais, cujo resultado é a conversão de glicose em ácido láctico (Figura 4). Este processo é amplamente utilizado na indústria para a produção de diversos derivados lácteos, como leite fermentado, queijo, requeijão, além de produtos cárneos, como linguiças, salames, peixes fermentados, e produtos enlatados fermentados. As bactérias ácido-láticas são os microrganismos mais frequentemente usados nesse tipo de fermentação, como *Staphylococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Pediococcus spp* e *Micrococcus spp* (Sagrillo et al., 2015).

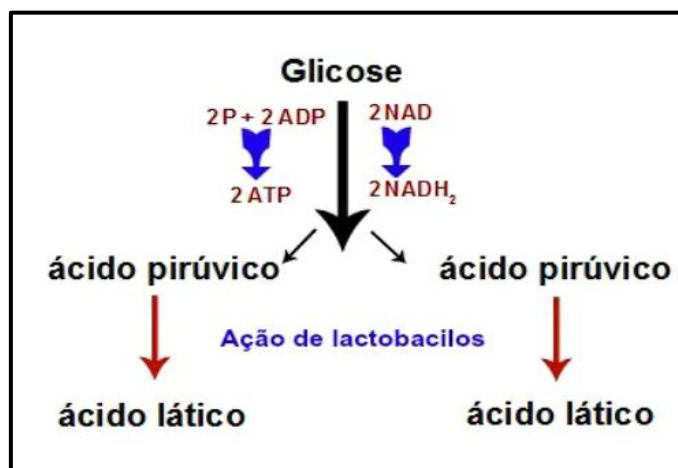


Figura 4 – Fermentação láctica
Fonte: Lopes (2024).

O ácido láctico gerado durante a fermentação láctica é responsável por alterações positivas nos alimentos, como na fermentação do leite, que resulta na produção de diversos produtos como queijo, coalhada e iogurte, os quais possuem uma vida útil prolongada em comparação com o leite fresco, em decorrência do aumento da acidez e da redução do pH provocados pelo ácido láctico, dificultando assim o crescimento de microrganismos prejudiciais à saúde humana ou à deterioração do produto (Leroy & De Vuyst, 2004).

Por fim, a fermentação acética envolve a oxidação parcial do álcool etílico, resultando na produção de ácido acético. Esse método é utilizado na produção de ácido

acético industrial e vinagre comum, além de ocorrer naturalmente na deterioração de bebidas alcoólicas e em alguns alimentos. Bactérias conhecidas como acetobactérias, *Acetobacter aceti*, são responsáveis por este processo, realizando a conversão de uma molécula de oxigênio e uma de álcool, numa molécula de ácido acético e numa de água (Sagrillo et al., 2015).

Na fermentação acética industrial, existem dois processos bioquímicos distintos. Primeiramente, realiza-se a fermentação alcoólica, um processo anaeróbico conduzido por certas leveduras que produzem álcool etílico e dióxido de carbono. Em seguida, o álcool etílico obtido é parcialmente oxidado (processo aeróbico) pelas acetobactérias (Marques et al., 2010).

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra

A amostra de pólen utilizada neste trabalho foi adquirida em março de 2024 à empresa Agrupamento de Produtores de Mel do Parque, Lda, no distrito de Bragança, localizada no Norte de Portugal.

3.2. Tratamento da amostra

A amostra foi triturada em moinho Ika Tube Mill para análises posteriores.

3.3. Fermentação do pólen

3.3.1. Otimização das condições de fermentação

Para otimizar as condições de fermentação do pólen utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi utilizado um desenho experimental Plackett-Burman, gerado por meio do software R.

No total, foram realizados 19 ensaios distintos, variando os parâmetros descritos na Tabela 1. Os fatores analisados incluíram a quantidade de amostra (2,5, 5,0 e 7,5 g), o pH inicial do meio de cultura (3,50, 4,00 e 4,50), além da concentração inicial do inóculo de levedura (10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/mL).

Tabela 1 – Desenho experimental para a otimização das condições de fermentação do pólen.

Ensaio	Inóculo (UFC/mL)	pH	Amostra (g)
1	10 ⁴	3,5	2,5
2	10 ⁴	4,5	7,5
3	10 ⁶	4,5	7,5
4	10 ⁶	4,5	2,5
5	10 ⁶	3,5	2,5
6	10 ⁵	4,0	5,0
7	10 ⁴	4,5	2,5
8	10 ⁵	4,0	5,0
9	10 ⁶	3,5	7,5
10	10 ⁴	3,5	7,5
11	10 ⁵	4,0	5,0
12	10 ⁵	4,0	0,5
13	10 ⁶	4,0	5,0
14	10 ⁵	4,0	9,5
15	10 ⁵	4,9	5,0
16	10 ⁵	4,0	5,0
17	10 ⁵	4,0	5,0
18	10 ⁵	3,09	5,0
19	10 ⁵	4,0	5,0

Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL. O meio de cultura utilizado foi uma solução salina a 0,85%. Após a pesagem do cloreto de sódio (NaCl) e preparação da solução, foram adicionados aos erlenmeyers 100 mL de solução salina, e o

pH inicial do meio foi ajustado para o valor desejado com o auxílio de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e ácido clorídrico (HCl) 1N. Em seguida, o volume das soluções foi ajustado para 100 mL com solução salina, e os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Após o processo de autoclavagem, os frascos contendo os meios de cultura foram deixados esfriar à temperatura ambiente, posteriormente após adição das amostras previamente trituradas, pasteurizou-se por 15 minutos a 70°C em banho-maria e pesou-se. A incubação foi conduzida numa incubadora orbital (Incubated Shaker SIF6000R) à temperatura de 25°C. As fermentações foram monitoradas diariamente por meio da medição da variação de peso dos frascos e da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Os 19 ensaios realizados na fermentação do pólen estão ilustrados na Figura 5.



Figura 5 – Ensaio da fermentação do pólen.
Fonte: A autora (2024)

3.4. Preparação dos extratos

Realizou-se a extração das amostras de pólen *in natura*, de pólen fermentado e dos iogurtes.

Para a preparação do extrato do pólen fermentado, foi selecionada a melhor fermentação, obtida a partir do desenho experimental descrito no item 3.3.1. Já para as amostras de iogurte, realizou-se nos tempos inicial (0) e final (28). Para ambas as extrações, as amostras foram liofilizadas.

Para extração do pólen *in natura*, pesou-se 100 g de amostra e dissolveu-se em 500 mL de etanol 80% (v/v). Para extrair o pólen fermentado e os iogurtes, foram pesadas 10,55 g e 4 g, respectivamente, de ambas amostras liofilizadas e dissolveram-se em 50 mL de etanol 80% (v/v).

Em seguida, deixou-se em agitação overnight e filtrou-se utilizando o papel de filtro (Whatman nº 4), como se pode observar na Figura 6. Posteriormente, utilizou-se um evaporador rotativo para evaporar o solvente a uma temperatura de 40°C e uma velocidade de agitação de 296 rpm. Os erlenmeyers contendo cada extrato foram colocados na estufa e pesados sucessivamente até atingir peso constante, obtendo-se assim o extrato de pólen fermentado, de pólen *in natura* e de iogurte.



Figura 6 – Extração do pólen após a fermentação.
Fonte: A autora (2024)

3.5. Produção dos iogurtes

A produção e análise dos iogurtes foram conduzidas na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, em Portugal, seguindo a metodologia descrita por Freitas et al., (2024). O iogurte preparado foi dividido em três subamostras: (IC) Iogurte Controlo, contendo sorbato de potássio a 0,03%; e (IPF) Iogurte com Pólen Fermentado, com duas concentrações de extrato de pólen fermentado, a 0,25% e 0,5%. Para isso, foi preparado 1 kg de iogurte, o qual foi subdividido em porções de 100 g para cada subamostra. O iogurte, do tipo “batido”, foi elaborado com leite integral UHT (Ultra High Temperature) com adição de 120 g de iogurte natural por litro de leite.

O processo iniciou-se com a fervura de 1.000 mL de leite integral UHT, ao qual foram adicionados leite em pó (1,0%, m/v) e açúcar cristal (7,5%, m/v), conforme ilustrado na Figura 7. Após atingir a ebulição, a mistura foi resfriada em banho de gelo até aproximadamente 42 ± 2 °C, momento em que foi adicionada a cultura de iogurte natural. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro hermeticamente

fechados com capacidade de 2.000 mL, e colocadas em banho-maria a 42 ± 2 °C, durante 8 horas.

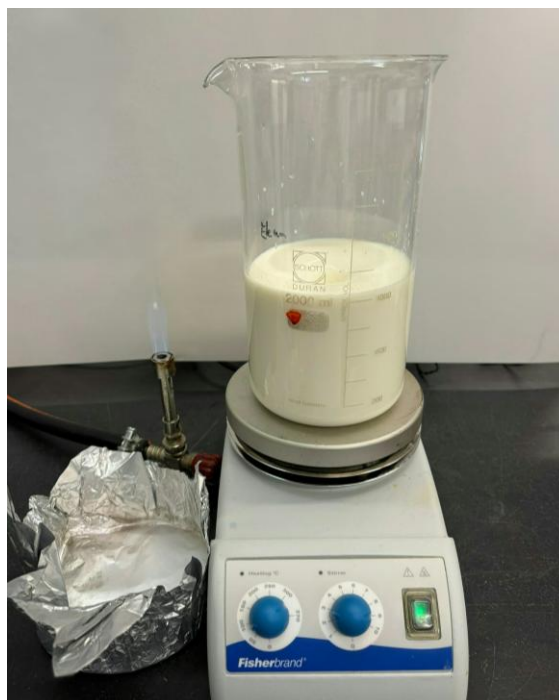


Figura 7 – Ebulição do leite para produção do iogurte.
Fonte: A autora (2024)

Posteriormente, as amostras foram refrigeradas a 4 ± 2 °C por 48 horas. Após este período, foi quebrada a coalhada e, no iogurte controlo (IC), foram adicionados sorbato de potássio (0,03% m/v) e essência de baunilha. Para as amostras contendo pólen fermentado (IPF), o extrato fermentado foi dissolvido em aguardente 78% (v/v) e incorporado nas concentrações de 0,25% e 0,5% (m/v), juntamente com essência de baunilha, como mostra a Figura 8. As amostras foram preparadas e armazenadas sob refrigeração a 4 ± 2 °C.

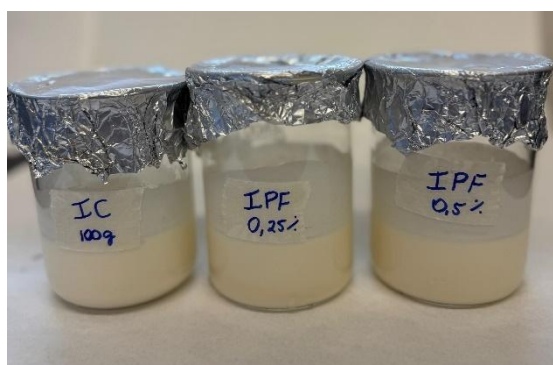


Figura 8 – Iogurte controlo com 0,03% de sorbato de potássio; iogurte com 0,25% e 0,5% de extrato de pólen fermentado, respetivamente.

Fonte: A autora (2024)

O fluxograma do processo de produção dos iogurtes está representado na Figura 9.

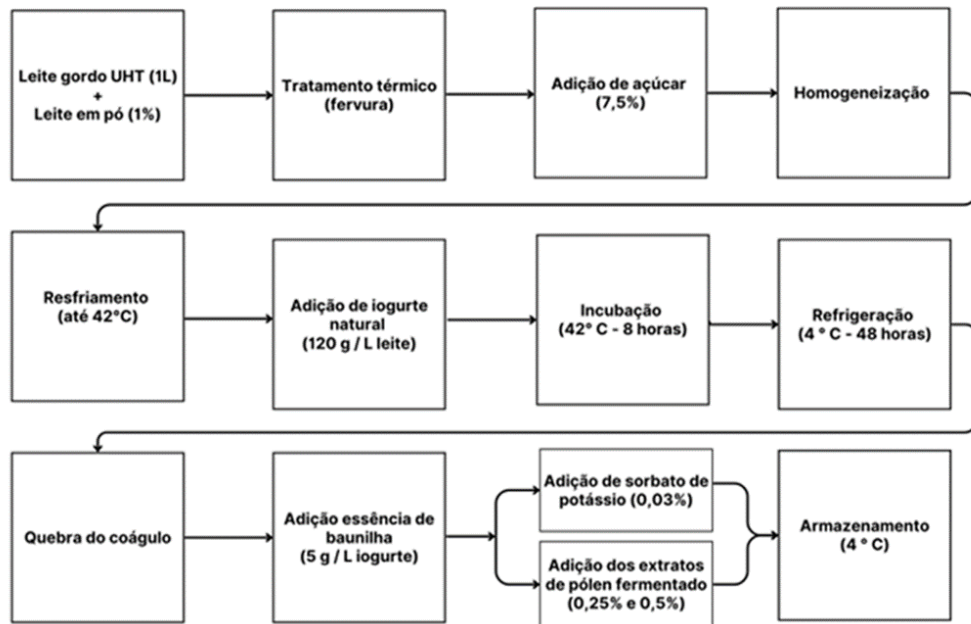


Figura 9 – Fluxograma de produção dos iogurtes.
Fonte: A autora (2024)

3.6. Análises microbiológicas

3.6.1. Contagem de bolores e leveduras

A quantificação de bolores e leveduras foi realizada conforme a técnica de contagem em placa reportada na ISO 21527-2:2008. Foram inoculados 0,1 mL de cada uma das diluições decimais da amostra em placas de Petri contendo meio de cultura Agar DRBC (Rosa Bengala). As placas foram incubadas a 25°C durante 48h para contagem das leveduras e 5 dias para a contagem de bolores. Realizou-se as seguintes diluições decimais para o pólen *in natura* 10⁻³ a 10⁻⁵, para o pólen fermentado 10⁻³ a 10⁻⁷ e para o iogurte 10⁻¹ a 10⁻⁶. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por g de amostra (UFC/g), utilizando a seguinte expressão:

$$\text{UFC/g} = \frac{\Sigma c}{V \times (n1 + 0,1 * n2) \times d}$$

Σc - soma das colônias em todas as placas contadas;

V- volume de inóculo semeado em cada placa;

- n1- número de placas da primeira diluição contada;
- n2 - número de placas da segunda diluição contada;
- d - diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens.

3.6.2. Pesquisa e contagem de Coliformes totais e *Escherichia coli*

Para a pesquisa e contagem de coliformes totais e *E. coli* utilizou-se o kit Simplate desenvolvido pela empresa Bio Control e aprovado pelo método AOAC 2005.03.

O meio desidratado foi hidratado com 100 mL de água destilada estéril. Posteriormente, para um tubo de ensaio estéril, pipetou-se 9 mL do meio hidratado e 1 mL das diluições decimais da amostra. Realizou-se as seguintes diluições decimais para o pólen fermentado 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e para o iogurte 10^{-1} e 10^{-2} . O preparado líquido, foi vertido para a placa simplate e com movimentos circulares preencheram-se os 84 poços, vertendo o excesso de líquido na esponja. As placas foram incubadas a 37°C no período de 24h a 48h.

Após incubação, a contagem de coliformes totais foi efetuada contando cada poço com alteração da cor inicial do meio de cultura. Relativamente à quantificação de *E. coli*, a placa simplate foi submetida a uma lâmpada de UV a 365 nm contando os poços com fluorescência. A quantificação de coliformes totais e *E. coli* foi efetuada recorrendo à tabela de conversão fornecida pelo fabricante. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.6.3. Pesquisa e contagem de esporos de clostrídios sulfito redutores

A pesquisa e quantificação de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi realizada de acordo com a ISO 15213:2003 pelo método de incorporação. Adicionou-se 1 mL das diluições decimais (10^{-1} e 10^{-2}) da amostra em tubos de ensaio estéreis. Em seguida, aqueceu-se em banho-maria a 80°C por 10 minutos. Após resfriamento, verteu-se o meio de cultura seletivo e diferencial, Iron Sulphite Agar, sobre a amostra. Os tubos foram incubados a 37°C durante 5 dias.

3.6.4. Contagem de *Bacillus cereus*

A quantificação de *Bacillus cereus* foi efetuada através da técnica de contagem em placa segundo a ISO 7932:2004, pelo espalhamento contendo meio Ágar Seletivo

Mossel, para *B. cereus* com 0,1 mL de cada diluição decimal (10^{-1} e 10^{-2}). As placas foram incubadas a 30°C no período de 24h a 48h. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.6.5. Contagem total de aeróbios mesófilos

A contagem total de bactérias aeróbios mesófilos foi efetuada segundo a Norma Portuguesa (NP) 4405:2002, utilizando o método de contagem em placa por incorporação do inóculo. O meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (PCA). Após inoculação de 1mL de cada diluição da amostra em placas adicionou-se o meio, deixou-se solidificar, e incubou-se a 30°C por um período de 48h a 72h. Em seguida, efetuou-se a contagem das colônias. Realizou-se as seguintes diluições decimais: pólen *in natura* 10^{-4} a 10^{-8} , para o pólen fermentado 10^{-3} a 10^{-6} e para o iogurte 10^{-4} a 10^{-7} . Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.6.6. Pesquisa e contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva

A pesquisa e quantificação de *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva foi realizada segundo a NP 4400-1:2002. As placas contendo o meio de cultura Baird-Parker (BP) enriquecido com gema de ovo foram inoculadas com 0,1 mL de cada diluição decimal. Em seguida incubou-se a 37°C no período de 24h a 48h. Realizou-se as seguintes diluições decimais: pólen *in natura* 10^{-4} a 10^{-8} , pólen fermentado e para o iogurte 10^{-1} e 10^{-2} , respetivamente. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.6.7. Contagem de bactérias lácticas

A quantificação de bactérias lácticas foi realizada conforme descrito por Ferreira et al., (2019), utilizando o método de imersão da amostra em dupla camada de Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe), com incubação a 30°C por 72 horas. Para cada diluição decimal (10^{-4} a 10^{-7}), pipetou-se 1 mL em placas de Petri esterilizadas. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 10 mL do meio MRS, e as placas foram agitadas com movimentos circulares para favorecer a homogeneização.

Após a solidificação da primeira camada, adicionou-se uma segunda camada de meio MRS. Uma vez solidificado o meio, as placas de Petri foram vedadas com parafilme

e incubadas em posição invertida para garantir condições de anaerobiose.

A análise de todos os parâmetros referidos anteriormente foi efetuada em triplicado.

3.7. Análises químicas

3.7.1. Preparação para soluções

Para a preparação das soluções, pesou-se 0,1 g de cada amostra dos extratos de pólen *in natura*, de pólen fermentado e dos iogurtes que foram dissolvidos em um balão volumétrico de 20 mL contendo etanol a 80%. Para cada solução, retirou-se 1 mL para um balão de 25 mL e aferiu-se com água desionizada. A partir destas soluções realizou-se as análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (DPPH).

3.7.1.1. Determinação dos fenóis totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais (TPC) foi efetuada segundo os estudos realizados por Ahmad (2023). Adicionou-se 20 µL da solução da amostra (referida no item 3.7.1) e 100 µL de solução de Folin–Ciocalteu (1:4), em placas de 96 poços, a mistura foi deixada em repouso por 4 minutos, protegida da luz e à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 75 µL de uma solução de carbonato de sódio (100g/L), as placas mantiveram-se em agitação por um minuto e posteriormente incubou-se durante 2 horas.

A absorbância foi medida usando um leitor de microplaca de 96 poços (Thermo Scientific™ Multiskan GO), a um comprimento de onda de 750 nm. Para efetuar a curva padrão, utilizou-se ácido gálico preparado em várias concentrações entre 20–250 mg/L, resultando na seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,005x - 0,002$. Os resultados expressaram-se em mg equivalentes de ácido gálico por g de extrato.

