

Avaliação do pólen apícola como fonte de aminoácidos

Graziela Simões Lopes da Costa

*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 a Universidade
Tecnológica Federal do Paraná*

Orientado por

Soraia Isabel Domingues Marcos Falcão
Miguel José Rodrigues Vilas Boas
Paulo Henrique Março

Bragança
2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marcelo Mineiro e Elaine Simões, e a minha madrastra, Chrystiane Diniz, por terem me apoiado desde o início, me dado força quando quis parar e sustentabilidade financeira por todos estes anos de graduação e mestrado. Aproveito, também, a oportunidade para agradecer todo o suporte que me deram em casa e o amor dedicado.

Às minhas irmãs, Larissa Diniz e Manuela Mineiro, e aos meus irmãos, Yago Diniz, Miguel Simões e Guilherme Simões, pelos momentos de companheirismo, apoio emocional e pela compreensão em momentos de ausência. Agradeço minha avó, Mercedes Simões, e as minhas tias, Carolina Simões e Priscila Simões, por serem exemplos de mulheres fortes e por sempre torcerem por mim.

Agradeço a minha melhor amiga, Nicole Muniz, a minha companheira de faculdade, Lígia e Valentina, e as minhas companheiras de casa, Luana, Camilla, Marina e Bruna, por todos os risos, choros e por deixarem a vida mais leve durante esses anos.

Por fim, agradeço profundamente a minha orientadora, Soraia Falcão, pela oportunidade de me orientar na conclusão deste trabalho, por toda paciência e dedicação. Ao meu orientador do Brasil, Paulo Henrique, pela rápida ajuda e compreensão.

RESUMO

O pólen apícola, coletado pelas abelhas das flores e armazenado na colmeia, é reconhecido por sua composição nutricional e bioativa. O pólen é benéfico para as abelhas porque é a principal fonte de proteínas enquanto, também, serve de alimento humano devido ao seu alto valor nutricional. É composto por sua maioria em água, proteínas, aminoácidos, carboidratos e lipídeos, mas ainda por compostos minoritários tais como minerais, vitaminas e compostos fenólicos, tornando-o um antioxidante. Este trabalho teve como objetivo analisar a composição do pólen presente nos grãos coletados e transformados pelas abelhas com ênfase em aminoácidos. Para isso, foram analisadas quatro amostras de pólen apícola, duas monoflorais e duas multiflorais, através de diferentes parâmetros de qualidade como pH, proteínas totais, cinzas, lipídeos, carboidratos e calorias. Os aminoácidos livres foram analisados por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um espectrômetro de massa de alta resolução com um detector Orbitrap (LC-HRMS), após a extração com H₂O:ACN. Os resultados evidenciaram valores consistentes de proteínas, carboidratos e minerais, além de um perfil de aminoácidos essenciais e não essenciais, influenciado pela origem botânica. A análise estatística multivariada (PCA) permitiu distinguir claramente as amostras monoflorais das multiflorais, demonstrando que a composição de aminoácidos e as características físico-químicas são fortemente influenciadas pela origem floral. Os resultados de aminoácidos mostraram presenças maiores para a prolina, valina e fenilalanina com resultados baixos de desvio-padrão, enquanto para os outros aminoácidos, os resultados foram baixos, porém detectados por conta do método sensível utilizado. Esses resultados reforçam o potencial do pólen apícola como fonte natural de nutrientes essenciais e demonstram sua relevância tanto para a saúde das abelhas quanto para o consumo humano.

Palavras-chave: pólen apícola; aminoácidos; cromatografia líquida; espectrometria de massa; abelha melífera.

ABSTRACT

Bee pollen, collected by bees from flowers and stored in the hive, is recognized for its nutritional and bioactive composition. Pollen is beneficial to bees because it is their main source of protein, while also serving as human food due to its high nutritional value. It is composed mainly of water, proteins, amino acids, carbohydrates, and lipids, but also contains minor compounds such as minerals, vitamins, and phenolic compounds, making it an antioxidant. This study aimed to analyze the composition of pollen present in grains collected and processed by bees, with an emphasis on amino acids. To this end, four samples of bee pollen, two monofloral and two multifloral, were analyzed using different quality parameters such as pH, total proteins, ash, lipids, carbohydrates, and calories. Free amino acids were analyzed by high-pressure liquid chromatography coupled with a high-resolution mass spectrometer with an Orbitrap detector (LC-HRMS) after extraction with H₂O:ACN. The results showed consistent values for proteins, carbohydrates, and minerals, as well as a profile of essential and nonessential amino acids influenced by botanical origin. Multivariate statistical analysis (PCA) clearly distinguished monofloral from multifloral samples, demonstrating that amino acid composition and physicochemical characteristics are strongly influenced by floral origin. The amino acid results showed higher levels of proline, valine, and phenylalanine with low standard deviation results, while for the other amino acids, the results were low, but detected due to the sensitive method used. These results reinforce the potential of bee pollen as a natural source of essential nutrients and demonstrate its relevance for both bee health and human consumption.

Keywords: bee pollen; amino acids; liquid chromatography; mass spectrometry; honeybee.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIÇÕES	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO	1
1.2 OBJETIVO DO TRABALHO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 APICULTURA E PRODUTOS DA COLMEIA	3
2.2 PÓLEN APÍCOLA	5
2.3 DAS PLANTAS PARA A COLMEIA	7
2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	8
2.4.1 <i>Compostos majoritários</i>	8
2.4.2 <i>Compostos minoritários</i>	12
2.5 A IMPORTÂNCIA DO PÓLEN PARA AS ABELHAS	14
2.6 A IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO PÓLEN APÍCOLA PARA CONSUMO HUMANO	15
2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS À ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM PÓLEN APÍCOLA	17
2.7.1 <i>Métodos analíticos para avaliação de aminoácidos</i>	17
2.7.2 <i>Análise de aminoácidos por HLC-MS com detecção por Orbitrap</i>	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 MATERIAIS	19
3.2 ANÁLISE POLÍNICA	20
3.3 UMIDADE	20
3.4 DETERMINAÇÃO DE PH	21
3.5 PROTEÍNAS TOTAIS	22
3.6 CINZAS	23
3.7 LIPÍDIOS TOTAIS	25
3.8 CARBOIDRATOS	26
3.9 ENERGIA	26