3.7.1.2. Determinação de flavonoides totais

Para determinação dos flavonoides totais utilizou-se o método descrito por Sembriring et al. (2018). Adicionou-se 50 µl da solução de amostra (referida no item 3.7.1) em microplacas de 96 poços, seguida pela adição de 10 µl da solução de cloreto de

alumínio a 10% (diluída em etanol 80%) e 150 µl de etanol a 96%. Posteriormente, adicionou-se 10 µl da solução de acetato de sódio (1M) (diluído em água). Para a leitura do branco, a solução da amostra foi substituída por 50 µL de água. Manteve-se a mistura em repouso por 40 minutos, protegida da luz e à temperatura ambiente.

A absorbância foi medida usando um leitor de microplaca de 96 poços a um comprimento de onda de 415 nm. Para a construção da curva padrão, utilizou-se quercetina preparada em várias concentrações entre 1–50 mg/L, resultando na seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,010x + 0,046$. O teor total de flavonoides foi expresso como mg de equivalentes de quercetina (QE) por g de extrato.

3.7.1.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada por meio do ensaio de DPPH em microplacas de 96 poços, conforme descrito por Santa Bárbara et al., (2020). Adicionou-se 20 µL da solução da amostra (referida no item 3.7.1) a 180 µL de solução de DPPH (150 µmol/L), agitando por 60 segundos. Em seguida, manteve-se a mistura em repouso por 40 minutos, protegida da luz e à temperatura ambiente.

A absorbância foi medida usando um leitor de microplaca de 96 poços a um comprimento de onda de 515 nm. Para a leitura do branco utilizou-se 20 µL de etanol a 80% (v/v) e para a leitura do controle, 20 µL a etanol 80% (v/v) adicionados a 180 µL da solução de DPPH.

Calculou-se a concentração do DPPH através do seu efeito bloqueador, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ DPPH} = \left(\frac{(A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}})}{A_{\text{Controle}}} \times 100 \right)$$

- % DPPH = Percentual de atividade antioxidante.
- A_{Amostra} = Absorbância da solução com a amostra e o radical livre DPPH.
- A_{Controle} = Absorbância da solução de etanol com o radical livre DPPH.

Para a calibração da curva padrão, utilizou-se Trolox como padrão nas concentrações 25-151 mg/L, resultando na seguinte equação de regressão linear: $Y = 5,83x + 4,24$. Os resultados foram expressos em mg eq trolox/g de extrato.

3.8. Análises físico-químicas

3.8.1. Análises físico-químicas ao fermentado

3.8.1.1. Determinação dos açúcares redutores pelo método DNS

Para a determinação dos açúcares redutores no pólen fermentado, foram coletadas amostras diariamente durante o período de fermentação, desde o tempo zero até o final (72 horas). Inicialmente, preparou-se uma solução com 1 mL de amostra em balão volumétrico de 25 mL para os tempos 0 e 24 h e uma solução com 2 mL de amostra em balão de 25 mL para os tempos 48 e 72 h. Para cada amostra, pipetou-se 0,5 mL da solução de pólen fermentado em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 0,5 mL da solução contendo o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Em seguida agitou-se e os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 5 mL de água destilada à solução e a absorvância foi medida em um espectrofotômetro a 540 nm, utilizando como referência o branco. Para o branco, substituiu-se a amostra por 0,5 mL de água destilada, seguindo o mesmo procedimento com o reagente DNS.

Para a curva padrão, utilizou-se glicose, resultando na seguinte equação de regressão linear: $y = 0,5129x - 0,019$. O teor de açúcares redutores foi expresso em g/L.

3.8.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O sistema de HPLC utilizado foi composto por uma bomba Varian ProStar modelo 220 (Varian, Inc.) operando com um fluxo de 0,6 mL/min, um injetor manual Rheodyne 7725i com loop de 20 µL, um forno de colunas 7981 Jones Chromatography, um detector de ultravioleta Varian modelo 9050, conectado em série a um detector de índice de refração (RI) Varian modelo RI-4, e uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm × 7,8 mm), mantida a 30,3 °C. A eluição foi realizada sob condições isocráticas, utilizando como fase móvel uma solução aquosa de ácido sulfúrico a 0,004 mol/L. A aquisição de dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas por meio do software Star Chromatography Workstation (versão 6.4, Varian Inc.).

A detecção dos açúcares foi realizada pelo detector RI. Os picos cromatográficos dos produtos da fermentação foram identificados por comparação aos tempos de retenção dos compostos puros. A quantificação dos picos foi realizada por calibração com padrões

externos, utilizando a área dos picos como critério. O desempenho do sistema HPLC foi avaliado com base no intervalo dinâmico, nos parâmetros da reta de calibração e nos limites de detecção e quantificação calculados.

Para a calibração e avaliação do desempenho do HPLC, foi preparada inicialmente uma solução padrão contendo glicose, sacarose e frutose a diferentes concentrações, com o objetivo de construir uma curva padrão. Todos os padrões foram previamente filtrados utilizando um filtro de nylon de 0,2 μm (Whatman). As concentrações dos padrões variaram entre 0,20 e 10 g/L, sendo as quantidades de cada composto dissolvidas em água desionizada e analisadas numa única corrida.

A curva de calibração foi construída com os padrões das concentrações de cada composto de interesse, injetados nas mesmas condições das amostras do fermentado. A quantificação foi realizada pela integração da área dos picos, comparando-os com a curva de calibração, assegurando que as áreas das amostras permanecessem dentro do intervalo linear estabelecido.

A Tabela 2 exhibe os dados obtidos na calibração da análise dos três compostos (sacarose, glicose e frutose) por HPLC.

A análise da regressão linear entre as áreas dos picos e as respectivas concentrações revelou coeficientes de correlação próximos de 1 para todos os compostos, indicando uma boa linearidade. Essa relação pode ser visualizada na Figura 10, que apresenta as retas de calibração dos compostos analisados. Os declives variaram entre os compostos, refletindo diferenças na sensibilidade do detector RI a cada substância. O maior declive foi observado para a glicose, seguida pela frutose e pela sacarose, sugerindo que o detector é mais sensível a esses compostos.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são fundamentais para a validação dos métodos analíticos, pois determinam as concentrações mínimas nas quais o analito pode ser detectado e quantificado com confiança. Em geral, valores menores de LD e LQ indicam maior sensibilidade do método. Como os coeficientes de correlação demonstraram boa linearidade (Figura 10), os limites calculados com os parâmetros da regressão linear são considerados confiáveis. A sacarose apresentou os menores valores de LD e LQ (0,110 g/L e 0,334 g/L, respetivamente), indicando maior sensibilidade do método para esse composto. Já a glicose apresentou LD mais elevado (0,203 g/L) e o maior LQ (0,615 g/L), indicando que sua detecção requer concentrações mais altas.

Tabela 2 – Dados da calibração do HPLC para a análise de sacarose, glucose e frutose.

Composto	Concentração g/L			Parâmetros de Calibração			
	Min	Máx	Declive	Ord. Origem	Correlação	LD g/L	LQ g/L
Sacarose	0,20	10,08	1275071,69	112115,10	0,999	0,11	0,33
Frutose	0,41	8,11	1618148,53	41442,03	0,999	0,15	0,45
Glucose	0,40	10,02	1838064,68	-185334,20	0,999	0,20	0,62

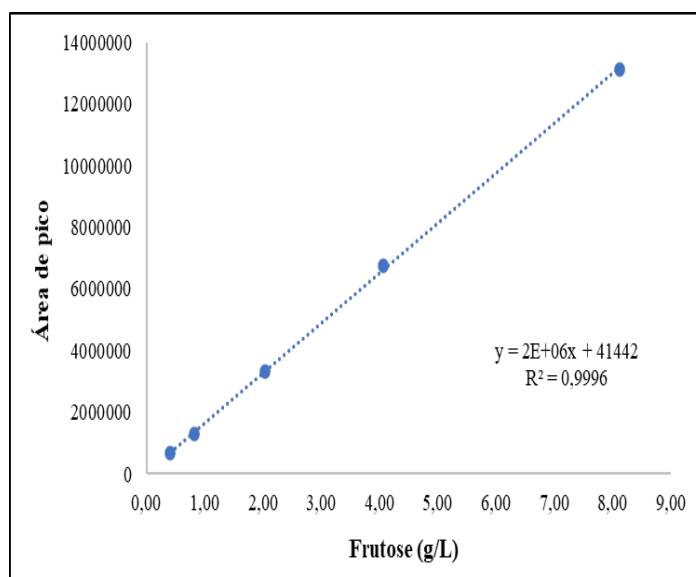
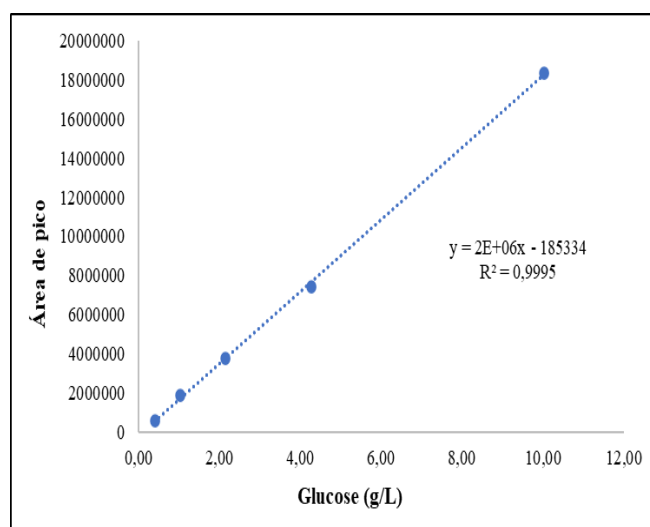
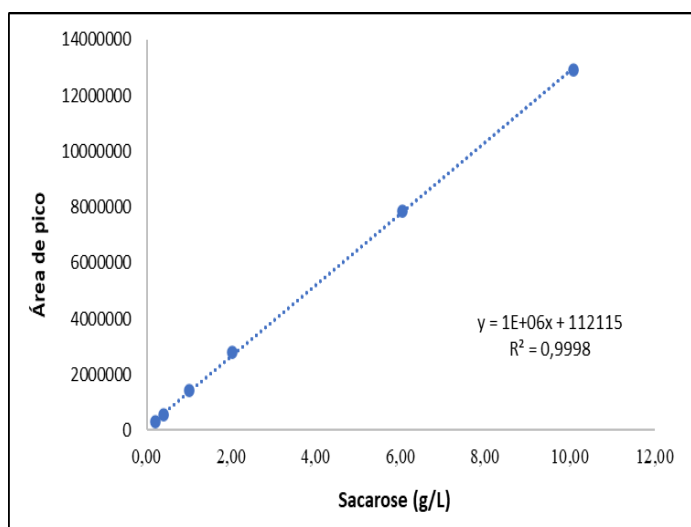


Figura 10 – Retas de calibração obtidas para os compostos de fermentação analisados por HPLC: sacarose, glucose e frutose.

Fonte: A autora (2024)

3.8.2. Análises físico-químicas ao iogurte

Os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras de iogurte foram: cinzas, humidade, gordura, proteína, pH e hidratos de carbono.

3.8.2.1. Determinação do teor de proteína

A determinação do teor de proteína foi realizada através do método Kjeldal AOAC 991.20 para quantificação de nitrogênio presente nas amostras. Pesou-se cerca de 5 g da amostra de iogurte e transferidos para tubos de digestão. Em seguida, adicionou-se 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (97%), 5 mL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio, 33%) e 2 pastilhas do catalisador de Kjeldahl ((9% em CuSO₄ × 5H₂O).

Realizou-se a análise com aquecimento em bloco digestor, até que as amostras apresentassem forma límpidas e transparentes e tonalidade azul-esverdeada, indicando a oxidação de todo o hidrogênio e carbono com formação de gás carbônico e água. No final da digestão, as amostras foram colocadas no tubo de destilação e posteriormente realizou-se a titulação com HCl 0,1 N até a viragem do indicador, anotando o volume do ácido gasto para realizar os cálculos posteriormente. Os resultados foram obtidos em % de proteína, utilizando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de f = 6,38.

Para determinar a % de proteína presente nas amostras de iogurte, utilizou-se o cálculo da percentagem de nitrogênio livre nas amostras, calculada pela equação:

$$\% \text{ nitrogênio} = \frac{v \times [HCl] \times 0,014}{m} \times 100$$

Após quantificar a % de nitrogênio, realizou-se o cálculo da % de proteína, através da seguinte equação:

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ nitrogênio} \times 6,38$$

- v – volume de HCl gasto na titulação.
- m – massa de amostra pesada.

3.8.2.2. Determinação do teor de gordura

Para a determinação dos lipídios totais, as amostras foram previamente liofilizadas para garantir a remoção completa da água. Utilizou-se como método a extração contínua com solvente num aparelho de Soxhlet (gravimétrico). Inicialmente, os balões foram aquecidos em estufa a 105 °C por 1 hora e, em seguida, transferidos para um exsiccador para arrefecer até atingirem a temperatura ambiente, posteriormente os balões foram pesados.

A análise foi realizada utilizando aproximadamente 3 g das amostras, colocadas em cartuchos apropriados. Adicionou-se éter de petróleo como solvente em quantidade suficiente para garantir uma boa extração do analito. O sistema foi aquecido a temperatura branda (cerca de 50 °C), permitindo o refluxo e a extração durante aproximadamente 6 horas.

Após a extração, os balões foram novamente colocados na estufa a 105 °C para evaporação completa do solvente. Por fim, os balões foram transferidos para um exsiccador até arrefecerem e pesaram-se (peso final do balão contendo amostra). A percentagem de gordura foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Teor de gordura} = \frac{\text{massa final do balão} - \text{massa inicial do balão}}{\text{massa amostra}} \times 100$$

3.8.2.3. Determinação do teor de humidade

A determinação do teor de humidade foi realizada através de secagem em estufa a 105 °C. Iniciou-se a análise com o aquecimento dos cadinhos durante uma hora em estufa a 105 °C. Seguidamente, os cadinhos foram arrefecidos num exsiccador à temperatura ambiente e pesados.

Posteriormente, pesou-se aproximadamente 2 gramas de amostra (massa inicial), nos cadinhos devidamente identificados e levou-se a estufa por 3 horas para secagem. Por fim, após arrefecerem em um exsiccador, os cadinhos foram pesados regularmente até atingir peso constante (massa final). Os resultados expressaram-se em % de humidade com base na seguinte equação:

$$\% \text{ humidade} = \frac{m_i - m_f}{m_i - m_c} \times 100$$

- m_i – massa inicial do cadinho com a amostra (g);

- mf – massa do cadinho com a amostra após secagem (g);
- mc – massa do cadinho vazio (g).

3.8.2.4. Determinação do teor em cinzas

O teor em cinzas foi determinado por incineração. Inicialmente, colocou-se os cadinhos vazios numa estufa a 105 °C durante 1 h, após este período os cadinhos foram colocados num exsiccador e arrefecidos a temperatura ambiente e pesados.

Posteriormente, pesou-se aproximadamente 2 g de cada amostra para os cadinhos devidamente identificados. Os cadinhos foram colocados na mufla e incinerados a 550 °C durante 12 h. Após esse tempo os cadinhos foram colocados no exsiccador e arrefecidos até a temperatura ambiente e pesados. Os resultados expressaram-se em % de cinzas com base na equação a seguir:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{mf - mc}{mi - mc} \times 100$$

- mi – massa inicial do cadinho com a amostra (g);
- mf – massa do cadinho com a amostra após secagem (g);
- mc – massa do cadinho vazio (g).

3.8.2.5. Determinação do pH e acidez titulável

O pH das amostras de iogurtes foi determinado utilizando um potenciômetro, o qual foi mergulhado diretamente nas amostras, avaliando assim o seu potencial hidrogeniônico.

Pesou-se cerca de 10 g da amostra e dissolveu-se em 10 mL de água destilada. Após homogeneização, adicionou-se 5 gotas da solução de fenolftaleína, realizando a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido láctico, através da equação descrita por Rahman et al., (2024):

$$\% \text{ ácido láctico} = \left(\frac{\text{Volume NaOH (mL)} \times \text{Normalidade do NaOH} \times 90,08}{\text{Peso amostra (g)} \times 1000} \right) \times 100$$

- 90,08 = fator de conversão para ácido láctico;

3.8.2.6. Determinação do teor em hidratos de carbono e valor energético

O teor em hidratos de carbono foi calculado pela diferença dos componentes humidade, cinzas, gordura e proteína, utilizando a seguinte expressão:

- Hidratos de carbono (%) = $100 - (\text{humidade} + \text{cinzas} + \text{proteína} + \text{gordura})$

O valor energético foi calculado segundo o descrito pelo Regulamento (UE) no 1169 (2011) usando a seguinte expressão:

- Valor energético (Kcal) = $4 \times (\text{proteína} + \text{hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{gordura})$.

3.9. Análise Sensorial

A análise sensorial das amostras de iogurte foi realizada no Instituto Politécnico de Bragança (IPB), com a participação voluntária de provadores não treinados, com idades entre 18 e 60 anos.

O método de investigação utilizado foi o de aceitabilidade.

As amostras foram apresentadas aos provadores de forma aleatória, à temperatura ambiente, utilizando copos descartáveis identificados com códigos de três dígitos gerados aleatoriamente. A análise procedeu-se de forma individual. Para neutralizar o sabor residual entre as amostras, foi oferecido um copo de água mineral (Silva, 2019).

A ficha de avaliação contém uma escala para avaliar a preferência de cinco parâmetros de análise sensorial: cor, aroma, sabor, textura e impressão global. Para cada um, os provadores atribuíram uma nota de 1 a 5, correspondendo às seguintes opções de avaliação:

1. Desgostei muito
2. Desgostei moderadamente
3. Nem gostei, nem desgostei
4. Gostei moderadamente
5. Gostei muito

Os códigos utilizados para cada amostra foram: 394 para o iogurte convencional (0,03% sorbato de potássio), 827 para o iogurte com 0,25% de extrato de pólen fermentado e 561 para o iogurte com 0,5% de extrato de pólen fermentado.

3.10. Análise Estatística

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas do iogurte, nas análises químicas dos extratos e na análise sensorial foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey (5% de significância) utilizando o software R-Studio, a fim de comparar diferenças significativas entre as amostras.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das condições de fermentação

Para otimizar as condições de fermentação, nos 19 ensaios experimentais, foram monitorizadas a variação do peso dos frascos, as contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e a taxa de crescimento de cada ensaio. Estes parâmetros permitiram avaliar a multiplicação das leveduras e a conversão dos substratos ao longo do processo fermentativo. Na Figura 11 estão sumariados os resultados obtidos nos vários ensaios.

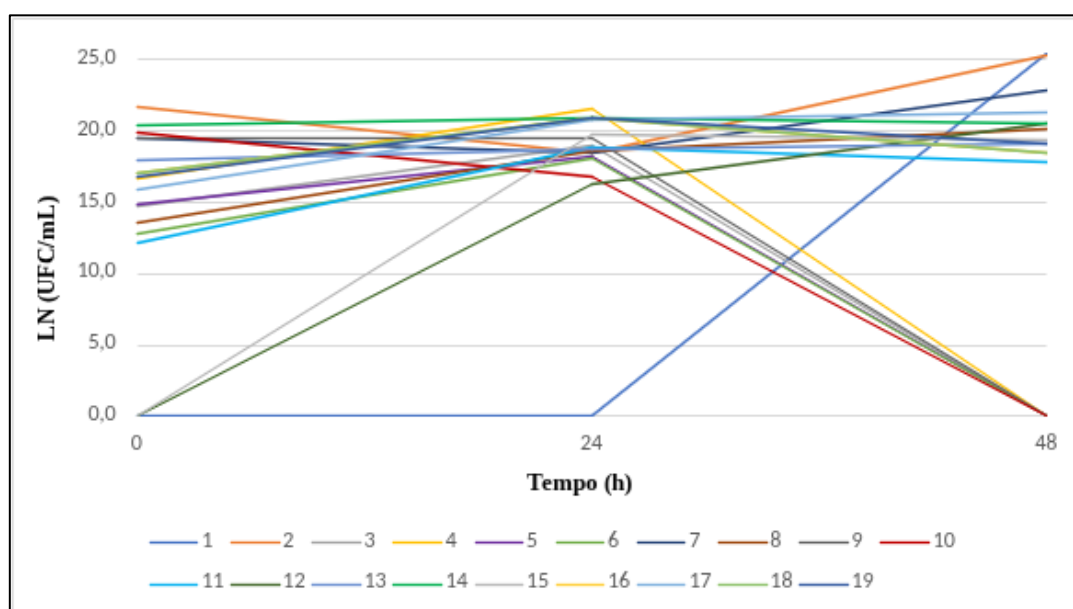


Figura 11 – Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* nos 19 ensaios.
Fonte: Autora (2024)

Observa-se uma variabilidade considerável entre os ensaios. Na Tabela 3 apresentam-se os valores da taxa específica de crescimento microbiano (μ_c) e dos tempos de duplicação celular (TD) obtidos para os diferentes ensaios.

Os resultados evidenciaram a variabilidade no desempenho das leveduras em função das diferentes condições experimentais testadas. Os ensaios 6, 8, 11, 16, 17 e 19, efetuados nas mesmas condições experimentais, apresentaram taxas de crescimento semelhantes, o que sugere uma possível estabilidade e reprodutibilidade do processo fermentativo nessas condições (central point).

Por outro lado, nos ensaios 9 e 10 o crescimento microbiano foi praticamente nulo. Ambos os ensaios foram conduzidos com elevada concentração de substrato (7,5 g) e pH ácido (3,5), condições que, presumivelmente, induziram stress ao processo biológico. No caso específico do ensaio 9, em que se utilizou a maior concentração de inóculo (10^6 UFC/mL), é plausível afirmar que a conjugação destes fatores: pH baixo, alta densidade celular e excesso de substrato, criou condições muito desfavoráveis à viabilidade das leveduras, comprometendo o seu crescimento e a eficiência global do processo fermentativo. Adicionalmente, o pH ácido (3,5), comum a ambos os ensaios, poderá ter agravado estas limitações, comprometendo a adaptação das células às condições do meio (Alexandre & Charpentier, 1998; Stanley et al., 2010).

Fleet (2007) reportou que, do ponto de vista microbiológico, o crescimento celular é fortemente influenciado por fatores ambientais como o pH, a concentração de substrato e a densidade celular inicial. O pH ácido (3,5) utilizado nos ensaios 9 e 10 encontra-se fora da faixa ótima para muitas leveduras, podendo comprometer a integridade da membrana plasmática e afetar negativamente processos metabólicos essenciais, como o transporte de nutrientes e a regulação enzimática. Adicionalmente, a elevada concentração de substrato (7,5 g) pode ter conduzido à acumulação de metabólitos secundários ou subprodutos tóxicos, como ácidos orgânicos e etanol, que atuam como agentes inibidores do crescimento celular.

Segundo Walker (2011), a elevada densidade celular inicial (10^6 UFC/mL) poderá ter intensificado o stress ambiental, uma vez que a competição por nutrientes é acrescida e a acumulação de subprodutos tóxicos ocorre mais rapidamente, agravando o impacto das condições desfavoráveis.

Nos ensaios 13 e 14, observaram-se taxas específicas de crescimento celular reduzidas ($\mu_c = 0,023 \text{ h}^{-1}$ e $0,024 \text{ h}^{-1}$, respetivamente), associadas a tempos de duplicação superiores a 29 horas. Apesar das condições experimentais distintas, inóculo elevado no ensaio 13 e elevada carga de substrato no ensaio 14, ambos os sistemas apresentaram crescimento microbiano lento, indicando a ocorrência de estresse fisiológico.

Segundo o reportado na literatura concentrações elevadas de substrato podem conduzir à inibição do crescimento microbiano devido a efeitos como aumento da osmolaridade, acumulação de subprodutos tóxicos e redução da eficiência da transferência de oxigénio (Shuler & Daugulis, 2011; Simkins et al., 2018).

Além disso, relações desequilibradas entre substrato e inóculo (S/I) podem favorecer a acumulação de ácidos voláteis (VFA) e outros metabólitos inibitórios, o que

contribui para a acidificação do meio e consequente inibição da atividade das leveduras (Valentin et al., 2024).

Os ensaios 1 e 12 apresentaram um bom desempenho na fermentação, mesmo com diferenças marcantes na quantidade de amostra utilizada. O ensaio 1, com baixa concentração de amostra (2,5 g) e pH ácido 3,5 (taxa específica de crescimento da levedura foi razoável com tempo de duplicação (TD = 1,30 h), indicando que a menor quantidade de substrato favoreceu a oxigenação e reduziu a competição por nutrientes. Já o ensaio 12, apesar de também se ter utilizado apenas 2,5 g de amostra, foi realizado a pH 4,0 e com um inóculo intermediário (10^5), resultando em uma taxa de crescimento da levedura igualmente elevada (TD = 1,62 h). Esses resultados sugerem que, mesmo com menor disponibilidade de substrato, condições adequadas de pH e inóculo podem otimizar a atividade microbiana, favorecendo a eficiência do processo fermentativo.

Tabela 3 – Taxa de crescimento para os 19 ensaios experimentais.

Ensaio	Taxa de crescimento	Tempo de duplicação (h)
	μc (h^{-1})	$\ln 2/\mu c$
1	0,531	1,30
2	0,285	2,43
3	0,181	3,84
4	0,205	3,39
5	0,135	5,12
6	0,224	3,10
7	0,069	10,00
8	0,137	5,04
9	0	-
10	0	-
11	0,278	2,50
12	0,427	1,62
13	0,023	30,54
14	0,024	29,34
15	0,060	11,55
16	0,160	4,33
17	0,114	6,09
18	0,166	4,18
19	0,171	4,04

A condição de fermentação conduzida a pH 4,9, com uma amostra de 5 g e

concentração do inóculo de 10^5 UFC/g (Ensaio 15, representado pela Figura 12) foi identificada como a mais adequada para escalonamento em volumes médios, com o objetivo de utilizar o produto fermentado como ingrediente na formulação de iogurte. Porque estas condições apresentam diversas vantagens reconhecidas na literatura científica. O pH ligeiramente ácido favorece a formação de um gel proteico firme com boa consistência, características desejáveis em produtos lácteos fermentados. Além disso, este pH contribui para a segurança microbiológica do produto, ao inibir microrganismos patogênicos ou deteriorantes, aumentando assim a estabilidade e o tempo de prateleira. A concentração do inóculo utilizada garante uma fermentação controlada, evitando acidificação excessiva do meio e permitindo o desenvolvimento equilibrado das culturas microbianas (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*), promovendo ainda a sua viabilidade. Estas condições favorecem também a produção de compostos benéficos, como vitaminas do complexo B, ácidos orgânicos, e compostos aromáticos, que enriquecem o perfil nutricional e sensorial do produto (Xu et al., 2017).

Por fim, estas condições asseguram uma elevada contagem de bactérias benéficas no produto final, satisfazendo critérios funcionais para inclusão de culturas probióticas, sendo por isso indicadas para a produção de um fermentado destinado à incorporação em iogurte (Prete et al., 2021).

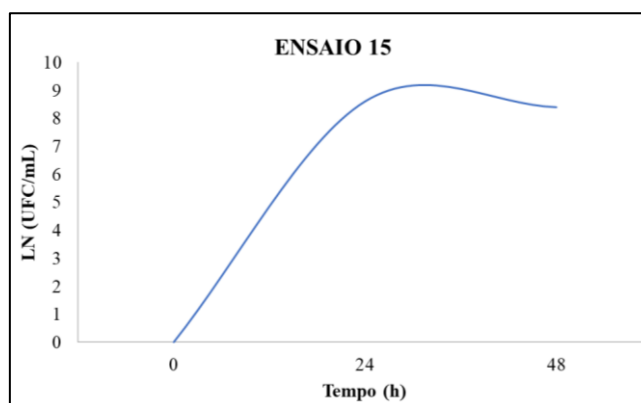


Figura 12 – Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* no ensaio 15.
Fonte: Autora (2024)

Com base nos resultados obtidos no delineamento experimental descrito na Seção 4.1, foi realizada a fermentação do pólen utilizando as mesmas condições experimentais do ensaio 15, previamente identificado como o de melhor desempenho. A Figura 13 apresenta a evolução do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo de 72 horas de fermentação, com base na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

No tempo inicial (0 h), correspondente à fase lag, a população microbiana apresentou uma densidade de 15,01 Ln (UFC/mL), refletindo o período de adaptação das células ao meio. Após 24 horas, observou-se um discreto aumento na população, atingindo 17,03 Ln (UFC/mL), seguido de um crescimento mais acentuado até 48 horas, quando a contagem alcançou 18,15 Ln (UFC/mL), caracterizando a fase logarítmica. No tempo final, às 72 horas, verificou-se uma leve redução na concentração celular, com valor de 17,80 Ln (UFC/mL), indicando o início da fase estacionária.

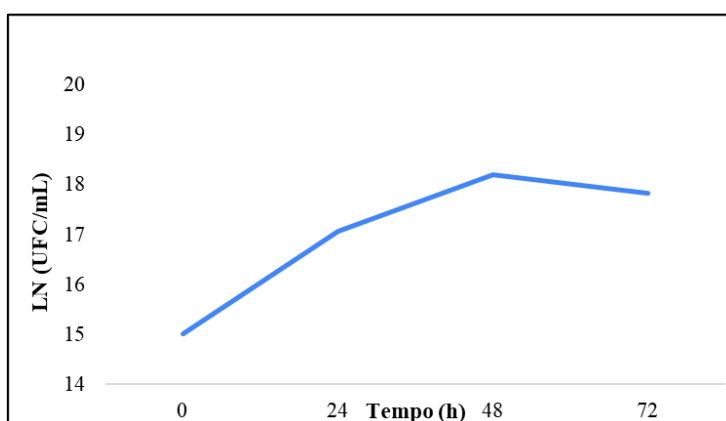


Figura 13 – Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação.

Fonte: Autora (2024)

Além da contagem de leveduras, para monitorizar a fermentação, avaliou-se o peso do frasco durante a fermentação, o resultado obtido apresenta-se na Figura 14. O peso do frasco reduziu de 454,71 g para 416,43 g, indicando que o processo fermentativo ocorreu normalmente, uma vez que sua redução mostra o consumo dos substratos presentes e a liberação de gás carbônico e outros metabolitos.

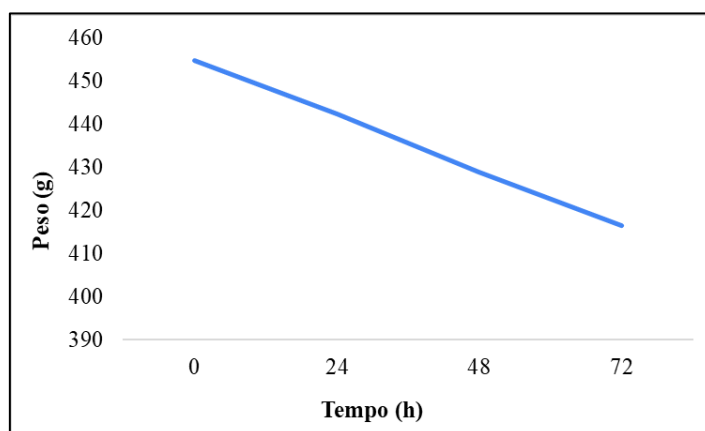


Figura 14 – Evolução do peso do frasco durante a fermentação.

Fonte: Autora (2024)

A partir da análise de regressão linear, avaliou-se a relação entre os valores do logaritmo natural da contagem de unidades formadoras de colônias (Ln UFC/mL) e o tempo de fermentação. A partir da fase exponencial de crescimento (fase log), foi possível obter a equação da reta que descreve a taxa de crescimento específica (μ_c) para fermentação. Com base nesses valores, o tempo de duplicação (DT) foi calculado utilizando a relação entre o logaritmo natural de 2 ($\ln 2$) e a taxa de crescimento específica (μ_c).

A Tabela 4 apresenta os valores encontrados. A fase log foi identificada no intervalo entre 0 e 48 horas de fermentação, sendo 48 horas o ponto de maior crescimento celular observado. A taxa específica de crescimento (μ_c) foi de $0,0664 \text{ h}^{-1}$, valor que reflete a velocidade de multiplicação das células durante esse período. Com base nessa taxa, calculou-se o tempo de duplicação celular, obtendo-se um valor de aproximadamente 10,44 horas. Esses resultados indicam um crescimento progressivo, possivelmente influenciado pelas condições moderadamente favoráveis do meio, como a concentração de substrato e o pH.

Tabela 4 – Taxa de crescimento celular.

Taxa de crescimento Tempo de duplicação		
Fase Log	$\mu_c \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\ln 2/\mu_c \text{ (h)}$
48	0,0664	10,44

4.2. Composição química dos extratos de pólen e de iogurte

4.2.1. Composição química dos extratos de pólen *in natura* e pólen fermentado

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos e para a capacidade antioxidante do pólen *in natura* e do pólen submetido à fermentação. Observa-se que o pólen fermentado apresentou valores superiores face ao pólen *in natura*, sugerindo que o processo fermentativo promoveu um aumento na concentração de compostos bioativos, o que poderá traduzir-se numa valorização das suas propriedades funcionais.

Os valores dos compostos fenólicos totais, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, variando de

44,82 a 72,60 mg equivalentes de ácido gálico/g (mg EAG/g) nas amostras de pólen *in natura* e fermentado, respetivamente. A variação nos teores de compostos fenólicos totais entre as diferentes amostras de pólen (*in natura*, fermentado e desidratado) pode ser atribuída a alterações físico-químicas provocadas pelos diferentes processos de tratamento. A fermentação, por exemplo, é conhecida por potenciar a biodisponibilidade de compostos fenólicos devido à ação de enzimas microbianas que hidrolisam conjugados fenólicos ou libertam compostos ligados à matriz celular vegetal, tornando-os mais acessíveis à extração e quantificação. Rocha (2013), que analisou pólen desidratado de Portugal, reportou valores inferiores, variando entre 32,64 e 47,47mg EAG/g, o que sugere que as amostras de pólen *in natura* e fermentado apresentaram maior teor destes compostos bioativos.

De forma semelhante, Neves et al., (2008) também observou concentrações mais baixas, entre 6,9 e 13,78 mg EAG/g indicando que o processamento do pólen influenciou diretamente a sua composição fenólica. Assim, os resultados superiores observados no pólen *in natura* e, sobretudo, no pólen fermentado, corroboram a evidência de que métodos de processamento menos agressivos ou biotransformadores (como a fermentação) podem preservar ou até aumentar o conteúdo fenólico, enquanto métodos que envolvem aquecimento tendem a reduzir a concentração desses compostos bioativos (Ghosh & Gangopadhyay, 2020). O potencial antioxidante do pólen de abelha e outros produtos apícolas está associado ao seu teor de compostos fenólicos, particularmente aos flavonoides (Caldas et al., 2019).

Relativamente ao teor de flavonoides, observou-se que existiram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras. Ainda assim, observou-se um aumento nos valores das amostras analisadas, oscilando entre 2,20 e 5,09 mg EQ/g, para o pólen *in natura* e fermentado, respetivamente. Por outro lado, os valores superiores relatados por Rocha (2013) e Neves et al., (2008) para amostras de pólen desidratado sugerem que o processo de secagem pode concentrar os compostos bioativos devido à remoção de água, aumentando a sua concentração relativa por grama de amostra. No entanto, é importante salientar que a composição do pólen pode variar significativamente em função de fatores botânicos e geográficos, bem como das condições pós-colheita e metodologias analíticas utilizadas, o que pode justificar as discrepâncias observadas entre os estudos (Campos et. al 2003).

Observou-se que os valores obtidos para a capacidade antioxidante pelo método DPPH apresentaram diferenças significativas entre si, com valores de 89,76 mg

equivalentes de Trolox/g (mg ET/g) no pólen *in natura* e 170,85 mg eq. Trolox/g no pólen fermentado. Estes resultados indicando um aumento na capacidade antioxidante após a fermentação, sugerindo que este processo potencializa os mecanismos de neutralização dos radicais livres.

Assim, os resultados reforçam a importância da fermentação como uma estratégia para aumentar o potencial funcional do pólen, podendo expandir as suas aplicações na indústria de alimentos e na nutrição humana.

Tabela 5 – Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH) para as amostras de pólen.

	Fenóis Totais [a]	Flavonoides [b]	DPPH [c]
Pólen <i>in natura</i>	44,82 ± 1,68 ^a	2,20 ± 0,10 ^a	89,76 ± 17,44 ^a
Pólen fermentado	72,60 ± 11,44 ^b	5,09 ± 0,49 ^b	170,85 ± 3,00 ^b

Resultados expressos em média das análises ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. [a] Fenóis Totais (mg eq. Ácido Gálico/g); [b] Flavonoides Totais (mg eq. Quercetina/g); [c] DPPH (mg eq. Trolox/g).

4.2.2. Composição química dos extratos de iogurte

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para os extratos de iogurte nos tempos 0 e 28 dias. Os valores de flavonoides totais e capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras. Contudo, o teor de compostos fenólicos apresentou uma diferença significativa entre as amostras analisadas ($p < 0,0001$). Observou-se uma redução nos teores de fenóis e flavonoides totais em todas as amostras analisadas ao longo do período de armazenamento. Contudo, esta diminuição foi mais acentuada na formulação contendo 0,5% de extrato de pólen fermentado. Relativamente aos compostos fenólicos totais, o iogurte controlo (IC) apresentou um valor inicial 8,34 mg equivalentes ácido gálico/g (mg EAG/g), que decresceu para 5,58 mg eq. ácido gálico/g após 28 dias. Por sua vez, o iogurte enriquecido com 0,25% de extrato de pólen fermentado (I25) registou um teor inicial de 8,71 mg eq. ácido gálico/g, diminuindo para 6,76 mg EAG/g, no final do período de armazenamento. Por sua vez, o iogurte com 0,5% de extrato de pólen fermentado (I05) apresentou os maiores valores de fenóis, iniciando com 18,48 m g equivalentes de ácido gálico/g e diminuindo para 14,25 mg EAG/g após 28 dias de armazenamento.

Relativamente ao teor de flavonoides, observou-se que o valor diminuiu consideravelmente ao longo do tempo no iogurte controlo (IC), com valor inicial de 0,15 mg equivalentes de quercetina/g (mg EQ/g), reduzindo para 0,02 mg EQ/g após 28 dias. Por outro lado, no iogurte com 0,25% de extrato de pólen fermentado (I25), verificou-se um ligeiro aumento, com 0,08 mg EQ/g no início e 0,10 mg EQ/g ao final do período. O iogurte com 0,5% de extrato de pólen fermentado (I05) apresentou os maiores valores entre as amostras, iniciando com 0,25 (mg EQ/g) e mantendo 0,24 (mg EQ/g) após 28 dias de armazenamento. A atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH revelou que o iogurte controlo (IC), apresentou um aumento ao longo do período de armazenamento, com valores a subir de 1,12 mg equivalente de Trolox/g (mg ET/g) para 1,34 (mg ET/g) após 28 dias. Por outro lado, o iogurte com 0,25% de extrato de pólen fermentado (I25) apresentou valores semelhantes ao controlo inicialmente, registou 1,21 (mg ET/g) e uma ligeira redução para 1,15 (mg ET/g) ao final do período de armazenamento.

Já o iogurte com 0,5% de extrato de pólen fermentado (I05) apresentou a maior atividade antioxidante, iniciando com 2,76 (mg ET/g) e mantendo 2,74 (mg ET/g) após 28 dias de armazenamento. Esses resultados indicam que a incorporação de extrato de pólen fermentado contribuiu para o aumento dos teores de fenóis e flavonoides, bem como para uma maior atividade antioxidante, particularmente na formulação com 0,5% de extrato, cuja eficácia se manteve mesmo após o período de armazenamento.

A manutenção da elevada atividade antioxidante no iogurte enriquecido com 0,5% de extrato de pólen fermentado (I05), mesmo após 28 dias de armazenamento, pode ser justificada pela presença de compostos fenólicos e flavonoides em maior concentração e maior estabilidade na matriz fermentada. A fermentação do pólen promove a libertação de compostos bioativos ligados às paredes celulares vegetais, tornando-os mais biodisponíveis. Além disso, o ambiente ácido e as enzimas produzidas durante o processo fermentativo podem favorecer a conversão de polifenóis complexos em formas mais reactivas e eficazes na neutralização de radicais livres.