3.10	ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS LIVRES.....	26
3.10.1	<i>Extração dos aminoácidos.....</i>	26
3.10.2	<i>Análise por cromatográfica líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS).....</i>	27
3.11	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	ANÁLISE POLÍNICA.....	30
4.2	UMIDADE.....	32
4.3	PH.....	33
4.4	PROTEÍNAS TOTAIS.....	34
4.5	CINZAS	35
4.6	LIPÍDIOS TOTAIS	36
4.7	CARBOIDRATOS E ENERGIA.....	37
4.8	ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS LIVRES	38
4.8.1	<i>Calibração externa.....</i>	38
4.8.2	<i>Validação do método cromatográfico (LOD, LOQ e precisão)</i>	39
4.8.3	<i>Resultados da análise de cromatográfica líquida.....</i>	40
4.9	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	42
5	CONCLUSÃO	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do pólen apícola em compostos maioritários.....	9
Tabela 2 - Componentes químicos presentes no pólen apícola;	9
Tabela 3 - Aminoácidos essenciais e não essenciais presentes no pólen apícola.	10
Tabela 4 - Comparação do conteúdo total de proteína e composição de aminoácidos no pólen.	11
Tabela 5 - Vitaminas presentes no pólen apícola e suas funções no organismo.	13
Tabela 6 - Composição das diferentes vitaminas encontradas no pólen apícola.	13
Tabela 7 - Informação sobre a origem botânica, origem da amostra, origem geográfica e data de recolha.	19
Tabela 8 - Lista de aminoácidos detectados, tempos de retenção (Rt), massa exata ionizada, fórmula molecular e equações das curvas de calibração.....	28
Tabela 9 - Resultados da análise polínica da amostra M1 de Mirandela, Portugal.	31
Tabela 10 - Resultados da análise polínica da amostra M2, comercial de Portugal.	32
Tabela 11 - Resultados das análises físico-químicas.	33
Tabela 12 - Reta de calibração dos aminoácidos.	38
Tabela 13 - Validação do método.....	39
Tabela 14 – Resultados da quantificação dos aminoácidos nas diferentes amostras de pólen apícola.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de polinização;.....	6
Figura 2 - Ciclo da coleta do pólen;	7
Figura 3 - Ilustração temática sobre as propriedades terapêuticas do pólen apícola;....	16
Figura 4 – Amostra MO1 (roxa) e amostra MO2 (amarelo e verde).....	19
Figura 5 – Amostra M1 e amostra M2.	20
Figura 6 - Amostra de pólen apícola no equipamento de umidade.	21
Figura 7 - Processo da análise de proteínas.....	22
Figura 8 - Cinzas obtidas.....	24
Figura 9 - Ciclo contínuo de extração Soxhlet.	25
Figura 10 - <i>Jasione montana</i> (A); <i>Trifolium pratense</i> (B).....	30
Figura 11 - <i>Quercus</i> sp.....	31
Figura 12 - Variância capturada por parâmetro analisado em cada PC.....	43
Figura 13 - Scores. Fonte: Autoria Própria, 2025.....	44
Figura 14 - Respective loadings.	44
Figura 15 - Scores de (A) PC 1 vs PC 2; (B) PC 1 vs PC 3; (C) PC 2 vs PC 3.	46
Figura 16 - Loadings de (A) PC 1 vs PC 2; (B) PC 1 vs PC 3; (C) PC 2 vs PC 3.	46

LISTA DE ABREVIÇÕES

9-FMOC	9-fluorenilmetilcloroformato
ACN	Acetonitrila
ALA	Alanina
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ASP	Ácido aspártico
DANS-CI	Cloreto de dansila
DCFI	Método titulométrico de 2-6-diclorofenol-indofenol
DPV	Voltametria de impulso diferencial
EM	Espectrometria de massas
GLY	Glicina
GLN	Glutamina
GLU	Ácido glutâmico
HIS	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ILE	Isoleucina
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LC-HRMS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução
LEU	Leucina
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LYS	Lisina

MET	Metionina
OCC	Cromatografia de coluna aberta
OPA	O-ftalaldeído
PCA	Análise de compostos principais
PHE	Fenilalanina
PRO	Prolina
PTIC	Isotiocianato de fenila
SIM	Monitoramento de íon selecionado
SER	Serina
THR	Treonina
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência
UV	Radiação ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
VAL	Valina

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento do trabalho

O trabalho aborda diversos aspectos do pólen apícola, iniciando com a definição e a relevância da apicultura, que abrange diferentes itens produzidos pelas abelhas. O pólen apícola é descrito de forma detalhada, ressaltando que, ao ser misturado com néctar e saliva, apresenta uma composição nutricional mais rica em comparação ao pólen coletado diretamente das flores. A análise química do pólen apícola revela a presença de carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais, destacando-se pela alta concentração de vitaminas do complexo B, vitamina C e vitamina E. Além da importância do pólen apícola como um suplemento nutricional valioso tanto para humanos quanto para abelhas.

Este estudo foca na caracterização da composição nutricional de distintas amostras de pólen apícola, com particular destaque para a determinação de aminoácidos livres por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). Foram analisadas duas amostras monoflorais e duas multiflorais, o que permitiu investigar de que forma a variabilidade botânica influencia os parâmetros físico-químicos e o respetivo perfil de aminoácidos.

A abordagem adotada possibilitou uma avaliação detalhada do potencial nutricional do pólen apícola, evidenciando a sua importância enquanto alimento funcional e enquanto elemento fundamental para o adequado desenvolvimento e manutenção da saúde das colónias de abelhas.

1.2 Objetivo do trabalho

Os objetivos gerais desta tese são avaliar a composição nutricional do pólen apícola, com a quantificação de aminoácidos, com a intenção de validar o método de extração dos aminoácidos livres, potencializando assim potenciais aplicações inovadoras

na nutrição humana. Para isso, diferentes amostras de pólen apícola monofloral e multifloral, de regiões diferentes, serão avaliadas por análises físico-químicas. Os aminoácidos livres serão avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Apicultura e produtos da colmeia

A apicultura é uma atividade agrícola de gestão e criação de abelhas, de grande importância económica, social e ambiental. Promove uma maior diversidade de produtos com valor económico, alimentar e terapêutico. Os produtos da colmeia incluem o mel, a cera, o pólen apícola, o pão de abelha, a própolis, a geleia real e o veneno da abelha, também conhecido como apitoxina [1].

A abelha melífera, *Apis mellifera*, é um inseto que vive em sociedade, apresentando uma organização social altamente estruturada e eficiente, essencial para o funcionamento harmonioso da colmeia [2]. Essa sociedade é dividida em três castas principais: a rainha, as obreiras e os zangões [3]. A rainha, é a única fêmea fértil, é responsável pela postura dos ovos e pela manutenção da coesão social da colmeia, através da libertação de feromonas que regulam o comportamento das outras abelhas [4]. As obreiras, que são fêmeas estéreis, desempenham uma ampla gama de funções, desde a recolha de néctar, pólen e água, a produção de mel e cera, a limpeza das células e a defesa da colmeia [5]. Por sua vez, os zangões, que são machos, têm como principal função a fecundação da rainha [6]. Essa divisão de tarefas, adicionada à comunicação eficiente através de feromonas, e outros meio de comunicação como a dança, garante a sobrevivência e o sucesso reprodutivo da colônia [7].

O principal produto da apicultura é o mel, que é uma solução sobressaturada de açúcares composta por frutose e glucose, além de alguns ácidos orgânicos, compostos fenólicos, enzimas, minerais, proteínas e vitaminas [8]. Apesar de ter uma ampla composição, ela varia conforme o tipo de flora, clima e práticas agrícolas [8].

O mel é produzido a partir do néctar pelas abelhas, servindo como alimento e fonte de energia para a colmeia [5]. Pode, também, ser classificado em duas categorias principais: mel de néctar, que é produzido a partir do néctar das flores, e mel de melada, que é obtido principalmente a partir das excreções de insetos que se alimentam de plantas ou de secreções provenientes de partes vivas das plantas [9].

O consumo de mel como parte da dieta humana representa o uso mais significativo desse produto. No entanto, ele também é amplamente utilizado como ingrediente em diversas preparações culinárias, incluindo produtos de confeitaria e na elaboração de bebidas alcoólicas e não alcoólicas. Além disso, o mel encontra aplicação na indústria cosmética, evidenciando sua versatilidade e valor em diferentes contextos [10]. O mel possui uma ampla gama de propriedades benéficas, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-ulcerosas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anticarcinogênicas [11]. Essas características destacam seu potencial como um agente terapêutico e seu valor na promoção da saúde.

A cera de abelha é utilizada na construção dos favos na colmeia e na proteção das reservas de alimentos das abelhas, e é produzida pelas glândulas cerígenas das abelhas obreiras [1]. Ela é fundamental não apenas para a qualidade do mel, mas também para a saúde e produtividade da colônia [9]. Desempenha um papel crucial no desenvolvimento da colônia, sendo fundamental para o armazenamento de mel e pólen, para a regulação da temperatura interna e na identificação de odores característicos do grupo [9].

A cera de abelha predominantemente constituída por uma combinação de ácidos graxos, ceroleína, vitamina A e diversas outras substâncias que apresentam propriedades bactericidas, emolientes, cicatrizantes e anti-inflamatórias [12]. Essa composição complexa contribui para suas múltiplas aplicações e benefícios. Já no consumo humano, a cera de abelha tem valor terapêutico, sendo assim, é utilizada na fabricação de cosméticos e velas [1].

Além desse produto, as obreiras também produzem a geleia real através das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, e que tem como função alimentar as larvas na fase inicial do seu desenvolvimento e ser alimento para a rainha durante a sua vida, sendo o responsável pelo maior tempo de vida e fertilidade [13]. A geleia real é rica em aminoácidos, vitaminas do complexo B e outras substâncias bioativas, sendo utilizada na indústria cosmética e como suplemento nutricional [14]. Também é reconhecida por suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antioxidantes. Além disso, apresenta efeitos bioestimulantes, imunomoduladores, radioprotetores e anticancerígenos, entre outras características benéficas [12].

A própolis é uma substância resinosa que as abelhas recolhem de exsudados e rebentos de plantas, que é depois misturada com a cera e enzimas salivares pelas abelhas [9]. Essa resina é utilizada na colmeia para selar as paredes, reforçar as extremidades dos favos e embalsamar os invasores mortos que as abelhas não conseguem remover para fora da colmeia [9]. Essa função é essencial para a manutenção da higiene e integridade do ambiente interno da colônia. A própolis é um produto natural com uma ampla gama de atividades biológicas que a tornam valiosa na medicina e na farmacologia. Sua ação antimicrobiana é notável, sendo eficaz contra diversas bactérias e fungos, enquanto suas propriedades antioxidantes ajudam a neutralizar radicais livres [15].

Por último, o veneno de abelha, denominado apitoxina, é gerado por uma glândula de secreção ácida e outra de secreção alcalina localizadas no abdômen da abelha operária [9]. A apitoxina contém compostos como melitina e fosfolipase A2, que possuem propriedades terapêuticas, e por isso bastante utilizada na imunoterapia para alergias a venenos de insetos [16]. Quando administrado em doses controladas, o veneno de abelha pode exercer efeitos benéficos, incluindo propriedades anti-inflamatórias, além de atuar na prevenção e tratamento de reumatismo, apresentar ação anticoagulante, vasodilatadora e hipotensora [9]. Pesquisas adicionais indicam que o veneno de abelha pode ser relevante no manejo de diversas condições, como artrite, reumatismo, dor e câncer [17].

2.2 Pólen apícola

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas encontradas nas anteras dos estames das angiospermas, representando as células reprodutivas masculinas das plantas. Sua função primordial é a transferência dos gametas masculinos para o sistema reprodutivo feminino das flores, facilitando assim o processo de fertilização, Figura 1 [18]. Essa dinâmica é essencial para a reprodução das plantas, contribuindo para a diversidade genética e a continuidade das espécies.

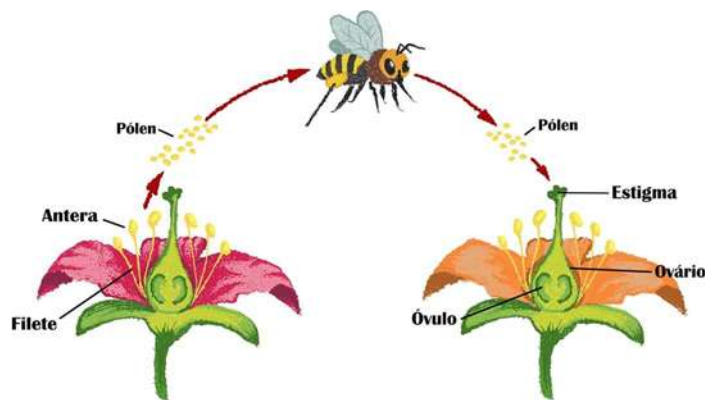


Figura 1 - Processo de polinização;
Fonte: Casa das Ciências, 2021 [19].

Além de desempenhar um papel crucial na polinização, o pólen é a principal fonte de proteína para diversos insetos, com destaque para as abelhas [20]. Essa função nutricional é vital para o desenvolvimento e a sobrevivência das colônias de abelhas, uma vez que o pólen fornece os aminoácidos essenciais necessários para a produção de proteínas e o crescimento das larvas.

Atualmente, o pólen é objeto de pesquisa em diversos laboratórios ao redor do mundo, devido ao seu status como um produto natural com valor dietético notável. Estudos têm demonstrado que ele possui efeitos benéficos nas funções digestivas e intestinais, contribui para o aumento do apetite, serve como uma fonte de energia, e pode auxiliar no combate à neurose e à depressão [9]. O pólen apícola se distingue do pólen das plantas, pois as abelhas, ao coletá-lo, o misturam com néctar e sua própria saliva, resultando na formação de pequenos grãos [9].

A saliva da abelha, que é abundante em enzimas, aminoácidos e vitaminas, ao ser combinada com o pólen, altera tanto a qualidade quanto a quantidade de substâncias presentes, diferenciando-o do pólen encontrado nas flores [9]. Sendo assim, pode ser classificado como uma fonte significativa de energia e nutrientes tanto para os animais como para humanos [21].

Sua composição inclui carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e uma variedade de vitaminas. Além disso, o pólen contém minerais e uma gama de compostos bioativos, como fenólicos e flavonoides [1].

Os grãos de pólen apresentam uma ampla gama de cores, que podem variar entre branco, amarelo, laranja e vermelho, dependendo de sua origem botânica e da composição química dos pigmentos como flavonoides ou carotenoides [18], [20], [22].