Estudos prévios demonstram que a fermentação de substratos ricos em polifenóis por microrganismos lácticos resulta num aumento da sua actividade antioxidante devido à biotransformação de compostos fenólicos (Zhang et al., (2019). Assim, a estabilidade dos teores de fenóis e flavonoides, aliada à elevada capacidade de sequestro de radicais DPPH observada na formulação I05, evidencia o potencial funcional acrescido conferido pela incorporação do extrato de pólen fermentado na matriz do iogurte (Callejón et al.,

2020).

Tabela 6 – Teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH) para as amostras de iogurte.

Amostras	Tempo (dias)	Fenóis Totais ⁴ [a]	Flavonoides [b]	DPPH [c]
IC ¹	0	8,34 ± 0,00 ^c	0,15 ± 0,01 ^a	1,12 ± 0,73 ^a
	28	5,58 ± 0,19 ^c	0,02 ± 0,01 ^a	1,34 ± 0,68 ^a
I25 ²	0	8,71 ± 1,34 ^c	0,08 ± 0,04 ^a	1,21 ± 0,09 ^a
	28	6,76 ± 0,32 ^c	0,10 ± 0,00 ^a	1,15 ± 0,70 ^a
I05 ³	0	18,48 ± 1,42 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	2,76 ± 0,44 ^a
	28	14,25 ± 1,30 ^b	0,24 ± 0,03 ^a	2,74 ± 0,92 ^a

¹ Iogurte com adição de sorbato de potássio (0,03%). ² Iogurte incorporado com extrato de pólen fermentado a 0,25% da composição. ³ Iogurte incorporado com extrato de pólen fermentado a 0,5% da composição. ⁴ Para cada parâmetro (fenóis totais, flavonoides e DPPH) foi realizada uma análise em duplicata e o valor disposto é a média aritmética dos valores obtidos em cada ensaio ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. [a] Fenóis Totais (mg eq. Ácido Gálico/g); [b] Flavonoides Totais (mg eq. Quercetina/g); [c] DPPH (mg eq. Trolox/g).

4.3. Análise microbiológica do pólen, do fermentado e do iogurte

4.3.1. Análise microbiológica do pólen *in natura* e do fermentado

Ao longo do processo produtivo, o pólen apícola está suscetível a contaminações microbiológicas desde a recolha até a distribuição. Essas contaminações podem ter diversas origens, incluindo a ação humana, fatores ambientais, a própria contaminação pelas abelhas, além de condições inadequadas de higiene em diferentes etapas do processo, como recolha, processamento, embalagem e armazenamento (Sofia, 2024). Na Tabela 7 estão sumariados os valores obtidos nas análises microbiológicas da amostra de pólen *in natura* e da amostra de pólen fermentado.

Tabela 7 – Resultados da análise microbiológica ao pólen *in natura* e ao pólen fermentado.

Amostra	Tempo (dias)	Bolores e Leveduras (log UFC/mL)	<i>Bacillus cereus</i> (log UFC/mL)	Clostrídios sulfito-redutores (log 10UFC/mL)	Coliformes totais (UFC/mL)	<i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>S. aureus</i> (UFC/mL)	Mesófilos totais (log UFC/mL)
Pólen <i>in natura</i>	0	6,04	3,08	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Pólen fermentado	4	4,74	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	4,91

Devido sua riqueza nutricional, o pólen apícola torna-se particularmente suscetível ao crescimento de bolores e leveduras, sobretudo quando as condições de armazenamento e manipulação não são adequadas. O elevado teor de açúcares, aliado à presença de nutrientes essenciais, cria um ambiente propício à proliferação destes microrganismos, como se observou no pólen *in natura*.

Além disso, também possuem a capacidade de se desenvolver em condições adversas, como baixas temperaturas e pH reduzido (Tournas et al., 2001). Desta forma, estes microrganismos tornam-se agentes significativos de deterioração, sobretudo em alimentos com baixo teor de atividade de água (a_w), como produtos açucarados, ácidos ou fermentados (INSA, 2019).

Convém salientar que algumas espécies fúngicas são capazes de produzir micotoxinas, substâncias tóxicas que representam riscos significativos para a saúde pública, estando associadas a efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos, imunossupressores e carcinogênicos (INSA, 2019).

A presença de microrganismos deteriorantes pode comprometer não só a estabilidade e segurança do produto, mas também as suas propriedades sensoriais e funcionais, tornando essencial a adoção de boas práticas de fabrico, higiene e armazenamento ao longo da cadeia produtiva (INSA, 2019).

Os resultados obtidos para a contagem de bolores e leveduras nas amostras de pólen demonstraram uma redução significativa após o processo de fermentação, com os valores decrescendo de 6,04 log UFC/mL para 4,74 log UFC/mL. Essa diminuição pode ser justificada pelo fato de que a fermentação promove alterações no ambiente microbiológico, como a redução do pH, o aumento da produção de ácidos orgânicos (como o ácido láctico) e a competição por nutrientes entre microrganismos (Tamanga et al., 2016).

Essa redução pode estar relacionada à produção de metabólitos pelas leveduras durante o processo fermentativo, os quais possivelmente criaram condições menos favoráveis ao crescimento destes microrganismos. Adicionalmente, verifica-se que o processo de pasteurização aplicado previamente à fermentação foi eficaz na redução das populações microbianas presentes no pólen, contribuindo para a diminuição inicial da carga de bolores e leveduras e para a melhoria da qualidade higiênico-sanitária da matéria-prima. A pasteurização, ao submeter o alimento a temperaturas controladas durante um intervalo de tempo específico, provoca a desnaturação de proteínas e enzimas essenciais à sobrevivência microbiana, inativando microrganismos patogênicos e deterioradores, sem comprometer significativamente as características nutricionais do produto (Jay et al., 2005).

O estudo conduzido por Hervatin (2024) corrobora os resultados obtidos no presente trabalho. O investigador reportou a presença de bolores e leveduras em todas as amostras de pólen *in natura* analisadas, observando contagens microbianas variando entre $8,0 \times 10^4$ UFC/mL e $9,7 \times 10^5$ UFC/mL, nas amostras recolhidas em diferentes períodos do ano. Resultados semelhantes também foram descritos por Estevinho et al., (2012), que identificaram a presença de bolores e leveduras em 60% das amostras de pólen português analisadas. Relativamente ao *Bacillus cereus*, observou-se que, durante o processo de fermentação, ocorreu a inibição destes microrganismos esporulados. Os seus valores reduziram de 3,08 log UFC/mL para valores inferiores a 10 log UFC/mL no final da fermentação. Esses resultados indicam que a pasteurização do pólen, associada ao processo fermentativo, foi eficaz na eliminação de *Bacillus cereus*. Rojas et al., (2020),

identificou *Bacillus cereus sensu stricto* em 50% das colônias isoladas a partir de 30 amostras de pólen apícola fresco, utilizando PCR e análise do gene 16S rRNA.

Em relação aos resultados encontrados para a pesquisa e contagem de mesófilos totais, observou-se o crescimento da população microbiana no final da fermentação, atingindo valores de 4,91 log UFC/mL. As condições de processamento, incluindo fatores como umidade, temperatura, disponibilidade de nutrientes, oxigênio e valores de pH são parâmetros que criam um ambiente ideal para o desenvolvimento dos mesófilos, que se adaptam rapidamente durante o processo fermentativo. Os mesófilos apresentam elevada capacidade adaptativa, o que favorece sua predominância e desenvolvimento ao longo da fermentação.

Por fim, no que diz respeito aos parâmetros de qualidade sanitária (coliformes totais e *estafilococos* coagulase positiva) e de segurança (clostrídios sulfito redutores), obteve-se resultados muito satisfatórios, uma vez que não foram detetados em nenhuma amostra de pólen analisada. Os estudos obtidos por Sofia (2024) em pólen desidratado e por Estevinho et. al (2012), em pólen de Portugal também indicaram ausência destes microrganismos.

4.3.2. Análise microbiológica do iogurte

Avaliou-se a qualidade microbiológica das amostras de iogurte nos tempos 0, 14 e 28 dias a fim de estimar a estabilidade microbiológica e a segurança do produto ao longo do armazenamento. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Verificou-se um aumento na contagem de bactérias ácido-láticas ao longo do tempo em todas as amostras analisadas. No iogurte convencional, com adição de 0,03% de sorbato de potássio, os valores foram de 8,21, 8,40 e 9,54 log UFC/mL nos dias 0, 14 e 28, respectivamente. No iogurte com 0,25% de extrato de pólen, as contagens foram de 8,20, 8,16 e 9,11 log UFC/mL no período. Já no iogurte com 0,5% de extrato de pólen, os valores foram de 8,23, 8,16 e 9,15 log UFC/mL nos dias 0, 14 e 28, respectivamente. As amostras contendo extrato de pólen apresentaram comportamento semelhante na contagem de bactérias lácticas, e em todas as formulações se verificou aumento na população desses microrganismos ao longo do período de armazenamento. Estes resultados indicam que as bactérias se mantiveram viáveis durante toda a vida de prateleira e que a presença do extrato de pólen não afetou significativamente o seu crescimento, garantindo a manutenção das suas propriedades benéficas e conferindo ao

iogurte um pH estável e acidez desejada.

De acordo com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, a contagem total de bactérias ácido-láticas deve ser, no mínimo, 10^7 UFC/mL. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo indicam que todas as formulações avaliadas atenderam a esse requisito, garantindo conformidade com os padrões exigidos.

Os resultados para microrganismos mesófilos totais indicaram variações no crescimento ao longo do tempo. A amostra com adição de sorbato de potássio (0,03%) apresentou um aumento nos primeiros 14 dias, passando de 6,70 para 7,28 log UFC/mL, seguido por uma redução para 1,74 log UFC/mL no dia 28. O mesmo padrão foi observado no iogurte com 0,25% de extrato de pólen, que variou de 6,55 log UFC/mL no início para 6,85 log UFC/mL no dia 14, reduzindo a 1,88 log UFC/mL no dia 28. Já o iogurte com 0,5% de extrato de pólen indicou um contínuo, partindo de 6,63 log UFC/mL no dia 0, atingindo 6,82 log UFC/mL no dia 14 e chegando a 7,41 log UFC/mL no dia 28. O crescimento de microrganismos mesófilos ao longo do tempo é um fenômeno esperado em produtos fermentados e não compromete a qualidade microbiológica das amostras. Convém salientar que, a contagem total destes microrganismos não constitui um indicador fiável da qualidade microbiológica de produtos fermentados. Isto deve-se ao facto de que esta contagem pode incluir bactérias láticas, que estão naturalmente presentes e são desejáveis nestes produtos.

Assim, os resultados obtidos podem sobrestimar a presença de microrganismos indesejáveis, uma vez que muitos dos aeróbios mesófilos quantificados pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas (Adams & Moss, 2008; Tamime & Robinson, 2007).

Adicionalmente, a ausência de microrganismos patogênicos reforça a segurança microbiológica do produto, evidenciando que as formulações mantiveram condições apropriadas de conservação durante todo o período de armazenamento, em conformidade com os padrões estabelecidos para garantir a integridade do produto.

Para a amostra controlo de iogurte, com adição de sorbato de potássio (0,03%), a contagem inicial de bolores e leveduras foi de 7,56 log UFC/mL. Na amostra contendo 0,25% e 0,5 % de extrato de pólen fermentado, a contagem inicial foi de 6,95 log UFC/mL e 6,10 log UFC/mL, respetivamente. Em todos os casos, ao fim de 14 e 28 dias de armazenamento a contagem de fungos foi <10 , indicando que o efeito do sorbato de potássio no crescimento de bolores leveduras foi idêntico ao obtido nas formulações

adicionadas de extrato fermentado.

Zenkevicz (2022) analisou a qualidade microbiológica de iogurtes comercializados, observando que a presença de bolores e leveduras indica práticas de má qualidade no fabrico, destacando a importância de conservantes eficazes na prevenção da contaminação.

Estes estudos corroboram a hipótese de que extratos naturais, como o de pólen fermentado, podem ser alternativas viáveis ao sorbato de potássio na conservação de iogurtes, mantendo a qualidade microbiológica do produto durante o armazenamento.

Relativamente aos microrganismos patogênicos e indicadores higiênico-sanitários avaliados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, esporos de clostrídios sulfito-redutores e coliformes totais), estes estavam ausentes em todas as amostras avaliadas, independentemente do tempo de análise. Estes resultados são idênticos aos obtidos em iogurtes conservados com sorbato de potássio por Sousa et al., (2023).

Tabela 8 – Resultados da análise microbiológica das amostras de iogurte.

Amostra	Tempo (dias)	Bactérias Láticas (log UFC/mL)	Mesófilos totais (log UFC/mL)	Bolores e Leveduras (log UFC/mL)	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	Clostrídios sulfito-redutores
IC¹	0	8,21 ± 0,03	6,70 ± 0,07	7,46 ± 0,13	<10	<10	<10	<10	ausente
	14	8,40 ± 0,06	7,28 ± 0,01	<10	<10	<10	<10	<10	ausente
	28	9,54 ± 0,02	1,74 ± 0,00	<10	<10	<10	<10	<10	ausente
I25²	0	8,20 ± 0,03	6,55 ± 0,02	6,95 ± 0,01	<10	<10	<10	<10	ausente
	14	8,16 ± 0,01	6,85 ± 0,00	<10	<10	<10	<10	<10	ausente
	28	9,11 ± 0,00	1,88 ± 0,00	<10	<10	<10	<10	<10	ausente
I05³	0	8,23 ± 0,01	6,63 ± 0,02	6,10 ± 0,04	<10	<10	<10	<10	ausente
	14	8,16 ± 0,01	6,82 ± 0,00	<10	<10	<10	<10	<10	ausente
	28	9,15 ± 0,01	7,41 ± 0,01	<10	<10	<10	<10	<10	ausente

¹ Iogurte com adição de sorbato de potássio (0,03%). ² Iogurte incorporado com extrato de pólen a 0,25% da composição. ³ Iogurte incorporado com extrato de pólen a 0,5% da composição. Para cada foi realizada uma análise em duplicata e o valor disposto é a média aritmética dos valores obtidos em cada ensaio ± desvio padrão.

4.4. Análises físico-químicos do fermentado e do iogurte

4.4.1. Análise físico-química do fermentado

4.4.1.1. Cromatografia líquida (HPLC) e açúcar redutor

Durante a fermentação, os açúcares servem como principal fonte de carbono e energia para os microrganismos, desta forma, avaliou-se o comportamento dos açúcares durante a fermentação. Na Tabela 9 observam-se os resultados obtidos para a análise dos açúcares redutores, sacarose, frutose e glicose presentes no produto fermentado.

No tempo inicial (0h), foi observada uma alta concentração de açúcares redutores (28,31 g/L), sendo a glicose (9,73 g/L) e a frutose (10,43 g/L) os principais monossacarídeos presentes. A detecção de sacarose em baixa concentração (1,43 g/L) indica a presença de uma fração reduzida de açúcar não redutor, passível de ser hidrolisada pelas enzimas produzidas pelas leveduras.

Após 24 horas de fermentação, observou-se uma redução na concentração de açúcares redutores, que atingiu $24,35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, acompanhada por uma diminuição nos níveis de glicose ($4,48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e frutose ($4,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Esse perfil sugere que a levedura iniciou rapidamente o consumo de monossacarídeos disponíveis, utilizando-os como substrato para a produção de etanol e dióxido de carbono (CO_2). Paralelamente, a concentração de sacarose diminuiu para $0,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, indicando a sua hidrólise parcial em glicose e frutose, favorecendo a utilização pelas leveduras (Timmermans et. al, 2022).

Às 48 horas de fermentação, observou-se que a frutose foi completamente consumida (0 g/L), e a concentração de glicose reduziu para 3,43 g/L. Os açúcares redutores diminuíram para 8,32 g/L, refletindo um metabolismo muito ativo. Em relação à sacarose, verificou-se um ligeiro aumento na sua concentração (0,87 g/L), o que pode estar relacionado com a liberação de monossacarídeos no meio.

Por fim, após 72 horas de fermentação, a atividade fermentativa atingiu um estágio estacionário. Os açúcares redutores apresentaram apenas uma ligeira redução (6,26 g/L), enquanto a glicose manteve-se praticamente inalterada (3,38 g/L) e a frutose permaneceu ausente. Este comportamento indica que a levedura consumiu a maior parte dos açúcares disponíveis e que o metabolismo fermentativo foi reduzido, possivelmente devido à escassez de substratos significativos ou à produção de metabólitos indesejáveis como o etanol, cuja acumulação pode inibir a atividade microbiana. O processo fermentativo conduzido por *Saccharomyces cerevisiae* segue um ciclo de crescimento populacional

composto por quatro fases: adaptação (latência ou lag), exponencial (logarítmica ou fase log), estacionária e declínio celular. Na fase de adaptação, as leveduras recentemente inoculadas ajustam-se às novas condições ambientais antes de iniciarem a sua multiplicação. Segue-se a fase exponencial ou logarítmica (fase log), caracterizada por uma intensa atividade metabólica e por um rápido crescimento celular, culminando na formação da população máxima de leveduras. Após esse período, o crescimento é interrompido devido à limitação de nutrientes (Horsey, 2007).

Finalmente, ocorre a fase de declínio celular, durante a qual a população de leveduras diminui progressivamente, em consequência da escassez de nutrientes, da acumulação de etanol e da presença de outras substâncias tóxicas resultantes do processo fermentativo (Del Nobile et al., 2003). Esta dinâmica de crescimento foi evidenciada nos resultados do presente estudo. A acentuada diminuição dos açúcares fermentáveis nas primeiras 48 horas confirma que este é o período de maior atividade fermentativa, correspondente à fase exponencial. Após esse intervalo, a redução na taxa de consumo de açúcares sugere que a levedura entra em uma fase de desaceleração metabólica, influenciada tanto pela limitação de nutrientes como acumulados pelo impacto dos metabólitos secundários no meio.

Tabela 9 – Resultado da dinâmica dos açúcares durante a fermentação.

Tempo (h)	Açúcares redutores (g/L)	Sacarose (g/L)	Frutose (g/L)	Glucose (g/L)
0	28,31	1,43	10,43	9,73
24	24,35	0,55	4,06	4,48
48	8,32	0,87	0,0	3,43
72	6,26	0,38	0,0	3,38

4.4.2. Análise físico-química do iogurte

A Tabela 10 apresenta os resultados das análises físico-químicas realizadas às amostras de iogurte ao longo de 28 dias de armazenamento, com avaliação dos teores de proteína, gordura, humidade e cinzas. Com base na análise estatística, a ANOVA bifatorial indicou que o factor tempo exerceu um efeito estatisticamente significativo sobre o teor de proteína* ($p = 0,009$).

Observou-se a redução progressiva no teor de proteína em todas as amostras analisadas durante o período de conservação, sendo esta mais acentuada na amostra controle (IC), cujo teor passou de 3,51% para 3,21%. As formulações contendo extrato de pólen fermentado apresentaram reduções menos expressivas, destacando-se a amostra com 0,25% de pólen que registou uma diminuição de 3,32% para 3,08%, e a amostra com 0,5% de extrato, cuja variação foi de 3,50% para 3,31%, mantendo, assim, um teor relativamente elevado ao final do armazenamento. Os resultados obtidos estão em consonância com os dados reportados por Santos et al., (2019) que avaliou a incorporação de extrato de própolis em iogurte e observou teores de proteína de aproximadamente 3,16% na formulação com própolis e 3,20% na formulação convencional. Freitas et al., (2024) reportou valores inferiores de teor de proteína em iogurtes enriquecidos com extrato de folha de videira.