O pólen pode ser classificado em monofloral e multifloral, com diferenças significativas em sua origem e composição. O pólen monofloral é coletado predominantemente de uma única espécie de planta, onde o táxon principal não pode ser inferior a 80%, apresentando características específicas como sabor e aroma. Em contrapartida, o pólen multifloral é obtido de diversas espécies, incluindo diferentes taxas, resultando em uma mistura que oferece uma gama mais ampla de nutrientes e compostos bioativos [20], [23].

2.3 Das plantas para a colmeia

As abelhas operárias são as responsáveis pela coleta de pólen, e essa atividade geralmente ocorre durante o dia, quando as flores estão abertas e acessíveis.

A coleta de pólen pelas abelhas ocorre por meio de suas peças bucais e dos pelos que estão distribuídos por todo o corpo. Os grãos de pólen que se aderem aos pelos são recolhidos pelas pernas anteriores e medianas, sendo posteriormente transferidos para as pernas posteriores, Figura 2 [18]. Após essa transferência, o pólen é armazenado nas corbículas, ou “bolsas de pólen”, estruturas especializadas que permitem o transporte eficiente do material até a colmeia, Figura 2.

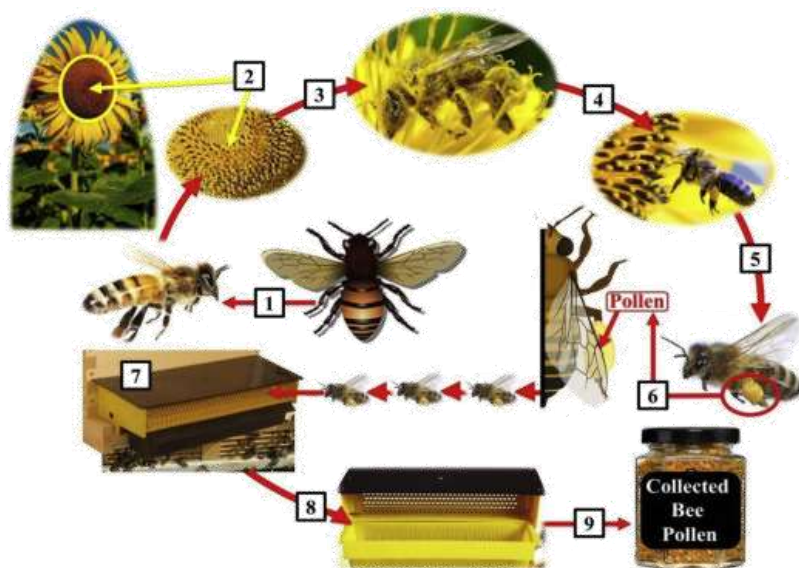


Figura 2 - Ciclo da coleta do pólen;
Fonte: Trends in Food Science & Technology, 2020 [24]

Dentro da colmeia, as cargas de pólen são transferidas para os favos, onde são compactadas no fundo dos alvéolos por outras obreiras, que utilizam suas cabeças para realizar essa tarefa [18]. Durante esse processo, néctar e secreções salivares das abelhas são adicionados ao pólen, o que favorece a fermentação láctica e previne sua deterioração. O produto resultante desse processo é denominado "pão de abelha", um produto que serve como uma importante fonte de nutrientes para a colônia [20].

Quando as cargas de pólen são capturadas por coletores, dispositivos projetados para extrair o pólen das abelhas ao retornarem à colmeia, esse material pode ser recolhido pelo apicultor e posteriormente processado para fins comerciais, Figura 2 [20]. Esse procedimento resulta na obtenção do pólen apícola. A utilização de coletores não apenas facilita a coleta do pólen, mas também assegura que as abelhas continuem a desempenhar suas funções naturais na colmeia, contribuindo para a sustentabilidade da apicultura [25].

2.4 Composição química

A composição química do pólen apícola é influenciada por diversos fatores, incluindo a espécie vegetal da qual é coletado, as condições climáticas predominantes, as características do solo, bem como a idade e o estado nutricional da planta durante o desenvolvimento do pólen [26]. Além disso, variáveis como a localização geográfica da produção, as diferentes estações do ano e as variações interanuais também desempenham um papel significativo na composição final do pólen [20].

2.4.1 Compostos maioritários

O pólen apícola é constituído por diferentes macronutrientes e micronutrientes, entre os quais carboidratos, proteínas, lipídios, fibra, minerais, aminoácidos, compostos fenólicos e vitaminas.

De acordo com a Tabela 1 e 2, estes são os componentes químicos que podem existir no pólen apícola.

Tabela 1 - Composição do pólen apícola em compostos maioritários.

Fonte: *Journal of Apicultural Research*, 2008 [23].

COMPOSTOS MAIORITÁRIOS	CONTEÚDO MIN-MAX (g/100g de peso seco)
Carboidratos totais*	13-55
Proteínas	10-40
Lipídios	1-13
Fibra	0,3-20
Teor em água	6-8
Cinzas	2-6

*Carboidratos calculados após a determinação das proteínas e lipídios.

Tabela 2 - Componentes químicos presentes no pólen apícola;

Fonte: *Frontiers in Nutrition*, 2024 [27]

COMPONENTES	SUB-COMPONENTES
Carboidratos	Sacarose, glicose, frutose, maltose, melezitose, isomaltose, trealose, taffinose e erlose
Proteína	Leucina, isoleucina, ácido aspártico, treonina, prolina, valina, fenilalanina, lisina, triptofano, asparagina, serina, glutamina, ácido glutâmico, glicina, cistina, tirosina, histidina, alanina e arginina
Lipídios	Ácido capríco, ácido margárico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido oléico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido palmítico, ácido erúcico, ácido gadoléico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido linoléico, ácido α -linolênico, ácido behênico, ácido araquidônico, ácido eicosatrienóico, ácido nervônico e ácido lignocérico
Vitaminas	Vitamina A (β -caroteno), vitamina B1, B2, B3 (ácido nicotínico, nicotinamida, niacina), vitamina B5, B6 (piridoxol, piridoxal, piridoxina), vitamina B9 (ácido fólico), vitamina B12, vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (α -tocoferol)
Minerais	Potássio, cobre, sódio, cálcio, magnésio, fósforo, manganês, estrôncio, zinco, cobre, alumínio, manganês e ferro
Fenólicos	ácido gálico, epicatequina, ácido protocatéquico, catequina, quercetina, naringenina, kaempferol, luteolina, hesperidina, terc-cinâmico, ácido o-cumárico, ácido ferúlico, ácido benzóico, ácido p-OH benzóico, ácido clorogênico, rutina, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido 2-hidroxicinâmico, apigenina, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, quercetina-3-O- β -D-glucosil-(2 \rightarrow 1)- β -glucosideo, kaempferol-3,4'-di-O- β -D-glucosideo, kaempferol-3-O- β -D-glucosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-glucosideo, isorhamnetina, quercitrina, quercetina 3-O-glucosideo e kaempferol 3 O-glucosideo

Os carboidratos, que constituem cerca de 13% a 55% do pólen, são constituídos maioritariamente por polissacarídeos como o amido e material das paredes celulares [20], [23], que podem atuar como prebióticos, favorecendo a saúde intestinal, mas também apresenta monossacarídeos como a frutose e a glicose [21].

Entre os macronutrientes, as proteínas se destacam como o segundo mais abundante, Tabela 1 e 2. O pólen pode conter entre 10% a 40% de proteínas, dependendo da origem botânica [18]. Dentre os vinte aminoácidos mais frequentemente encontrados na natureza, a quantidade de aminoácidos presentes varia entre os aminoácidos essenciais ou não essenciais de acordo com as espécies vegetais estudadas, conforme na Tabela 3 [28].

Tabela 3 - Aminoácidos essenciais e não essenciais presentes no pólen apícola.
Fonte: The KeyRole of AminoAcids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology, 2024 [28]

AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS	AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS
Arginina	Ácido aspártico
Fenilalanina	Ácido glutâmico
Histidina	Alanina
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Cisteína
Lisina	Glicina
Metionina	Glutamina
Treonina	Hidroxiprolina
Triptofano	Prolina
Valina	Serina

Em termos químicos, os aminoácidos seriam todos derivados de ácidos carboxílicos nos quais o hidrogênio estaria substituído por um grupo amina, em qualquer posição da cadeia de carbonos. No entanto, todos os aminoácidos naturais ou os obtidos por hidrólise de proteínas têm sempre um grupo amina ou imino adjacente ao grupo carboxílico [29].

As plantas da primavera apresentaram maior quantidade de aminoácidos, como triptofano, valina, isoleucina, serina, asparagina e glutamina, enquanto as plantas do outono mostraram menor concentração de prolina e hidroxiprolina [30]. Estudos

identificaram que um número significativo de espécies produz um pólen apícola rico em leucina, glutamina, lisina e ácido aspártico [28]. Além desses, a prolina e os ácidos glutâmicos são os aminoácidos exógenos predominantes encontrados na maioria dos tipos de pólen [31]. Porém, os grãos de pólen frequentemente apresentam deficiência em isoleucina e valina [32], Tabela 4.

Tabela 4 - Comparação do conteúdo total de proteína e composição de aminoácidos no pólen.
Fonte: The KeyRole of AminoAcids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology, 2024 [28]

TAXON	CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL (%)	COMPOSIÇÃO DOMINANTE DE AMINOÁCIDOS
<i>Brassica napus</i>	27	Ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, leucina
<i>Phacelia tanacetifolia</i>	28	Ácido glutâmico, prolina, ácido aspártico, leucina, lisina, valina
<i>Fagopyrum</i>	11	Ácido glutâmico, Prolina, Ácido aspártico, Leucina, Triptofano, Lisina, Valina, Alanina, Arginina
<i>Medicago sativa</i>	20	Valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, prolina
<i>Phoenix dactylifera</i>	20	Metionina, histidina, glicina, alanina
<i>Vicia faba</i>	24	Prolina, Ácido aspártico, Ácido glutâmico, Arginina, Leucina, Triptofano
<i>Helianthus annuus</i>	15	Leucina, Valina, Lisina, Histidina, Ácido aspártico, Arginina, Triptofano, Ácido glutâmico
<i>Zea mays</i>	15	Prolina, Ácido aspártico, Lisina, Alanina, Arginina, Triptofano
<i>Eucalyptus bridgesiana</i>	23	Prolina, Ácido glutâmico, Ácido aspártico, Leucina
<i>Echium plantagineum</i>	37	Ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, lisina
<i>Salix discolor</i>	30	Ácido glutâmico, ácido aspártico, leucina, lisina
<i>Castanea sativa</i>	22	Prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico
<i>Rubus sp.</i>	22	Leucina, lisina, valina, fenilalanina, treonina, isoleucina
<i>Acacia sp.</i>	22	Ácido aspártico, glutâmico, glicina

Os lipídios também são um componente significativo do pólen, representando cerca de 1% a 13% de sua composição [18]. Os lipídios presentes no pólen incluem ácidos

graxos, fosfolipídios, carotenoides e esteróis, que desempenham papéis importantes na estrutura celular e na função metabólica [20]. Os ácidos graxos identificados mais comuns incluem o ácido linolênico é o mais predominante, seguido do linoleico, palmítico e oleico [9].

Em termos de conteúdo em água, o pólen apícola fresco apresenta um conteúdo em água entre 20-30%, enquanto o pólen seco, dependendo do processo de secagem, não devendo ultrapassar os 42°C, deverá estar entre os 6-8% [23].

2.4.2 Compostos minoritários

Os micronutrientes presentes no pólen apícola incluem uma variedade de vitaminas e minerais. O teor de minerais no pólen varia de acordo com o tipo específico de pólen e é especialmente influenciado pelas condições do solo em que as plantas se desenvolvem, como ferro (Fe), cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), zinco (Zn) e potássio (K), sendo este o mais abundante, estando presente numa percentagem de 60% do conteúdo mineral total, seguido do Mg, com 20% e do Na e Ca com 10% [9], [21].

As vitaminas são classificadas em dois grupos com base em sua solubilidade: lipossolúveis e hidrossolúveis. As vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K, são substâncias químicas que se dissolvem em solventes orgânicos e podem ser armazenadas nas reservas de gordura do corpo, podendo causar toxicidade quando consumidas em excesso [33].

Por outro lado, as vitaminas hidrossolúveis, que incluem B1, B2, B6, B12, ácido fólico, ácido pantotênico, niacina, biotina e vitamina C, não são armazenadas em quantidades significativas no organismo. Isso resulta na necessidade de um suprimento diário dessas vitaminas, uma vez que são excretadas continuamente e não possuem reservas adequadas [34].

Sendo assim, o pólen é uma fonte rica de vitaminas hidrossolúveis, como do complexo B, que são essenciais para o metabolismo energético e a saúde celular. Além disso, o pólen contém vitamina C e também vitaminas lipossolúveis como as vitaminas E, que atuam como antioxidantes, protegendo as células contra o estresse oxidativo,

conforme a Tabela 5 e 6 [20]. A quantidade e a diversidade de vitaminas presentes no pólen estão diretamente associadas à espécie botânica de origem [9].

Tabela 5 - Vitaminas presentes no pólen apícola e suas funções no organismo.
Fonte: The Vitamins – Fundamental Aspects in Nutrition and Health, 2012 [35]

VITAMINAS	FUNÇÕES
B1 (Tiamina)	Essencial para o metabolismo energético e a função nervosa.
B2 (Riboflavina)	Importante para a produção de energia e a saúde da pele.
B3 (Niacina)	Contribui para a saúde da pele, sistema nervoso e digestão.
B5 (Ácido Pantotênico)	Necessária para a síntese de hormônios e colesterol.
B6 (Piridoxina)	Fundamental para o metabolismo de aminoácidos e a produção de neurotransmissores.
B7 (Biotina)	Importante para a saúde da pele, cabelo e unhas.
B9 (Ácido Fólico)	Essencial para a síntese de DNA e a divisão celular.
B12 (Cobalamina)	Necessária para a formação de glóbulos vermelhos e função neurológica.
Vitamina C	Protege as células contra danos e é importante para a saúde imunológica.
Vitamina E	Contribui para a proteção das membranas celulares e tem propriedades antioxidantes.