Relativamente ao teor de gordura, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, destacando-se a comparação entre o iogurte controle no tempo inicial (0) e as demais formulações nos dois momentos de análise. Observou-se que a amostra controle apresentou uma redução mais acentuada no teor de gordura, diminuindo de 2,82% para 2,14%. As amostras enriquecidas com extrato de pólen fermentado (I25 e I05), apresentaram teores iniciais (2,02% e 2,01%, respectivamente); contudo, registraram um ligeiro aumento após 28 dias de armazenamento. Este comportamento pode estar associado à estabilidade lipídica conferida pelos compostos bioativos presentes no extrato de pólen fermentado, nomeadamente fenóis e flavonoides, os quais poderão ter desempenhado um papel antioxidante, reduzindo a degradação dos lípidos durante o armazenamento. Adicionalmente, é possível que o extrato tenha influenciado a estrutura da matriz proteica do iogurte, favorecendo a retenção de gordura. Resultados semelhantes foram reportados por Oliveira et al., (2020), que observaram uma menor variação nos teores de gordura em iogurtes suplementados com extratos vegetais ricos em compostos fenólicos.

Por outro lado, a redução mais acentuada verificada na amostra controle pode ser atribuída à instabilidade física da emulsão na ausência de agentes bioativos estabilizadores, o que poderá ter promovido a separação da fase lipídica ou perdas durante o armazenamento. De forma semelhante, Freitas et al., (2024) observou um ligeiro aumento no teor de gordura nas amostras de iogurte incorporadas com extrato fermentado de folha de videira, com valores a variarem entre 2,00% e 2,16%. Em contrapartida, Santos et al., (2020), reportou teores de gordura superiores, quer na amostra de iogurte

controle, quer na amostra com extrato de própolis (3,28%).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, as amostras de iogurte seriam classificadas, segundo a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, do (MAPA), como iogurte parcialmente desnatado, ou semidesnatado. Em conformidade com a legislação europeia, nomeadamente a Portaria n.º 742/92 de 24 de Julho, as amostras enquadram-se na categoria iogurte meio gordo.

Em relação à percentagem de humidade das amostras, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ao longo do período de armazenamento, tendo sido registadas apenas variações discretas. A amostra de iogurte controle, suplementada com sorbato de potássio (0,03%), apresentou um ligeiro aumento no teor de humidade, passando de 80,89% para 81,01%, nos tempos 0 e 28 dias, respetivamente. A amostra com 0,5% de extrato revelou igualmente um ligeiro aumento no teor de humidade, passando de 80,75% para 80,80%. Em sentido oposto, a amostra de iogurte adicionado de 0,25% de extrato de pólen apresentou um ligeiro aumento de 80,81% para 81,68%. De um modo geral, as variações observadas no teor de humidade foram sutis e não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes amostras.

No que diz respeito ao teor de cinzas, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras analisadas ao longo do período de armazenamento. No entanto, registou-se um pequeno aumento nos valores correspondentes ao iogurte controle (IC) e à formulação contendo 0,25% de extrato de pólen fermentado. A amostra controle apresentou um acréscimo de 0,95% para 1,21% ao final dos 28 dias, enquanto a amostra I25 registou um ligeiro aumento de 0,91% para 0,93%. Por outro lado, a amostra incorporada com 0,5% de extrato de pólen (I05) apresentou um ligeiro decréscimo, mantendo-se, no entanto, praticamente estável ao longo de todo o período de armazenamento. Estudos anteriores demonstraram que a fortificação de iogurtes com extratos vegetais, como cardamomo, canela, beterraba e repolho roxo, resulta num aumento significativo do teor de cinzas em comparação com iogurtes não fortificados. Por outro lado, a estabilidade ou ligeiro decréscimo no teor de cinzas observado na amostra com 0,5% de extrato de pólen (I05) pode ser atribuído à possível sedimentação ou redistribuição de sólidos minerais durante o armazenamento. A interação entre os constituintes do pólen e a matriz do iogurte pode influenciar a disponibilidade e distribuição dos minerais, afetando assim o teor de cinzas quantificados (Guler & Sanal, 2009).

Além disso, a fermentação e as condições de armazenamento podem afetar a

estabilidade físico-química do iogurte, influenciando a retenção ou liberação de compostos minerais ao longo do tempo. A fermentação pode alterar a estrutura das micelas de caseína, modificando o equilíbrio mineral e, conseqüentemente, o teor de cinzas do produto final (Shivanna & Rao, 2024; Bilandžić, et al., 2015). Salienta-se que, nos estudos realizados por Freitas et al., (2024) e Santos et al., (2020), foram reportados valores inferiores aos observados neste estudo.

Por fim, a avaliação dos hidratos de carbono e do valor energético das amostras de iogurte revelou variações pouco acentuados entre as formulações. A amostra controle (IC) apresentou o teor mais reduzido de hidratos de carbono (11,74 g/100g), concomitantemente com o valor energético mais elevado (86,34 Kcal/100g), atribuível ao seu elevado teor lipídico. Já a amostra I25 apresentou um teor de hidratos de carbono de 12,94 g/100g, enquanto a amostra I05 registou 12,89 g/100g de hidratos de carbono e 83,65 Kcal/100g de valor energético. Esses resultados sugerem que a incorporação do extrato de pólen fermentado pode induzir alterações sutis na composição nutricional dos iogurtes, evidenciadas por um ligeiro incremento no teor de hidratos de carbono e uma discreta redução do valor energético, em comparação com a formulação controle. A adição de extrato de pólen fermentado ao iogurte pode influenciar a composição nutricional do produto, nomeadamente no aumento do teor de hidratos de carbono e na ligeira redução do valor energético. Esta alteração pode ser atribuída à presença natural de açúcares no pólen, como a frutose, glicose e sacarose, que são utilizados pelas bactérias ácido-lácticas durante a fermentação, resultando na produção de ácido láctico e outros compostos. Além disso, o processo de fermentação pode promover a hidrólise de polissacáridos complexos em açúcares mais simples, aumentando a fração de hidratos de carbono disponíveis no produto final.

A ligeira redução do valor energético observada nas amostras com extrato de pólen fermentado pode ser explicada pela substituição parcial da gordura da fórmula original pelo extrato fermentado, uma vez que os lípidos possuem um valor calórico mais elevado (9 kcal/g) em comparação com os hidratos de carbono (4 kcal/g). Assim, a incorporação do extrato de pólen fermentado pode alterar o perfil nutricional do iogurte, influenciando o equilíbrio entre macronutrientes e, conseqüentemente, o valor energético final do produto. (Cosme-Alonso et al., 2023; Fuenmayor et al., 2014)

Tabela 10 – Resultados das análises físico-químicas (proteína, gordura, humidade e cinza) das amostras de iogurte.

Amostra	Tempo (dias)	% proteína *	% gordura	% humidade	% cinzas ⁴	Hidratos de carbono (g/100g)	Valor Energético (Kcal/ 100g)
IC¹	0	3,51 ± 0,04	2,82 ± 0,09 ^a	80,89 ± 0,15 ^a	0,95 ± 0,22 ^a	11,74	86,34
	28	3,21 ± 0,04	2,14 ± 0,02 ^b	81,01 ± 0,09 ^a	1,21 ± 0,39 ^a		
I25²	0	3,32 ± 0,08	2,02 ± 0,03 ^b	80,81 ± 0,02 ^a	0,91 ± 0,15 ^a	12,94	83,24
	28	3,08 ± 0,11	2,08 ± 0,01 ^b	81,68 ± 1,17 ^a	0,93 ± 0,04 ^a		
I05³	0	3,50 ± 0,13	2,01 ± 0,01 ^b	80,75 ± 0,22 ^a	0,85 ± 0,02 ^a	12,89	83,65
	28	3,31 ± 0,14	2,17 ± 0,20 ^b	80,80 ± 0,07 ^a	0,84 ± 0,01 ^a		

¹Iogurte com adição de sorbato de potássio (0,03%). ²Iogurte incorporado com extrato de pólen fermentado a 0,25% da composição. ³Iogurte incorporado com extrato de pólen fermentado a 0,5% da composição. ⁴Para cada parâmetro (proteína, gordura, humidade e cinzas) foi realizada uma análise em duplicata e o valor disposto é a média aritmética dos valores obtidos em cada ensaio ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos para pH e acidez titulável encontram-se apresentados na Tabela 11.

A análise estatística revelou diferenças significativas nos valores de pH nas amostras de iogurte analisadas. Verificou-se uma redução progressiva do pH nas amostras controle (IC) e com 0,5% de extrato de pólen (I05) ao longo dos 28 dias de armazenamento, acompanhada por um aumento da acidez titulável. A maior redução de pH na amostra controle (IC), em comparação com as formulações contendo extrato de pólen, poderá estar relacionada com a ausência de compostos fenólicos e outros antioxidantes presentes no extrato, os quais podem exercer efeitos inibitórios moderados sobre a atividade metabólica das BAL, retardando ligeiramente o processo de acidificação.

No que diz respeito à acidez titulável, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras analisadas. Contudo, observou-se um aumento progressivo ao longo dos 28 dias de armazenamento, o qual pode ser atribuído à atividade contínua das bactérias ácido-láticas. O iogurte convencional (IC) apresentou pequeno aumento da acidez, de 1,16% para 1,22%. O aumento da acidez titulável ao longo do armazenamento pode ser explicada pela atividade das bactérias ácido-láticas (BAL), nomeadamente *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, que são os principais microrganismos envolvidos na fermentação do leite. Durante este processo, as BAL metabolizam a lactose, convertendo-a em ácido láctico e outros ácidos orgânicos, o que conduz ao aumento da acidez e à consequente redução do pH. Esse processo, conhecido como pós-acidificação, é comum em produtos lácteos fermentados e é influenciado por diversos fatores, como a composição da matriz, o teor de substrato disponível, a temperatura de armazenamento e a presença de compostos bioativos (como o extrato de pólen fermentado). O iogurte suplementado com 0,25% de pólen fermentado (I25) revelou um acréscimo mais acentuado, de 1,17% para 1,25%, sugerindo que o extrato de pólen influenciou a atividade microbiana. O maior incremento na acidez foi registado no iogurte com 0,5% de pólen fermentado (I05), cuja acidez aumentou de 1,14% para 1,27%, indicando que a maior concentração de pólen potenciou a fermentação. A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras pode dever-se à variabilidade biológica natural e à semelhança da atividade fermentativa inicial.

Contudo, o padrão de aumento da acidez observado, especialmente nas amostras suplementadas com pólen fermentado, sugere que este ingrediente atuou como fonte

adicional de nutrientes — incluindo açúcares, aminoácidos, vitaminas e compostos bioativos — que favoreceram a viabilidade e a atividade metabólica das BAL durante o armazenamento. Assim, a maior acidez nas amostras com 0,25% e 0,5% de pólen fermentado (I25 e I05) pode ser atribuída a uma estimulação da fermentação secundária, possivelmente associada a uma libertação prolongada de substratos fermentáveis ou à presença de pré-bióticos naturais no pólen. Estes dados indicam que o pólen fermentado não só não inibiu a fermentação, como poderá ter promovido a sua continuidade ao longo do tempo, intensificando a produção de ácidos orgânicos (Fuenmayor et al., 2014).

O estudo realizado por Santos et al., (2020), que investiga o efeito do extrato de própolis vermelha em iogurte, também observou uma redução do pH ao longo do armazenamento. No iogurte convencional, os valores de pH passaram de 4,30 no dia 0 para 4,00 no dia 28, enquanto no iogurte suplementado com extrato de própolis, a variação foi de 4,35 para 4,03 no mesmo intervalo. No entanto, contrariamente do presente estudo, que registou um aumento na acidez ao longo do tempo, Santos et al., (2020), observou uma redução na concentração de ácido láctico. No iogurte convencional, a acidez titulável reduziu-se de 1,27% para 0,83%, enquanto no iogurte com extrato de própolis ocorreu uma diminuição de 1,28% para 0,85%

Um estudo relevante é o de Caleja et al., (2016), que comparou o uso de aditivos naturais derivados de plantas com o sorbato de potássio em iogurtes, verificando que não houve mudanças significativas no pH e valor nutricional quando comparado à amostra preparada com o conservante sintético.

Os resultados obtidos sugerem que o extrato de pólen fermentado adicionados às amostras de iogurte I25 e I05 promoveu a atividade microbiana, favorecendo a síntese de ácidos orgânicos. Adicionalmente, a presença de bactérias mesófilas oriundas do pólen fermentado possivelmente contribuiu para o aumento da acidez. A adição de extrato de pólen fermentado ao iogurte influencia diretamente a microbiota presente no produto. Durante a fermentação do pólen, ocorre a multiplicação de microrganismos, especialmente bactérias ácido-láticas e mesófilas, que produzem enzimas e metabólitos secundários, como ácidos orgânicos (ex.: ácido láctico, acético e outros). Esses compostos contribuem para a redução do pH e o aumento da acidez titulável do iogurte.

Nas amostras I25 e I05, a presença do extrato fermentado provavelmente forneceu nutrientes adicionais, como aminoácidos, peptídeos e açúcares simples liberados durante a degradação da matriz do pólen. Esses nutrientes funcionam como substrato para as bactérias lácticas já presentes no iogurte (ex.: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

e *Streptococcus thermophilus*), estimulando seu crescimento e sua atividade metabólica.

Além disso, as bactérias mesófilas introduzidas com o pólen fermentado podem ter interagido sinergicamente com as culturas lácticas, intensificando a fermentação e promovendo maior produção de ácidos orgânicos. Esse efeito é benéfico para as características sensoriais, microbiológicas e funcionais do iogurte, podendo também atuar na sua conservação microbiológica (Sionek et. al, 2023). De acordo com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, a acidez titulável do iogurte deve situar-se entre 0,6% e 1,5%, expressa em gramas de ácido láctico por 100 gramas de produto.

Os resultados deste estudo indicam que as amostras de iogurte analisadas apresentaram valores de acidez titulável dentro desses limites regulamentares, assegurando a conformidade com os padrões de qualidade e segurança estabelecidos. A acidez adequada é fundamental para garantir as características sensoriais desejáveis do iogurte, como sabor e textura, além de contribuir para a estabilidade microbiológica do produto durante o seu prazo de validade.

Tabela 11 – Resultados obtidos nas análises físico-químicas das amostras de iogurte.

Amostra	Tempo (dias)	pH	Acidez Titulável
IC¹	0	4,29 ± 0,014 ^a	1,16 ± 0,04 ^a
	28	4,13 ± 0,014 ^{ab}	1,22 ± 0,11 ^a
I25²	0	4,10 ± 0,007 ^{bc}	1,17 ± 0,06 ^a
	28	4,16 ± 0,014 ^{bcd}	1,25 ± 0,00 ^a
I05³	0	4,23 ± 0,00 ^{cd}	1,14 ± 0,13 ^a
	28	4,20 ± 0,042 ^d	1,27 ± 0,07 ^a

¹Iogurte com adição de sorbato de potássio (0,03%). ² Iogurte incorporado com extrato de pólen fermentado a 0,25% da composição. ³ Iogurte incorporado com extrato de pólen fermentado a 0,5% da composição. ⁴ Para cada parâmetro (pH e acidez titulável) foi realizada uma análise em duplicata e o valor disposto é a média aritmética dos valores obtidos em cada ensaio ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5. Análise sensorial das amostras de iogurtes

4.5.1. Sexo e Faixa Etária

As Figuras 15 e 16 ilustram, respetivamente, a distribuição de sexo e faixa etária dos 25 participantes na análise sensorial das amostras de iogurte. A composição demográfica dos provadores foi a seguinte: 56% identificaram-se como do sexo masculino e 44% como do sexo feminino. A predominância de participantes na faixa etária de 18 a 34 anos é comum em estudos de análise sensorial, uma vez que esta faixa representa uma parcela significativa dos consumidores deste produto lácteo, conforme observado em estudos similares. A diversidade de idade e sexo entre os provadores contribui para uma avaliação sensorial mais abrangente, refletindo diferentes preferências e percepções sensoriais. É importante salientar que a seleção de provadores não treinados, mas consumidores habituais do produto, é uma prática comum em análises sensoriais afetivas, visando obter respostas que reflitam a aceitação do produto pelo público-alvo. A utilização de escalas hedônicas, como a de 9 pontos, permite quantificar o grau de

aceitação dos atributos sensoriais avaliados, como sabor, aroma, textura e aparência (de Oliveira Magalhães & de Melo Cazal, 2021). Neste contexto, podemos referir que a composição do painel sensorial foi adequada para os objetivos do estudo, proporcionando dados relevantes sobre a aceitação das amostras de iogurte pelas diferentes faixas etárias e sexos dos consumidores.

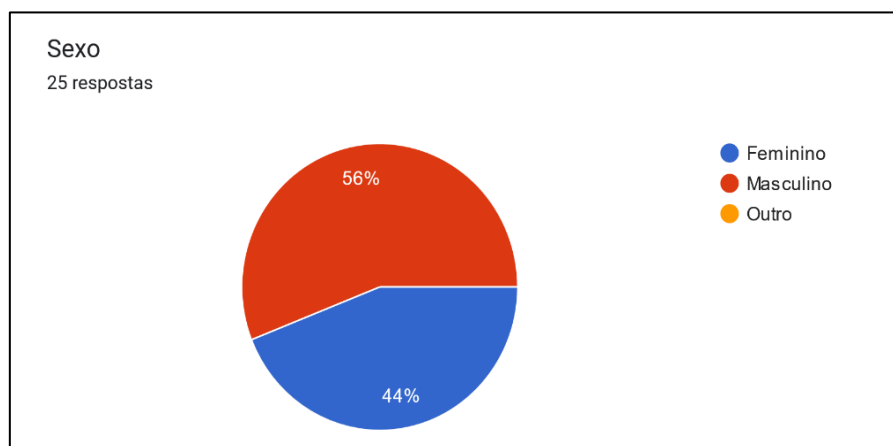


Figura 15 – Resultado obtidos para o sexo dos provadores.

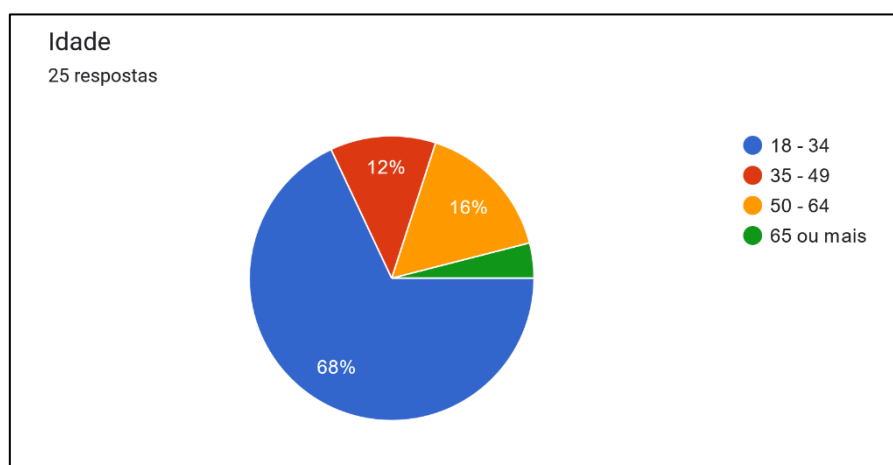


Figura 16 – Resultado obtidos para a faixa etária dos provadores.

4.5.2. Cor

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam os resultados obtidos na análise sensorial relativos ao parâmetro cor. Verifica-se que a amostra 827 evidenciou boa aceitação neste atributo, tendo 52% dos participantes atribuindo a classificação 5 (gostei muito) e 32% a classificação 4 (gostei moderadamente). Apenas 16% atribuíram a nota 3 (nem gostei, nem desgostei), não se registrando avaliações negativas.

A amostra 394 apresentou resultados semelhantes: 52% das respostas receberam nota 5, 36% nota 4 e 12% foram neutras. Tal como na amostra 827, não se registaram

classificações negativas.

Por outro lado, a amostra 561 apresentou menor aceitação no que respeita ao parâmetro cor. Apenas 40% dos participantes atribuíram classificação 5 (gostei muito), 36% atribuíram a nota 4 (gostei moderadamente) e 16% indicaram a nota 3 (nem gostei, nem desgostei). Diferente das restantes amostras, esta recebeu 8% de avaliações negativas correspondentes à nota 2 (não gostei). Esse resultado sugere que a menor aceitação poderá estar associada à maior percentagem de extrato de pólen fermentado (0,5%) na formulação, a qual originou uma coloração mais escura, influenciando possivelmente de forma negativa percepção visual dos avaliadores.