Tabela 6 - Composição das diferentes vitaminas encontradas no pólen apícola.
Fonte: Journal of Apicultural Research, 2008 [23]

VITAMINAS	mg/Kg
β-caroteno (precursor Vitamina A)	10 - 200
B1	6 - 13
B2	6 - 20
B3	40 - 110
B5	5 - 20
B6	2 - 7
B7	0,5 - 0,7
B9	3 - 10
C; ácido ascórbico	70 - 560
E; tocoferóis	40 - 320

Um dos grupos mais relevantes de compostos minoritários no pólen apícola são os compostos fenólicos, que incluem flavonoides e ácidos fenólicos, onde se destacam os derivados glicosilados de quercetina, campferol e isoramnetina, entre outros [21].

Esses compostos demonstram uma variedade de atividades fisiológicas e farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, efeitos antienvhecimento, ação anticancerígena, atividade anti-inflamatória, efeito cardioprotetor e propriedades antivirais [9], [21].

Um outro conjunto de compostos bioativos encontrados no pólen são os fitosteróis, que podem contribuir para a redução dos níveis de colesterol no sangue ao inibir parcialmente a sua absorção [9].

2.5 A importância do pólen para as abelhas

O pólen é a principal fonte de proteína para as abelhas, sendo fundamental na alimentação tanto das larvas quanto das abelhas adultas, sendo especialmente crucial para as abelhas nutrizas, que são as obreiras encarregadas de fornecer alimento às crias [20]. Esse processo de metabolização ocorre nas células das glândulas hipofaríngeas e mandibulares das abelhas, permitindo a conversão dos componentes do pólen em substâncias nutritivas essenciais para o desenvolvimento das larvas [25].

Uma colônia de abelhas adultas pode sobreviver por um período considerável apenas com mel ou xarope de açúcar, mas essa dieta não é suficiente para garantir as condições adequadas para a gestação de suas larvas, uma vez que o pólen é um componente indispensável nesse processo [9].

Dessa forma, o pólen, sendo a principal fonte de proteínas, desempenha um papel central na manutenção da colônia. Sem um suprimento adequado de pólen, a colônia pode enfrentar dificuldades no crescimento e na manutenção de sua população.

Uma colônia média de abelhas melíferas coleta entre 15 a 55 kg de pólen por temporada, e o ambiente do apiário é crucial para a nutrição das abelhas, fornecendo recursos proteicos que variam ao longo do ano. Para um crescimento e sobrevivência adequados, as abelhas precisam de uma dieta com cerca de 20 a 25% de proteína, proveniente do pólen de diversas plantas. Assim, é amplamente aceito que uma dieta monótona não é equilibrada, exceto em casos de plantas como *Castanea* sp. e *Trifolium* sp., que oferecem pólen com alta concentração proteica [28].

2.6 A importância nutricional do pólen apícola para consumo humano

O pólen é considerado por alguns investigadores como um alimento perfeito, uma vez que é rico em aminoácidos essenciais, oligoelementos, enzimas, vitaminas do complexo B e vitaminas C e E.

Além disso, o pólen pode ser caracterizado como um suplemento alimentar com diversos efeitos benéficos para a saúde humana, devido às suas propriedades nutricionais. Inicialmente, o pólen apícola era exclusivamente visto como uma fonte de proteína na dieta das abelhas, mas recentemente tem vindo a ganhar maior atenção como uma potencial fonte alimentar para o consumo humano [23].

Devido às suas propriedades nutricionais e bioativas, o pólen apícola tem sido amplamente consumido em diversas regiões do mundo.

A presença de uma variedade de componentes benéficos no pólen apícola sugere que sua inclusão na dieta pode ter um impacto positivo na saúde geral, reforçando seu valor como um suplemento alimentar.

O pólen apícola é uma fonte abundante de antioxidantes, que são moléculas com a capacidade de retardar ou prevenir a oxidação de outras substâncias. Essa propriedade é fundamental para mitigar as alterações associadas ao estresse oxidativo, um fator que pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, incluindo câncer, doenças autoimunes, envelhecimento precoce, cataratas, artrite reumatoide, além de condições cardiovasculares e neurodegenerativas [22].

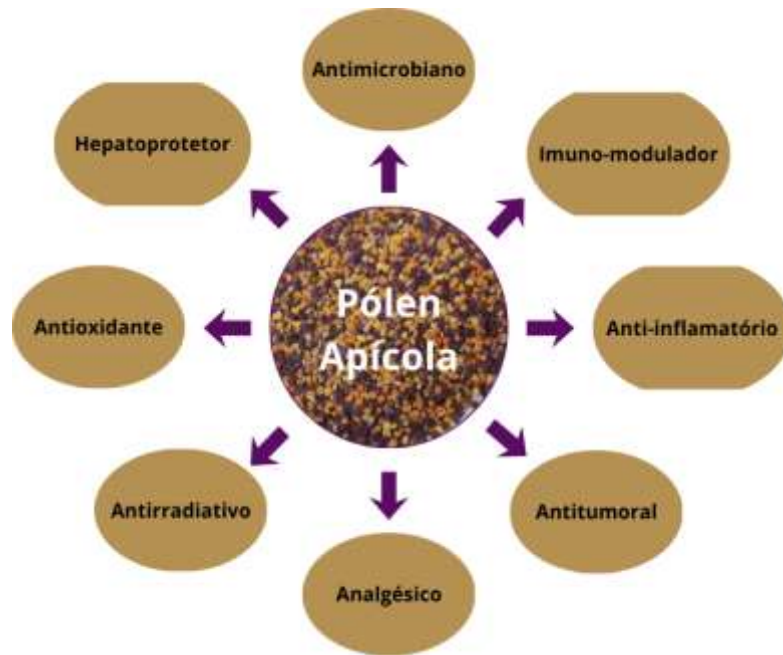


Figura 3 - Ilustração temática sobre as propriedades terapêuticas do pólen apícola;
Fonte: Autoria Própria, 2025.

Além disso, um dos efeitos frequentemente associados ao pólen é sua capacidade de mitigar os danos provocados pelo envelhecimento, além de promover melhorias na saúde geral e aumentar a energia vital [18].

O pólen, também, tem sido amplamente utilizado como um componente em diversos produtos, incluindo itens aromáticos como tinturas e óleos essenciais, e cosméticos como cremes, máscaras, batons, sabonetes e xampus, além de alimentos como barras de cereais, chocolates e biscoitos [20].

Recentemente, sua aplicação como um antioxidante natural para a conservação de produtos alimentícios tem sido objeto de investigação, destacando o potencial do pólen não apenas como um ingrediente funcional, mas também como um conservante que pode prolongar a vida útil dos alimentos [20].

2.7 Métodos analíticos aplicados à análise de aminoácidos em pólen apícola

2.7.1 Métodos analíticos para avaliação de aminoácidos

A análise de aminoácidos no pólen apícola é fundamental para compreender sua composição nutricional e os benefícios que pode oferecer tanto para as abelhas quanto para os seres humanos.

Um dos métodos mais tradicionais para a análise de aminoácidos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este método é amplamente utilizado devido à sua capacidade de separar os aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos [36].

Com o surgimento da técnica de HPLC, diversos reagentes foram testados para a obtenção de derivados de aminoácidos que absorvem UV, os quais podem ser medidos por espectrofotometria ou fluorimetria. Os reagentes utilizados para essa finalidade incluem o o-ftalaldeído (OPA), o cloreto de dansila (DANS-Cl), o 9-fluorenilmetilcloroformato (9-FMOC) e o isotiocianato de fenila (PTIC) [37].

O DANS-Cl é eficaz, mas requer altas temperaturas e longos períodos de reação, resultando em derivados instáveis que complicam a análise. O PTIC gera derivados estáveis que absorvem radiação ultravioleta (UV), mas exige etapas de secagem que podem afetar a reprodutibilidade. O OPA e o FMOC são recomendados para alta sensibilidade, com o FMOC apresentando a desvantagem de gerar um derivado alcoólico que pode comprometer o cromatograma [37].

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica poderosa que pode ser utilizada em conjunto com a HPLC para a análise de aminoácidos. A EM permite a identificação e quantificação de compostos com base em suas massas moleculares [36].

Idealmente, um método analítico para aminoácidos deve atender a certos requisitos: tempo de análise curto, alta sensibilidade, resposta linear e, por fim, formação de derivados estáveis e de rápida formação [37].

A HPLC em conjunto com a EM tem se mostrado a técnica mais eficaz e amplamente utilizada para a análise de aminoácidos em pólen apícola, devido à sua alta resolução, sensibilidade e capacidade de quantificação.

2.7.2 Análise de aminoácidos por HPLC-MS com detecção por Orbitrap

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-MS) é amplamente reconhecida como uma das técnicas mais adequadas para a determinação de aminoácidos em matrizes complexas, como o pólen apícola. O acoplamento entre a separação cromatográfica e a detecção por massas permite identificar analitos em concentrações reduzidas e minimizar interferências decorrentes de compostos naturais presentes no pólen [38].

Entre os detectores de massas disponíveis, o Orbitrap destaca-se pela alta resolução e exatidão de massa, garantindo distinção confiável entre espécies com m/z muito próximos, mesmo em condições de coeluição parcial [39]. A operação em modo SIM aumenta a relação sinal-ruído e melhora significativamente os limites de detecção e quantificação, o que é particularmente relevante dada a baixa concentração de alguns aminoácidos [40].

O uso de UHPLC associado à ionização por eletrospray aquecido (H-ESI) resulta em sinais mais estáveis, reduzindo o tempo de análise sem perda de desempenho [41]. Assim, a combinação HPLC-MS/Orbitrap proporciona elevada sensibilidade, seletividade e precisão, constituindo-se como a abordagem analítica mais adequada para a caracterização dos aminoácidos presentes nas amostras de pólen apícola avaliadas neste trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Neste trabalho, foram utilizadas duas amostras de pólen apícola monofloral, MO1, com coloração roxa, proveniente de Mirandela, Portugal, e outra, MO2, com uma coloração entre o amarelo e o verde, proveniente de Al-Qalyubia, Egipto, Tabela 7, Figura 4.

Tabela 7 - Informação sobre a origem botânica, origem da amostra, origem geográfica e data de recolha.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

AMOSTRAS DE PÓLEN	ORIGEM BOTÂNICA	ORIGEM DA AMOSTRA	ORIGEM GEOGRÁFICA	DATA DE RECOLHA
MO1	Monofloral	Apicultor	Mirandela, Portugal	Maio, 2024
MO2	Monofloral	Apicultor	Al-Qalyubia, Egipto	Maio, 2024
M1	Multifloral	Apicultor	Mirandela, Portugal	Maio, 2024
M2	Multifloral	Comercial	Valpaços, Portugal	Abril-Junho, 2024

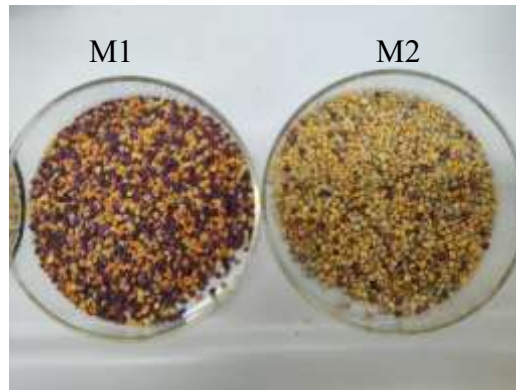


Figura 4 – Amostra MO1 (roxa) e amostra MO2 (amarelo e verde).

Fonte: Autoria própria, 2025.

Além disso, foram estudadas duas amostras de pólen multifloral, M1 de apiários localizados em Mirandela, Portugal e outra, M2, obtida comercialmente, da marca Artmel. Após um processo de liofilização, as amostras foram trituradas num

homogeneizador e conservadas na sala refrigerada a uma temperatura entre os 2°C e os 5°C.



*Figura 5 – Amostra M1 e amostra M2.
Fonte: Autoria própria, 2025.*

3.2 Análise polínica

A análise polínica foi realizada pelo laboratório botânico da Universidade Vigo, em Espanha, com um método previamente descrito [42].

Foi pesado 1 grama de cada amostra de pólen apícola e foi adicionado 10 mL de água destilada e, em seguida, a mistura foi agitada no vórtex. Após a agitação, foi colocado uma alíquota de 100 µL em uma lâmina, e, após a secagem, acrescentou-se uma gota de gelatina glicerina para o preparo permanente das quatro amostras. Através de um microscópio óptico, foi realizada a identificação dos grãos de pólen, com a ajuda de uma coleção de referência do Laboratório de botânica da Universidade de Vigo e de diferentes guias de morfologia polínica.

3.3 Umidade

O teor de umidade foi determinado através de um analisador de umidade, PMB Moisture Analyzer (Kingston, Milton Keynes, U.K.). As quatro amostras foram

homogeneizadas com uma espátula e pesadas, separadamente, em triplicata em uma balança analítica, com aproximadamente, 1,60g de cada, conforme mostrado na Figura 6.



Figura 6 - Amostra de pólen apícola no equipamento de umidade.
Fonte: Aatoria Própria, 2025.

Cada amostra foi distribuída uniformemente sobre um prato de alumínio, que foi colocado na câmara do equipamento, conforme ilustrado na Figura 6. A secagem foi realizada em 110°C por cerca de 2 minutos, até a estabilizar a massa do pólen apícola, indicando no equipamento o teor final de umidade.

3.4 Determinação de pH

Foi utilizado o método da ISO/FDIS 24382 [43] para a determinação do pH, de um extracto aquoso de pólen apícola, medido potenciométricamente à temperatura ambiente utilizando um eléctrodo de vidro.

Em uma balança analítica, foram pesados 5 gramas de amostra, às quais foram adicionados 25 mL de água deionizada em um tubo com tampa. As amostras foram agitadas manualmente por um tempo, a fim de garantir que o pólen estivesse umedecido, e, em seguida, foram agitadas mecanicamente por 2 horas a 60 rpm em um agitador mecânico.