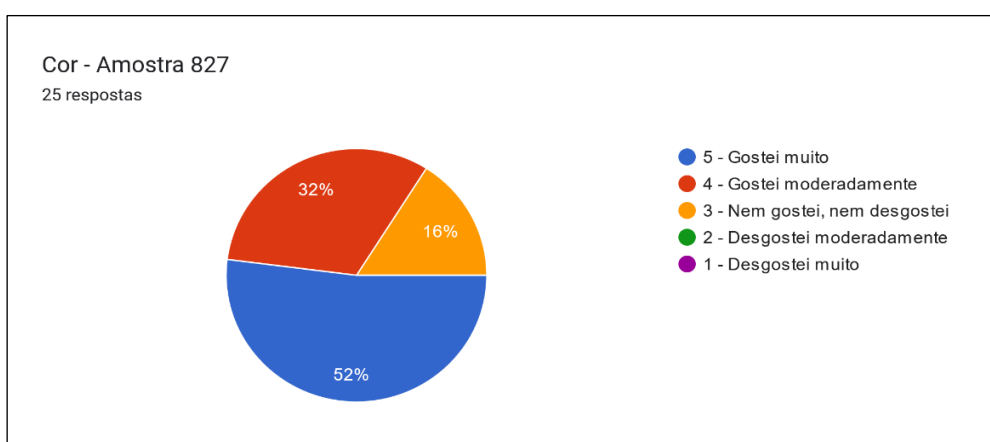


Figura 17 – Resultado para a cor na amostra 827.

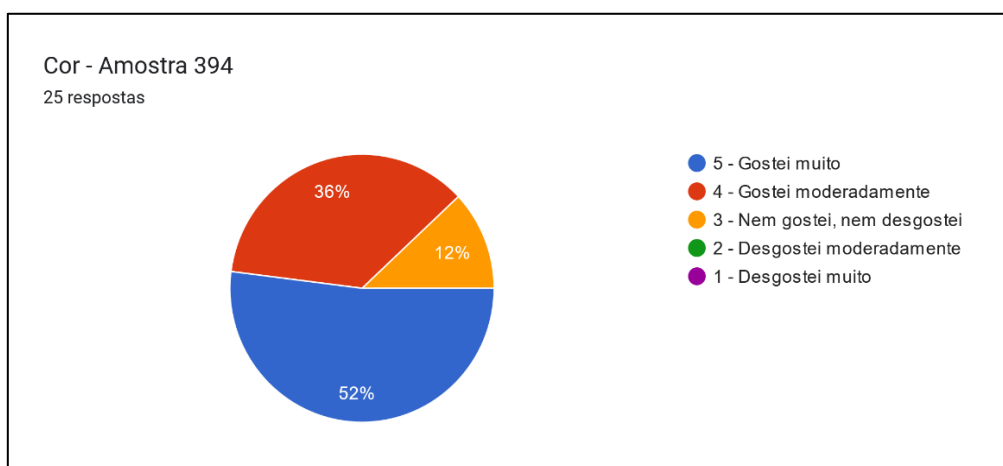


Figura 18 – Resultado para a cor na amostra 394.

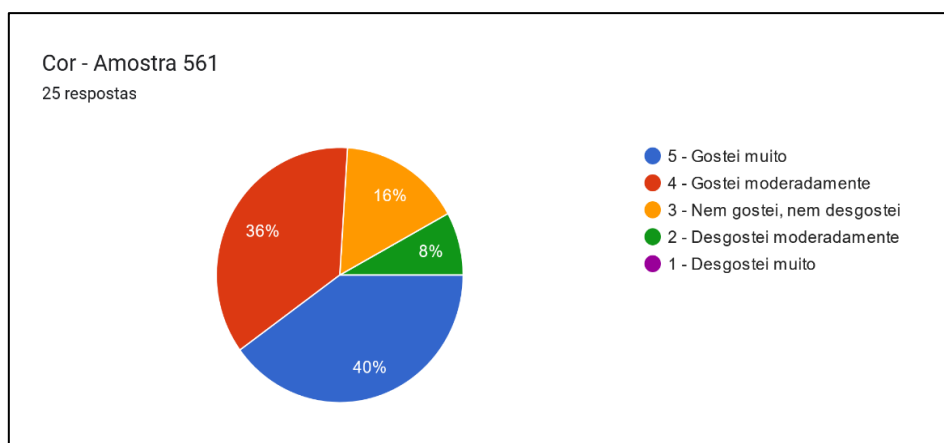


Figura 19 – Resultado para a cor na amostra 561.

4.5.3. Aroma

Nas Figuras 20, 21 e 22 estão sumariados os resultados obtidos na análise sensorial referente ao parâmetro aroma.

A amostra 827 destacou-se pelos resultados mais favoráveis, sendo que 48% dos participantes atribuíram nota 5 (gostei muito) e 44% nota 4 (gostei moderadamente), totalizando 92% de avaliações positivas. Apenas 4% dos inquiridos atribuíram a nota 3 (nem gostei, nem desgostei), não se registou quaisquer avaliações negativas. A amostra 394 apresentou um desempenho semelhante, com 52% das respostas correspondendo à classificação 5 e 32% à nota 4, totalizando 84% de aprovação. No entanto, verificou-se um aumento na percentagem de respostas neutras (16%) em comparação com a amostra 827. Nenhuma das duas amostras recebeu avaliações negativas.

A amostra 561 evidenciou uma menor aceitação no parâmetro aroma, com apenas 40% dos participantes a atribuírem nota 5 (gostei muito) e 28% a classificação 4 (gostei moderadamente). Observou-se uma percentagem mais elevada de respostas neutras (28%), e 4% de avaliações negativas (não gostei). Estes resultados sugerem que a formulação desta amostra poderá ter influenciado negativamente o seu perfil aromático, comprometendo a sua aceitação sensorial.

Deste modo, a amostra 827 foi a mais bem aceite no que respeita ao aroma, seguida pela amostra 394, enquanto a amostra 561 registou um maior número de respostas intermédias e negativas.

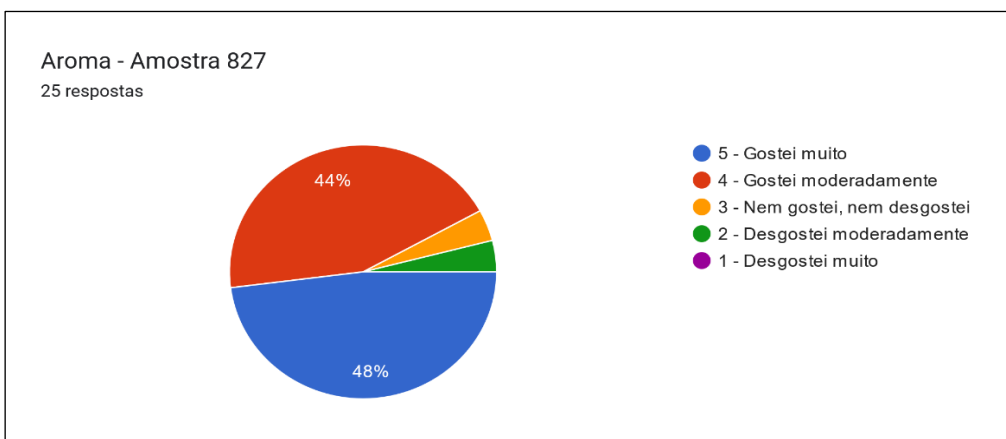


Figura 20 – Resultado para o aroma na amostra 827.

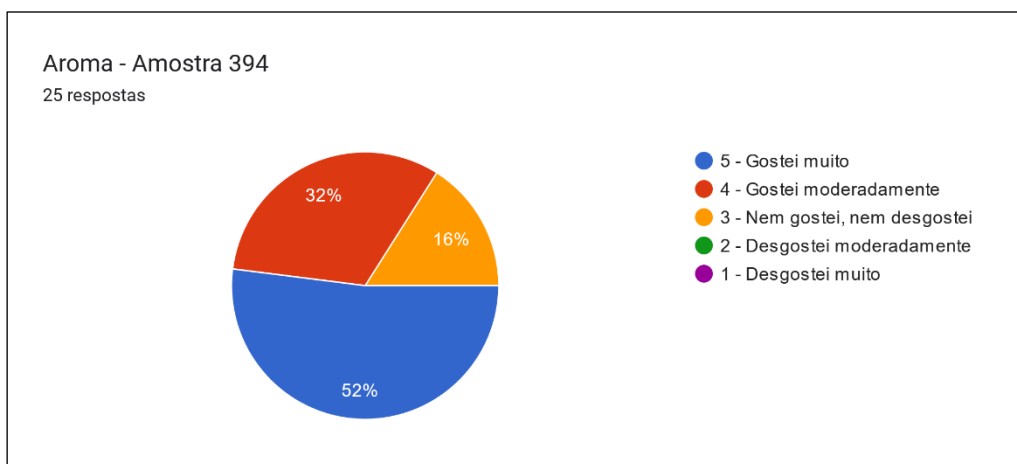


Figura 21 – Resultado para o aroma na amostra 394.

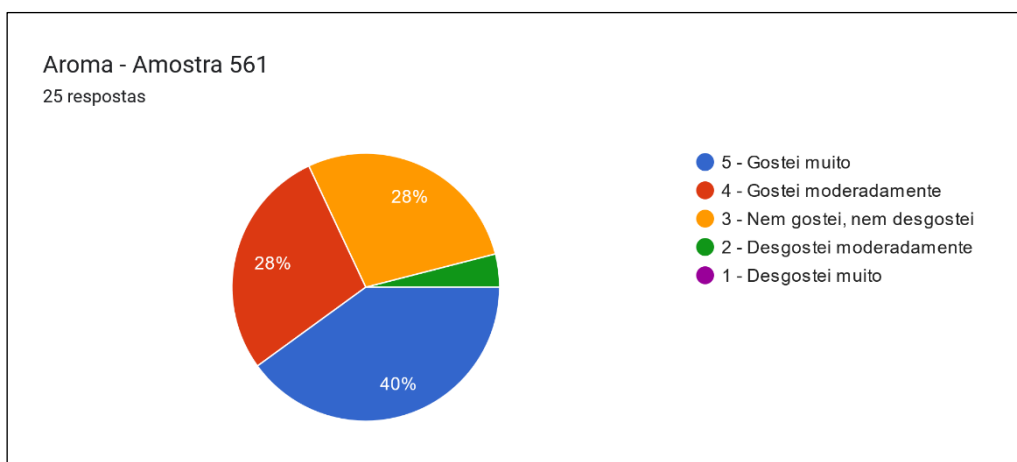


Figura 22 – Resultado para o aroma na amostra 561.

4.5.4. Sabor

Os resultados obtidos na análise sensorial relativa ao parâmetro sabor estão representados nas Figuras 23, 24 e 25..

A amostra 394 registou a maior aceitação sensorial para o sabor, com 56% dos participantes a atribuir a classificação 5 e 32% a nota 4, totalizando 88% de avaliações

positivas. Nenhum participante atribuiu classificações negativas. Estes resultados sugerem a concentração extrato de pólen fermentado adicionada foi adequada, não comprometendo as características organoléticas do produto. A boa aceitação pode estar associada a um equilíbrio entre o sabor característico do pólen e a matriz alimentar utilizada. A amostra 827 revelou igualmente um elevado grau de aprovação, com 48% das classificações a corresponderem à nota 5 e 48% à nota 4, resultando um total de 96% de aceitação, ainda que sem um predomínio expressivo da nota máxima. Esta formulação apesar de ter apresentado um nível ligeiramente superior de aceitação (96%), revelou uma distribuição mais equilibrada entre as classificações 4 e 5. Este comportamento indica que, embora o produto tenha sido bem recebido, não se destacou pela excelência no sabor.

A amostra 561 foi a que teve menor aceitação, com apenas 24% dos participantes a atribuir a classificação 5 e 36% a nota 4, totalizando 60% de aprovação.

Adicionalmente, 24% atribuíram a nota 3 e 16% conferiram classificações negativas. Estes resultados sugerem que o maior teor de extrato de pólen fermentado pode ter influenciado negativamente o perfil gustativo. Este comportamento pode estar relacionado com um teor mais elevado de extrato de pólen fermentado, que, em concentrações excessivas, pode intensificar compostos fenólicos ou metabólitos secundários com propriedades gustativas indesejáveis, como amargor, sabor terroso ou notas ácidas. Além disso, o processo de fermentação pode gerar subprodutos que alteram negativamente o perfil organolético (Lima et al., 2021). Assim, a amostra 394 revelou a melhor aceitação em termos de sabor, seguida de perto pela 827, enquanto a 561 obteve a menor aprovação a nível deste parâmetro.

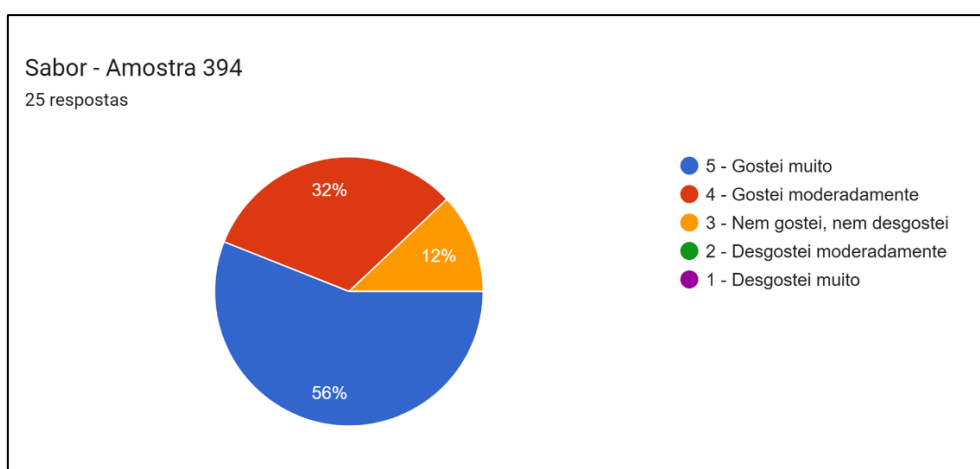


Figura 23 – Resultado para o sabor na amostra 394.

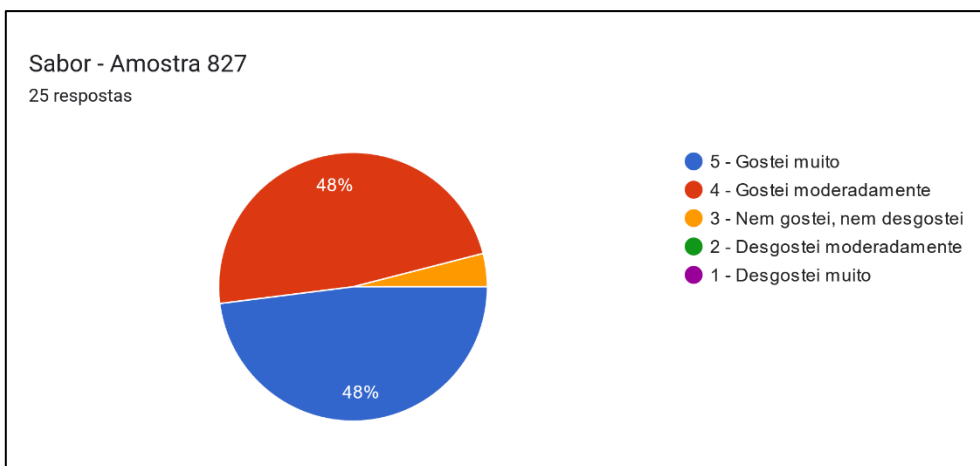


Figura 24 – Resultado para o sabor na amostra 827.

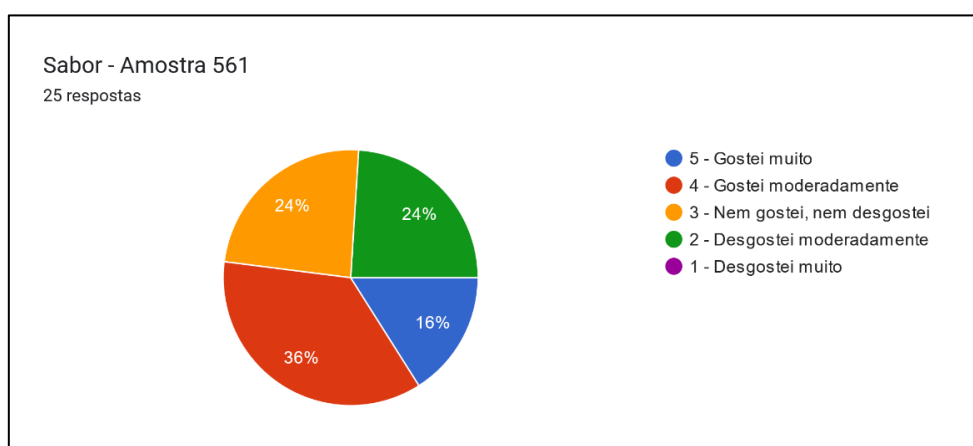


Figura 25 – Resultado para o sabor na amostra 561.

4.5.5. Textura

Nas Figuras 26, 27 e 28 estão representados os resultados obtidos na análise sensorial relativa ao parâmetro textura.

A amostra 394 revelou o maior índice de aceitação para este parâmetro, com 72% dos participantes a atribuir a classificação 5 e 16% a nota 4, totalizando 88% de avaliações positivas. Apenas 8% dos inquilinos atribuíram nota 3, e 8% deram classificações negativa, o que indica uma ligeira divergência de opinião entre os avaliadores, embora com predominância de percepções favoráveis.

A amostra 827 evidenciou igualmente um elevado grau de aceitação, com 44% das classificações atribuídas à nota 5 e outros 44% à nota 4, Apenas 8% dos participantes atribuíram a nota 3, não tendo sido registadas classificações negativas.

Por sua vez, a amostra 561 foi a menos aceite no que respeita ao parâmetro textura, com 48% das respostas correspondentes à nota 5 e 32% à nota 4, totalizando 80% de

aprovação. Adicionalmente, 16% dos participantes atribuíram a nota 3 e 4% registaram classificações negativas. Estes resultados sugerem que a composição desta amostra poderá ter influenciado negativamente a perceção sensorial da textura, possivelmente devido a alterações na consistência, cremosidade ou presença de partículas indesejáveis.

Globalmente, a amostra 394 destacou-se pelo melhor desempenho ao nível da textura, enquanto a amostra 561 registou o menor grau de aceitação neste parâmetro.

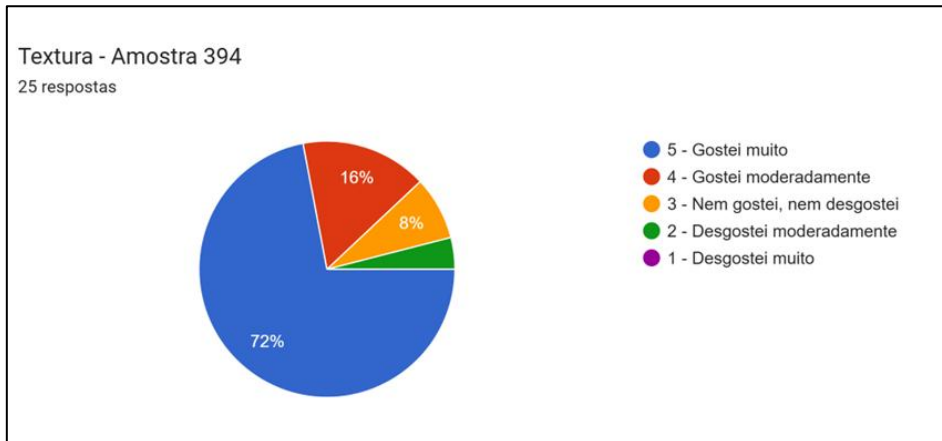


Figura 26 – Resultado para a textura na amostra 394

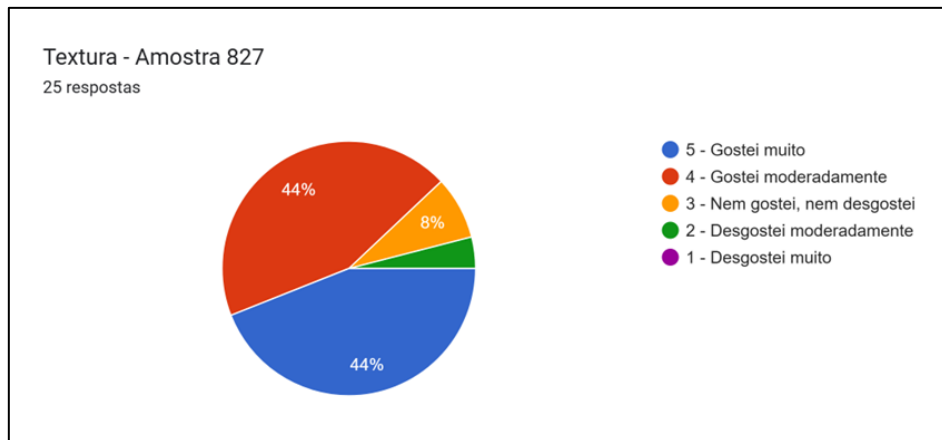


Figura 27 – Resultado para a textura na amostra 827.

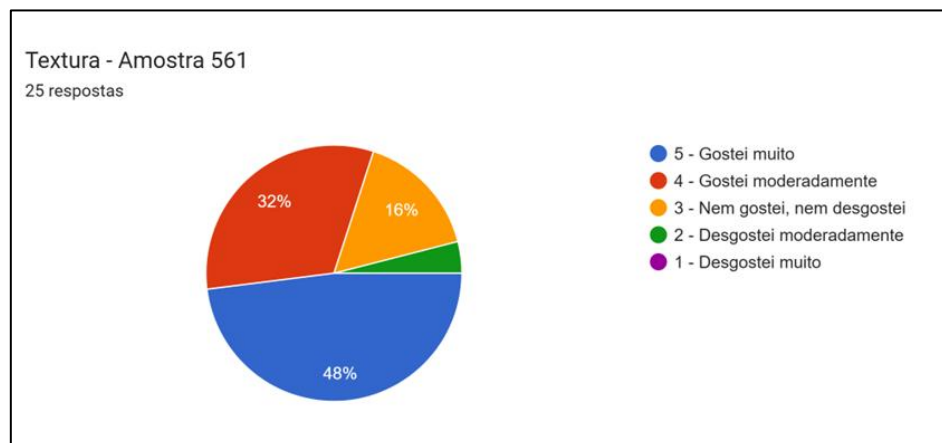


Figura 28 – Resultado para a textura na amostra 561.

4.5.6. Impressão Global

As Figuras 29, 30 e 31 mostram os resultados obtidos na análise sensorial para o parâmetro textura.

A amostra 394 recebeu a avaliação global mais elevada, com 56% dos participantes atribuindo nota 5 e 36% nota 4, totalizando 92% de aceitação. À amostra 827 foi atribuída uma classificação semelhante, com 52% de nota 5 e 40% de nota 4, também atingindo 92% de aprovação. No entanto, a menor proporção de notas máximas (5) coloca esta amostra levemente atrás da 394.

Em contrapartida, à amostra 561 foram atribuídas apenas 24% de notas 5 e 32% de notas 4, resultando em 56% de aceitação. Além disso, 32% dos participantes avaliaram com nota 3 e 12% atribuíram notas negativas (4% com nota 2 e 8% com nota 1). Esses resultados refletem uma impressão global menos favorável, possivelmente condicionada pelo sabor e textura.

Assim, as amostras 394 e 827 foram as mais bem aceitas, enquanto a amostra 561 apresentou a menor aprovação, destacando-se negativamente na avaliação global.

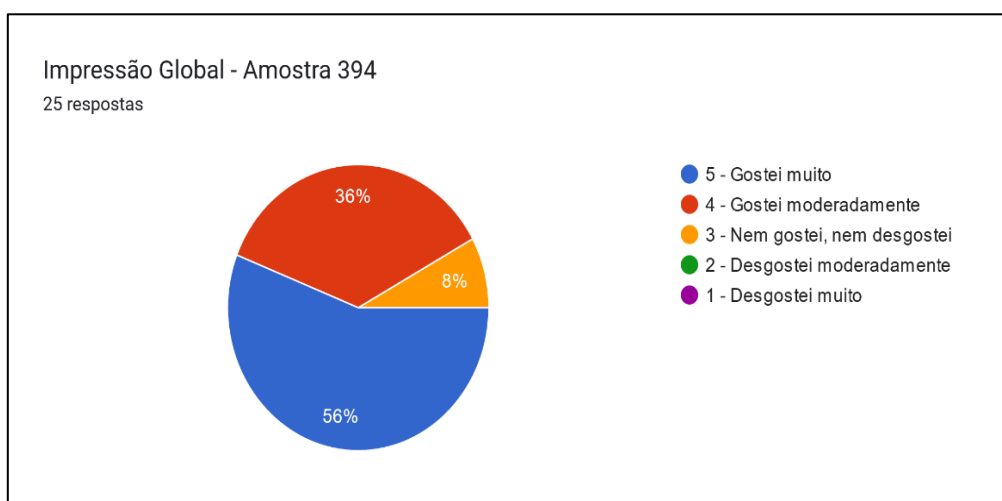


Figura 29 – Resultado para impressão global na amostra 394.

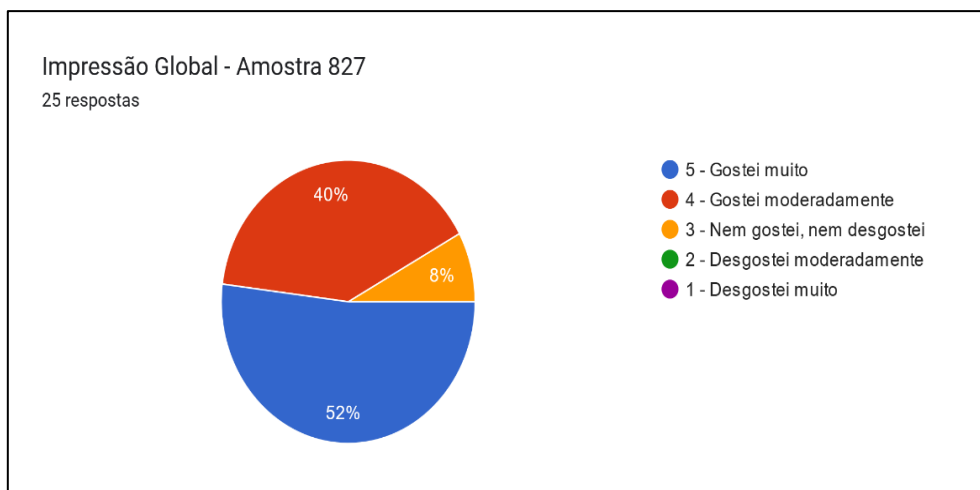


Figura 30 – Resultado para impressão global na amostra 827.

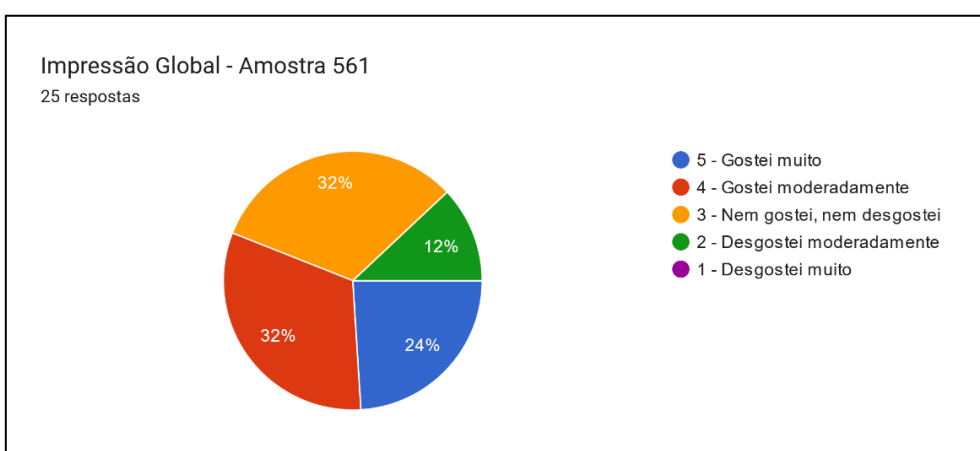


Figura 31 – Resultado para impressão global na amostra 561.

4.5.7. Análise estatística dos parâmetros sensoriais

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros sensoriais: cor, aroma, sabor, textura e impressão global. Observa-se que as amostras 827 e 394 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros avaliados, indicando uma percepção sensorial equilibrada em todos os atributos. Já a amostra 561 apresentou diferenças significativas nos parâmetros de sabor e impressão global, os quais foram avaliados de forma inferior em relação às demais amostras. Para o parâmetro cor, as médias obtidas foram de 4,44, 4,48 e 4,08 para as amostras 827, 394 e 561, respetivamente. No atributo aroma, os valores foram de 4,48, 4,48 e 4,08, na mesma ordem. Para o sabor, os resultados observados foram de 4,48, 4,40 e 3,60, sendo que a amostra 561 apresentou valor significativamente inferior. Quanto à textura, os valores obtidos foram de 4,40, 4,60 e 4,40. Por fim, na impressão global, as médias foram de 4,48, 4,48 e 3,88, para as amostras 827, 394 e 561, respetivamente, com a amostra 561

apresentando valor significativamente inferior. Esses resultados corroboram a análise descritiva, sugerindo que a maior concentração de extrato de pólen fermentado (0,5%) pode ter afetado negativamente o perfil sensorial do produto, especialmente no que diz respeito ao sabor e à aceitação geral.

De forma geral, as amostras 827 e 394 apresentaram melhor aceitação sensorial em comparação à amostra 561. Esses dados reforçam que a adição de 0,25% de extrato de pólen fermentado (amostra 827) é sensorialmente viável, apresentando aceitação comparável ao iogurte convencional. Em contrapartida, a formulação com 0,5% de extrato de pólen fermentado (amostra 561) menor aceitação por parte dos provadores, o que pode representar um fator limitante para a sua aplicação à escala industrial.

Tabela 12 – Resultados da análise sensorial das amostras de iogurte.

Parâmetro	Amostra 827	Amostra 394	Amostra 561
Cor	4,44 ± 0,82 ^a	4,48 ± 0,87 ^a	4,08 ± 1,04 ^a
Aroma	4,48 ± 0,77 ^a	4,48 ± 0,87 ^a	4,08 ± 1,04 ^a
Sabor	4,48 ± 0,65 ^a	4,40 ± 0,82 ^a	3,60 ± 1,12 ^b
Textura	4,40 ± 0,87 ^a	4,60 ± 0,91 ^a	4,40 ± 0,91 ^a
Impressão Global	4,48 ± 0,71 ^a	4,48 ± 0,82 ^a	3,88 ± 1,05 ^b

Para cada parâmetro foi realizada uma análise em duplicata e o valor disposto é a média aritmética dos valores obtidos em cada ensaio ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de pólen fermentado na conservação e na bioatividade do iogurte, avaliando o seu potencial como aditivo alimentar natural em substituição ao conservante sintético sorbato de potássio.

Os resultados obtidos permitiram tecer as seguintes considerações finais:

- A fermentação do pólen com *Saccharomyces cerevisiae* resultou num aumento dos teores de fenóis e flavonoides totais, bem como atividade antioxidante, em comparação com o pólen in natura.
- O ensaio n.º 15 evidenciou as condições fermentativas mais favoráveis, resultando num extrato de pólen com características funcionais superiores. .
- O extrato de pólen fermentado demonstrou eficácia antimicrobiana relevante, inibindo o crescimento de microrganismos contaminantes e mantendo contagens elevadas de bactérias ácido-lácticas ($>10^7$ UFC/mL) ao longo de 28 dias em armazenamento refrigerado.
- O efeito conservante do extrato foi comparável ao do sorbato de potássio, um aditivo sintético amplamente utilizado na indústria alimentar.
- A incorporação do extrato, particularmente na concentração de 0,5%, conferiu maior estabilidade aos compostos fenólicos e à atividade antioxidante durante o período de armazenamento.
- As análises de perfil de açúcares por HPLC Cromatografia líquida de alto desempenho (High Performance Liquid Chromatography), indicaram a presença de compostos bioativos resultantes do processo fermentativo.
- A incorporação de 0,25% de extrato de pólen fermentado apresentou elevada aceitação sensorial (92%), equivalente ao iogurte contendo sorbato de potássio.
- A adição de 0,5% reduziu a aceitação global (56%), devido a alterações de cor, aroma e sabor.
- A adição do extrato não afetou significativamente a composição físico-química e nutricional dos iogurtes, que se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos para produtos lácteos fermentados.
- Estes resultados obtidos sustentam que o pólen fermentado constitui uma alternativa natural e promissora aos conservantes sintéticos, conciliando a

eficácia da conservação microbiológica com a valorização funcional e o enquadramento nas tendências de produtos *clean label*.

Perspetivas Futuras:

- Recomenda-se aprofundar a investigação em:
 - Outras concentrações do extrato que conciliem funcionalidade e aceitação sensorial.
 - Aplicação em diferentes matrizes alimentares.
 - Avaliação dos potenciais benefícios para a saúde humana associados ao consumo regular de iogurte enriquecido com pólen fermentado.

CAPÍTULO 6

6. REFERÊNCIAS

Adams, M. R.; Moss, M. O. *Food Microbiology*. 3. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008.

Ahmad I, Narsa AC, Ramadhani MR, Zamruddin NM, Iswahyudi I, Hajrah H, Indriyanti N, Arifuddin M, Siska S, Supandi S, Ambarwati NSS. Optimization of microwave-assisted extraction on polyphenol metabolite from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) urb. bulbs using response surface methodology. *J Adv Pharm Technol Res*. 2023 Apr-Jun;14(2):113-118. doi: 10.4103/japtr.japtr_613_22. Epub 2023 Apr 13. PMID: 37255875; PMCID: PMC10226706.

Akhir, R. A. M., Bakar, M. F. A., & Sanusi, S. B. (2017). Antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee bread and propolis extracts. In: *AIP conference proceedings* (Vol. 1891, No. 1). AIP Publishing.

Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152.

Alexandre H, Charpentier C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1998;20(1):20–27. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900482>

Alvarenga, M. B. (1995). *Manual de produção de iogurtes*. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Fortaleza, 23 pp.

Antônio, A. P., Geraldo, J. J. P., Eyuba, A. B. N., da Silva Alexandre, A., Neto, J. F., & Carlos, A. W. M. (2023). Utilização de beterraba (*Beta vulgaris* L.) em pó como corante natural em iogurte caseiro. *RECIMA21*, 4(9), e493886-e493886.

AOAC International. (1994). Official Method 991.20: Nitrogen (Total) in milk — Kjeldahl methods. In *Official methods of analysis of AOAC International* (16th ed.). AOAC International.

Arruda, Vanilda Aparecida Soares de. *Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, capacidade antioxidante e origem botânica* [doi:10.11606/T.9.2013.tde-22062015-172352]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013. Tese (Doutorado em Bromatologia).

Associação Portuguesa dos Nutricionistas (2013). *O iogurte – para saber mais*. APN, Porto, 55 pp.

Ayivi, R. D., & Ibrahim, S. A. (2022). Lactic acid bacteria: An essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(11), 7008-7025.

- Ban, Q., Liu, Z., Yu, C., Sun, X., Jiang, Y., Cheng, J., & Guo, M. (2020). Physicochemical, rheological, microstructural, and antioxidant properties of yogurt using monk fruit extract as a sweetener. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 10006-10014.
- Bárbara, M. S., Machado, C. S., Sodr , G. D. S., Dias, L. G., Estevinho, L. M., & De Carvalho, C. A. L. (2015). Microbiological assessment, nutritional characterization and phenolic compounds of bee pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. *Molecules*, 20(7), 12525-12544. <https://doi.org/10.3390/molecules200712525>.
- Barbosa, D. B., Crupinski, E. F., Silveira, R. N., & Limberger, D. C. H. (2017). As abelhas e seu serviço ecossistêmico de poliniza o. *Revista Eletr nica Científica da UERGS*, 3(4), 694-703.
- Barros, J. R., Soares, F. M., de Santana Silva, E., & Constant, P. B. L. (2021). Conserva o de alimentos pelo uso de aditivos: Uma Revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 37(2).
- Biland i , N., Sedak, M.,  oki , M., Bo i ,  ., & Vrbi , A. (2015). Content of macro-and microelements and evaluation of the intake of different dairy products consumed in Croatia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 143-147.
- Bogdanov, S. (2001). Composition, Health, Medicine: A Review. *Apiacta*, 2(5), 1-41.
- Borges, P. C. S. (2008). Otimiza o dinâmica da fermenta o alcoólica no processo embatelada alimentada. (Disserta o de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia), Repositório da UFU.
- Borges, T., Ferreira, I., Pinho, O., Trindade, E., Pissarra, S., & Amil, J. (2010). Quanta lactose há no meu iogurte. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 41(2), 75-78.
- Bourgeois, C. M., & Larpent, J. P. (1995). *Microbiología alimentaria: fermentaciones alimentarias*. Vol. 2. Editora Acribia, Zaragoza S.A., 1995, 366 pp.
- BRASIL (1997). Portaria n  540, de 27 de outubro de 1997. Regulamento técnico - aditivos Alimentares. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
- BRASIL (2007). Instru o Normativa n  46, de 23 de outubro de 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, Brasília.
- Caldas, F. R., Augusto Filho, F., Facundo, H. T., Alves, R. F., Santos, F. D. A. D., Silva, G. R. D., ... & Silva, T. M. (2019). Composi o química, atividade antiradicalar e antimicrobiana do pólen apícola de Fabaceae. *Química Nova*, 42(1), 49-56.
- Caleja C, Barros L, Antonio AL, Carocho M, Oliveira MB, Ferreira IC. Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between

natural and synthetic additives. *Food Chem.* 2016 Nov 1;210:262-8. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.114. Epub 2016 Apr 26. PMID: 27211646.

Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., & Pardo, I. (2020). Phenolic profile and antioxidant activity of yogurt supplemented with fermented bee pollen. *LWT - Food Science and Technology*, 126, 109332.

Campos, M. G. R.; Webby, R. F.; Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Da Cunha, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 3, p. 742–745, 2003.

Carneiro, A. L. B., Gomes, A. A., Alves da Silva, L., Alves, L. B., Cardoso da Silva, E., da Silva Pinto, A. C., ... & Naiff, M. D. F. (2019). Antimicrobial and larvicidal activities of stingless bee pollen from Maués, Amazonas, Brazil. *Bee World*, 96(4), 98-103.

Cosme-Alonso, V., Martínez-Lifshitz, M. E., & Mani-López, E. (2023). Yogurt supplemented with bee pollen: Physicochemical and sensory properties, and in vitro pollen digestibility. *J. Agric. Food Sci. Biotechnol.* 1(3), 224-231.

Costa, L. V., Lopes, M. T. G., Lopes, R., & Alves, S. R. M. (2008). Polinização e fixação de frutos em *Capsicum chinense* Jacq. *Acta amazonica*, 38(esp.), 361-364.

Costa-Maia, F. M., Lourenço, D. A. L., & Toledo, V. A. A. (2010). Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. *Sistemas de produção agropecuária*, 45-67.

Dairy Industries International (2021). Yogurt set to break the US\$100bn mark. <https://www.dairyindustries.com/news/39027/yogurt-set-to-break-the-us100bn-mark/>

Dantas, R. M., de Almeida, C. M., dos Santos Rodrigues, J. B., & Rodrigues, N. P. A. (2021). Avaliação da rotulagem, composição nutricional, ingredientes e aditivos alimentares em iogurtes do tipo grego comercializados em supermercados da cidade de João Pessoa. *Research, Society and Development*, 10(9), e38010918280-e38010918280.

de Oliveira Magalhães, M., & de Melo Casal, M. (2021). Análise sensorial e influência da marca na aceitação de iogurte. *Research, Society and Development*, 10(5), e55410515083-e55410515083.

Del Nobile, M.A.; D'amato, D.; Altieri, C.; Corbo, M.R.; Sinigaglia, M. Modeling the yeast Growth-Cycle in a model wine system. *Journal of Food Science*, v. 68, n.6, p. 2080–2085, 2003.

Dettker, G. A., & dos Santos, R. P. (2011). Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(S1), 48-74.

Estevinho, L. M.; Rodrigues, S., Pereira, A. P., & Feás, X. (2012). Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 429-435.

Fani, M. Ácido sórbico e sorbatos (2021). *Food Ingredients Brasil*, 23(54), 36-42.

Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2016). O Mercado de Bioaditivos para a Indústria de Alimentos. *Revista Processos Químicos*, 10(19), 25-38.

Ferreira, L. M. M, Ferreira, A. M., Benevides, C. M. J., Melo, D., Costa, a. S. G., Faia, a. M. & oliveira, m. B. P. P., 2019. Effect of Controlled Microbial Fermentation on Nutritional and Functional Characteristics of Cowpea Bean Flours. *Journal Foods*. 8, 530; doi:10.3390.

Fisberg, M., & Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition reviews*, 73(1), 4-7.

Fleet GH. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Apr;18(2):170-5. doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.010. Epub 2007 Feb 1. PMID: 17275276.

Freitas, L., Sousa-Dias, M., Paula, V. B., Dias, L. G., & Estevinho, L. M. (2024). Fermented Grapevine Leaves: Potential Preserving Agent in Yogurt. *Foods*, 13(13), 2053. <https://doi.org/10.3390/foods13132053>

Fuenmayor B, C., Zuluaga D, C., Díaz M, C., Quicazán de C, M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Revista MVZ Córdoba*, 19(1), 4003-4014.

Ghosh, T., & Gangopadhyay, H. (2020). Impact of thermal processing on phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 801–821.
Guler, Z., & Sanal, H. (2009). Effect of total solids standardization using different methods on mineral content of yoghurt. *MLjekarstvo*, 59(4), 256-263.

Hervatin, Heloisa Litholdo. Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas. Disponível em: <https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP-30_3b29ac94b26321fc193ddb8b9b0db2d5>. Acesso em: 23 out. 2024.

Honorato, T. C., da Silva, E. B., do Nascimento, K. D. O., & Pires, T. (2013). Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 8(5), 1-11.

Horsey, I. *The Chemistry and Biology of Winemaking*. RCS Publishing, 2007. 436 p.

International Organization for Standardization. (2008). ISO 21527-2:2008. 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.

International Organization for Standardization. (2003). ISO 15213:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.

International Organization for Standardization. (2004). ISO 7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 degrees C. Geneva, Switzerland: ISO.

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), (2020). Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia. INSA. Lisboa. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>

Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005) Modern Food Microbiology. 7th Edition, Springer Science and Business Media, Inc., New York, 63-90, 101-125.

Jaques, A. M. C. (2020). A Influência dos aditivos alimentares no desenvolvimento de alergias em crianças. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(4), 10185-10195.

Jesus, J. H. F., Szilágyi, I. M., Regdon Jr, G., & Cavalheiro, E. T. G. (2021). Thermal behavior of food preservative sorbic acid and its derivatives. *Food Chemistry*, 337, 127770.

Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. (1995). Codex alimentarius: general standard for food additives. Rome, World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Kegele, C., Valladares, L. D. S., Silva, J., Alonso, B., & Ribeiro, J. (2022). Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas como bioconservantes: revisão de literatura. In: Medeiros, J. A. de; Niro, C. M. (org.). *Produção animal e vegetal: inovações e atualidades*. Vol. 2. Agron Food Academy, Jardim do Seridó, pp. 575-585.

Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71(esp.), 170-180.

Lachno, A. S., Dutra, R., Severo, J., dos Santos Oliveira, M., & de Oliveira, L. R. C. (2019). Bioaditivos e aditivos naturais em alimentos: Corantes, antioxidantes e aromatizantes. *Boletim Técnico-Científico*, 5(2), 77-93.

Latimer, G. W., Jr. (Ed.). (2023). AOAC Official Method 2005.03: Detection and confirmed quantitation of coliforms and *E. coli* in foods: SimPlate Coliform and *E. coli* Color Indicator. In *Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL* (22nd ed.). AOAC INTERNATIONAL. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.2193>

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-

78.

Lima, C. M. et al., Propolis extracts in fermented dairy products: technological, functional and sensory implications. *LWT - Food Science and Technology*, v. 140, art. 110812, 2021.

Lopes, A. J. O., Vasconcelos, C. C., Pereira, F. A. N., Silva, R. H. M., Queiroz, P. F. D. S., Fernandes, C. V., ... & Ribeiro, M. N. D. S. (2019). Anti-Inflammatory and antinociceptive activity of pollen extract collected by stingless bee *Melipona fasciculata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4512-4532.

Lopes, D. (2024). O que é fermentação? Brasil Escola. <https://brasilescuela.uol.com.br/o-que-e/quimica/o-que-e-fermentacao.htm>.

Lopes, M. D. R., Barreto, A., Pereira, F. D. M., Souza, B. D. A., Franco, L., & Silva, S. (2022). Pólen apícola: características da produção e da qualidade. Embrapa, Teresina. 65 p.

Luz, K. S., Lima, T. L. S., Souza, J. T., Abrantes, M. R., de Oliveira, P. V. C., da Silva, É. L. B., ... & da Silva, J. B. A. (2022). Caracterização físico-química e microbiológica do saburá da abelha Jandaíra (*Melipona subnitida*). *Research, Society and Development*, 11(7), e52011730250-e52011730250.

Marques, F. P. P., Spinosa, W., Fernandes, K. F., Castro, C. F. D. S., & Caliari, M. (2010). Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. *Food Science and Technology*, 30, 119-126.

Martin, F., Cachon, R., Pernin, K., De Coninck, J., Gervais, P., Guichard, E., & Cayot, N. (2011). Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 614-622.

Martin, J. G. P., & de Dea Lindner, J. (2022). *Microbiologia de alimentos fermentados*. Bluche, São Paulor, 346 pp.

Mordor Intelligence (2023). Tamanho do mercado de iogurte e análise de participação – tendência e previsões de crescimento até 2029. www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/yogurt-market

Neves, L. C., Alencar, S. M. D., & Carpes, S. T. (2008). Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. In *Book of abstracts*.

Nicolai, L., & Junior, P. R. S. R. (2012). Avaliação microbiológica de pólen apícola (*Apis mellifera*). *Revista Científic@ Universitas*, 3(2), 1-2.

NP 4405:2002 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30 °C.

NP 4400-1:2002 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de *Estafilococos coagulase positiva* (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte1:

Técnica com confirmação de colónias (método corrente).

Oliveira, C. R., Sousa, M. A., & Pereira, J. L. (2020). Efeitos de extractos vegetais na estabilidade lipídica de produtos lácteos fermentados. *Revista Portuguesa de Ciências dos Alimentos*, 26(3), 145–152.

Oliveira, J., Mariath, J. E. D. A., & Bueno, D. (2001). Grãos de pólen anômalos no clone CP76 de *Anacardium occidentale* L.(Anacardiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 24, 425-433.

Olmos, A. R., Nacchio, B. L., Garro, O. A., & Garro, M. S. (2023). Efecto de adición de azúcares y presencia de oxígeno sobre el metabolismo de bacterias lácticas: soja y medio de cultivo. *Ciencia Interior-Revista de Ciencias Básicas y Aplicadas*, 1(1), 14-14.

Pagno, C. H., Souza, L. F., Flores, S. H., & Jong, E. V. D. (2014). Desenvolvimento de espessante alimentar com valor nutricional agregado, destinado ao manejo da disfagia. *Ciência Rural*, 44(esp.), 710-716.

Paula, M. C. D. (2014). Avaliação do risco da ocorrência de resistência a antibióticos e/ou bacteremia causada por bactérias ácido lácticas: uma revisão sistemática (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro). Repositório da UNIRIO. www.repositorio-bc.unirio.br:8080/xmLui/bitstream/handle/unirio/11718/Dissertacao%20Mariana.pdf?sequence=1

Pereira, D. A., Vieira, R. D. C. M., & Gimenez, A. Z. (2020c). Fatores que afetam a fermentação alcoólica. *Ciência & Tecnologia*, 12(1), 44-55.

Pereira, J. M. G., Formigoni, M., Viell, F. L. G., Pante, G. C., Bona, E., & Vieira, A. M. S. (2020b). Aditivos alimentares naturais emergentes: uma revisão. In: Nogueira, W. V. (Ed.). *Realidades e Perspectivas em Ciência dos Alimentos*. Pantanal Editora, Nova Xavantina, Brasil, pp. 46-84.

Pereira, M. T., dos Santos, J. S., & de Santana, E. H. W. (2020a). Importância das bactérias ácido lácticas e não starter (NSLAB) na tecnologia de produção dos derivados lácteos. *Ensaio de Ciências Biológicas Agrárias e da Saúde*, 24(4), 348-352.

Pereira, W. L., Batista, A. L. G., Coelho, B. A., & Oliveira, L. B. D. S. (2019). Estabilizante alimentar. *Revista de trabalhos acadêmicos-universo campos dos goytacazes*, 1(12), 1-9

Pérez-Pérez, E., Sulbarán-Mora, M., Barth, O.M., Massaro, C.F., & Vit, P. Bioactivity and botanical origin of austroplebeia and tetragonula australian pot-pollen.

Pedro, S.R.M., & Roubik, D.W. (Eds). *Pot-Pollen in stingless bee melittology*. Cham, Switzerland, Springer International, pp. 377–390.

Physiochemical, rheological, microstructural, and antioxidant properties of yogurt using monk fruit extract as a sweetener. *Journal of dairy science*, 103(11), 10006-10014.

Pietta, G. M., & Palezi, S. C. (2015). Desenvolvimento de um iogurte sabor mirtilo a base de kefir e com reduzido teor de lactose. *Unoesc & Ciência-ACET*, 6(2), 163-172.

Polete, J. J. D., & Cruz, C. H. G. (2011). Uso de aditivos na indústria de alimentos. *Hig. aliment*, 172-176.

PORTUGAL (1992). Portaria nº 742, d 24 de julho de 1992. Estabelece regras sobre a produção, comercialização e consumo de iogurte e de leites fermentados. Ministério da Agricultura e do Comércio e Turismo. Porto.

Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., & Corsetti, A. (2021). Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: a sustainable tool for functional foods. *Foods*, 10(7), 1653.

Rahman, M. S., Emon, D. D., Nupur, A. H., Mazumder, M. A. R., Iqbal, A., & Alim, M. A. (2024). Isolation and characterization of probiotic lactic acid bacteria from local yogurt and development of inulin-based synbiotic yogurt with the isolated bacteria. *Applied Food Research*, 4(2), 100457.

Ramos, T. M., Gajo, A. A., Pinto, S. M., Abreu, L. R., & Pinheiro, A. C. (2009). Perfil de textura de labneh (iogurte grego). *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 64(369), 8-12.

Rech, A. R., Agostini, K., Oliveira, P. E., & Machado, I. C. (2014). *Biologia da polinização*. Rio de Janeiro, Projecto Cultural, 524 pp.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2011). Oxidative stress, inflammation, and cancer. *Free Radic. Biol.*, 49(esp.), 1603–1616.

Revers, L. M., Danielli, A. J., Iltchenco, S., Zeni, J., Steffens, C., & Steffens, J. (2016). Obtenção e caracterização de iogurtes elaborados com leites de ovelha e de vaca. *Revista Ceres*, 63(esp.), 747-753.

Rocha, J. F. M. (2013). Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola (Master's thesis, Instituto Politecnico de Braganca (Portugal)).

Rojas, M. R. C.; Rojas, M. L. M.; Rojas, M. E. M. Phylogenetic analysis of *Bacillus cereus* sensu lato isolates from commercial bee pollen using tRNA-PCR. *Microorganisms*, v. 8, n. 4, art. 524, 2020.

Sagrillo, F.S. et al., (2015). *Processos produtivos em biotecnologia*. São Paulo, Érica, 120 p.

Santa Bárbara, Marivalda F.; Moreira, Manuela M.; Machado, Cerilene S.; Chambó, Emerson D.; Pascoal, Ananias; de Carvalho, Carlos Alfredo L.; da Silva Sodré, Geni;

- Delerue-Matos, Cristina; Estevinho, Leticia M. (2020). Storage methods, phenolic composition, and bioactive properties of *Apis mellifera* and *Trigona spinipes* pollen. *Journal of Apicultural Research*. ISSN 0021-8839. p. 1-10
- Santos, I. F., & Ellena, E. A. (2021). Iogurte grego adicionado de fibras. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*, 2(2), 34-50.
- Santos, M. S., Estevinho, L. M., de Carvalho, C. A. L., da Silva Conceição, A. L., & de Castro Almeida, R. C. (2020). Rheological and sensorial evaluation of yogurt incorporated with red propolis. *Journal of food science and technology*, 57, 1080-1089.
- Sembiring, Elin Novia; ELYA, Berna; SAURIASARI, Rani. Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal*, 2018, 10.1.
- Sereia, M. O. P., de Lima, T., & de Andrades, C. R. (2022). Características, produção e comercialização do iogurte no Brasil. *Revista Científica da FHO Uniararas*, 10(1), 38-44.
- Shivanna, S. K.; N, L. N.; Rao, P. S. Enhancing nutritional, textural, and bio-functional properties of yoghurt through fortification with *Moringa oleifera*: a comprehensive investigation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 18, n. 10, p. 8289–8304, 2024.
- Shuler, M. L., & Daugulis, A. J. (2011). Substrate inhibition in bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 1027–1039.
- Silva, H. R., do Nascimento, R. C. V., Talma, S. V., de Carvalho Furtado, M., Balieiro, A. L., & Barbosa, J. B. (2020). Technological applications of lactic acid bacteria (BALs) in milk products. *Revista INGI*, 4(1), 681-690.
- Silva, I. G. D., Andrade, A. P. C. D., Silva, L. M. R. D., & Gomes, D. S. (2019). Elaboração e análise sensorial de biscoito tipo cookie feito a partir da farinha do caroço de abacate. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, e2018209.
- Silva, I. S. C., & Pandolfi, M. A. C. (2020). Análise das principais tendências no mercado brasileiro de iogurtes. *Revista Interface Tecnológica*, 17(2), 523-534.
- Silva, L. M., de Paula, K. C. S. E., & Fausta, K. Y. (2021). *Aditivos Alimentares*. Campos dos Goytacazes, Essenti, 98 pp.
- Silva, M. L. C., Costa, R. S., dos Santos Santana, A., & Koblitz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669-681.
- Silva, P. R. C. (2007). *Fabricação de iogurte*. Instituto Euvaldo Lodi, Brasília, 4 pp.
- Silveira, M. F. A. (2005). *Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel*. (Tese de Doutorado, Universidade Federal de

Viçosa) – Repositório da UFV.

Simkins, S. B., Alexander, M., & Nakhla, G. L. (2018). Substrate inhibition and Haldane kinetics in oily-wastewater biodegradation. *Water Science and Technology*, 84(7), 1804–1812.

Sionek, B., Szydłowska, A., Küçükgöz, K., & Kołożyn-Krajewska, D. (2023). Traditional and new microorganisms in lactic acid fermentation of food. *Fermentation*, 9(12), 1019.

Sofia, T. Orvalho, R. Avaliação físico-química, nutricional e microbiológica de pólen apícola submetido a diferentes processos de conservação. [s.l.: s.n.]. Disponível em: https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/8645/1/Dissertac_a_o%20Mestrado%20GQSA_Telma_Orvalho_corrigida.pdf. Acesso em: 18 out. 2024.

Sousa A. L., Pereira, F. G., & Lima, R. S. (2023). “Avaliação microbiológica de produtos lácteos: indicadores higiênico-sanitários e patógenos em diferentes tempos de armazenamento. *Revista Brasileira de Microbiologia*, 54(1), 78-85.

Souza, B. A., Pias, K. K. S., Braz, N. G., & Bezerra, A. S. (2019). Aditivos alimentares: aspetos tecnológicos e impactos na saúde humana. *Revista Contexto & Saúde*, 19(36), 5-13.

Standifer, L. N., McCaughey, W. F., Dixon, S. E., Gilliam, M., & Loper, G. M. (1980). Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, amino acids and enzymes. *Apidologie*, 11(2), 163-171.

Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*. 2010;109(1):13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04657>.

Sulbarán-Mora, M.; Pérez-Pérez, E., & Vit, P. (2018). Antibacterial activity of ethanolic extracts of pot-pollen produced by eight meliponine species from Venezuela. In: Vit, P., Pedro, S.R.M., & Roubik, D.W. (Eds). *Pot-Pollen in stingless bee melittology*. Cham, Switzerland, Springer International, pp. 391–399.

Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377.

Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Yoghurt: Science and Technology* (3rd ed.). Woodhead Publishing.)

Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Vol. 2. Pearson Educación, Madrid, 406 pp.

Timmermans, E., Bautil, A., Brijs, K., Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., & Courtin, C. M. (2022). Sugar levels determine fermentation dynamics during yeast pastry making and its impact on dough and product characteristics. *Foods*, 11(10), 1388)

Tomasi, M., Almeida, K. C. D., Scartezini, I., & Fagundes, C. (2023). O uso da fermentação para produção de alimentos e bebidas. *Anais da Feira de Ciência, Tecnologia, Arte e Cultura do Instituto Federal Catarinense do Campus Concórdia*, 6(1), 49-49.

Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A. & Bandler, R. (2001). Yeasts, moulds and mycotoxins. In *Bacteriological Analytical Manual online*. 8th Ed, Revision A. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-yeasts-molds-and-mycotoxins>

UNIÃO EUROPEIA, 1992. Portaria n.º 742/92 que estabelece regras sobre a produção, comercialização e consumo de iogurte e de leites fermentados. *Diário da República - 1.ª Série B*, N.º 169, de 1992-07-24, p. 3462–3465.

UNIÃO EUROPEIA, 2008. Regulamento CE n.º 1333, de 16 de dezembro de 2008. Relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, Parlamento Europeu e do Conselho.

Valentin, L., Wang, T., (2024). Influence of inoculumsubstrate ratio on biomethane production via anaerobic digestion. *Environmental Microbiology Reports*, 16(1), 44–56.

Valério, G. S., Costa, I. F., & Cardines, P. H. F. (2022). Desenvolvimento de iogurte enriquecido com batata Yacon: uma proposta de alimento funcional. *Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa*, 38(esp.), 172-182.

Vincenzi, D., de Jesus Mendes, L., & Mota, V. M. (2021). Aditivos como conservantes químicos. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 7(9), 821-849.

Vit, P., Bertha, S., Silvia, P. R., Ruíz, J., Maza, F., María, P. V., & Elizabeth, P. P. (2016). Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(2), 78-84.

Walker, G. M. (2011). Pioneering research on yeast stress responses: A personal perspective. In *Yeast Stress Responses* (2nd ed.). Springer.

Weerathilake, W. A. D. V., Rasika, D. M. D., Ruwanmali, J. K. U., & Munasinghe, M. A. D. D. (2014). The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(4), 1-10.

Xu, Z., He, H., Zhang, S. Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Sci Rep* 7, 13614 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14052-1>

Yang, S., Yan, D., Zou, Y., Mu, D., Li, X., Shi, H., ... & Wu, J. (2021). Fermentation temperature affects yogurt quality: A metabolomics study. *Food Bioscience*, 42, 101104.

Zeece, M. (2020). Food additives. In: Zeece, M. (Ed.). Introduction to the chemistry of food, Elsevier, pp. 251-311.

Zenkevicz, Camila. Análises microbiológicas em iogurtes comercializados na cidade de Ponta Grossa. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2022.

Zhang, Y., Li, Q., Xing, Z., & Wang, Y. (2019). Fermentation enhances antioxidant activity of plant-based foods: A review. Food Research International, 129, 108

Zuluaga, C. M., Serratob, J. C., & Quicazana, M. C. (2015). Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. Chem. Eng, 43(esp.), 175-180.

Zuluaga-Domínguez, C., Serrato-Bermudez, J., & Quicazán, M. (2018). Influence of drying-related operations on microbiological, structural and physicochemical aspects for processing of bee-pollen. Engineering in Agriculture, Environment and Food, 11(2), 57-64.