Posteriormente, as quatro amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm, e a solução sobrenadante foi retirada para a determinação do pH. Após a centrifugação, as amostras foram decantadas separadamente para béqueres, e o eletrodo de pH foi inserido até uma profundidade de 10 mm, permanecendo até que o valor de pH se estabilizasse em cada amostra.

A análise foi realizada em duplicata.

3.5 Proteínas totais

O teor total de proteínas em amostras de pólen apícola foi determinado utilizando-se o método de Kjeldahl, conforme descrito pela ISO/FDIS 24382 [43]. Inicialmente, 0,5 gramas das quatro amostras foram pesadas em triplicata em uma balança analítica e foram colocadas em tubos de digestão.

Duas pastilhas catalisadoras de Kjeldahl e 15 mL de ácido sulfúrico foram adicionados a cada tubo, e, em seguida, os tubos foram colocados em um bloco digestor a 400°C por um tempo total de 70 minutos, até que a solução ficasse verde.

Após esse período, o bloco foi desligado e foi aberto para que os tubos fossem deixados esfriar por 30 a 40 minutos, até que a cor da solução fosse alterada de verde para azul. Após o resfriamento, 25 mL de água destilada foram adicionados em cada tubo, antes de se prosseguir para a etapa de destilação.



Figura 7 - Processo da análise de proteínas.
Fonte: Autoria própria, 2025.

Para essa etapa, foi utilizado um analisador automático de nitrogênio ProNitro A(J.P. Selecta, Barcelona). Na análise, cada tubo foi agitado e foi submetido à leitura individual dos parâmetros.

O teor total de proteína foi calculado usando a seguinte equação, com fator de correção de 5,6 de acordo com a norma ISO/FDIS 24382:

$$N = \frac{(Mb \times 5,6)}{m} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

N: Teor total de proteínas [%];

Mb: Massa de nitrogênio na amostra [mg];

m: Massa da amostra [mg].

3.6 Cinzas

A determinação do teor de cinzas no pólen apícola foi realizada de acordo com a metodologia ISO/FDIS 24382 [43]. Inicialmente, os cadinhos de porcelana vazios foram colocados em uma mufla a 600°C por aproximadamente 30 minutos, com o objetivo de remover qualquer umidade residual. Logo após, foram armazenados em um dessecador para mantê-los secos e em seguida foram pesados para obter a massa constante (M1).

Em seguida, foram pesados, separadamente, $1\text{g} \pm 0,002\text{g}$ das quatro amostras em triplicata (M2) nos cadinhos de porcelana, e, então, retornaram para a mufla por 3 horas até obter as cinzas, conforme na Figura 8.



Figura 8 - Cinzas obtidas.
Fonte: Autoria Própria, 2025.

Após o tempo indicado, os cadinhos foram retirados para o dessecador até resfriarem e, então, foram pesados novamente para obter a massa constante (M3). Por fim, os cadinhos com a amostra foram para a mufla pela segunda vez por 30 minutos. Após o tempo, os cadinhos foram para o dessecador até resfriarem para então serem pesados novamente, com o objetivo de confirmar que as duas massas tinham a mesma quantidade, provando que as cinzas chegaram em uma massa constante.

O teor de cinzas (A) foi calculado utilizando a seguinte equação obtida na ISO/FDIS 24382:

$$A = \left(\frac{M3 - M1}{M2} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

A: teor de cinzas [%]

M1: massa do cadinho seco e vazio [g]

M2: massa da amostra [g]

M3: massa do cadinho com as cinzas [g]

3.7 Lipídios totais

A extração de lipídeos foi determinada pelo método Soxhlet, com éter de petróleo como solvente, conforme descrito na metodologia ISO/FDIS 24382 [43].

Inicialmente, os balões de extração foram pesados secos e vazios (M1) e colocados no soxhlet. Em seguida, as quatro amostras de pólen apícola foram pesadas, aproximadamente, 3 gramas de cada no papel de cartucho e colocadas no extrator de soxhlet por 6 horas a 70°C, Figura 9.



Figura 9 - Ciclo contínuo de extração Soxhlet.
Fonte: Autoria Própria, 2025.

Após o processo, o resíduo do solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo para garantir a completa evaporação de qualquer resíduo de éter de petróleo. Por fim, as amostras foram colocadas em estufa a 105°C até atingirem a massa constante.

A quantificação dos lipídios foi realizada por gravimetria, através da pesagem do tubo seco e do resíduo presente no tubo.

A equação do teor total de lipídios é a seguinte, de acordo com a norma ISO:

$$X = \left(\frac{m_2 - m_1}{m_3} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

X: lipídeos totais [%]

m1: massa do tubo vazio [g]

m2: massa do tubo com gordura após a extração [g]

m3: massa da amostra [g]

3.8 Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido através do cálculo diferencial para cada amostra, com base na seguinte equação, de acordo com a metodologia [44]:

$$\text{Carboidratos [\%]} = 100 - (\text{Umidade} + \text{Cinzas} + \text{Proteínas} + \text{Lipídeos})$$

(Eq. 4)

3.9 Energia

O valor energético (kcal) foi calculado por 100 gramas de cada amostra utilizando a seguinte equação, de acordo com a metodologia [45]:

$$\text{Calorias} \left[\frac{\text{kcal}}{100\text{g}} \right] = (4 \times (\text{Proteínas} + \text{Carboidratos})) + (9 \times \text{Lipídeos})$$

(Eq. 5)

3.10 Análise de aminoácidos livres

3.10.1 Extração dos aminoácidos

Para o processo de extração dos aminoácidos livres das amostras para o HPLC foi realizado segundo a metodologia [46], com algumas alterações, e em triplicata.

Em um tubo falcon, foi pesado 5 gramas de cada amostra, adicionou-se 10 mL de H₂O:ACN, com uma concentração de 1/1. De seguida as amostras foram homogeneizadas

no vórtex por 5 minutos no banho de ultrassom por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Após este processo, foi retirado o líquido sobrenadante das amostras, filtrado através de um filtro de membrana de nylon de 0,2 µm e inserido em um vial, para posterior análise.

3.10.2 Análise por cromatográfica líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS)

Utilizou-se de um sistema UHPLC Vanquish (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas Orbitrap (Exploris 120, Thermo Scientific) para determinar os aminoácidos presentes nas amostras. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi a bioZen (100 x 2,1 mm, 2,6 µm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA), mantida a 40°C.

As fases móveis utilizadas foram: (A) 10 mM de formiato de amônio (pH 3,1) e (B) acetonitrila contendo 10 mM de formiato de amônio (pH 3,1; relação 90:10, v/v). O perfil de eluição empregou o seguinte gradiente: de 100% para 99% A entre 0 e 2 min, de 99% para 97% A entre 2 e 3 min, e de 97% para 50% A entre 3 e 8 min, mantendo-se em 50% A até 9 min; em seguida realizou-se o reequilíbrio às condições iniciais por 6 min. O fluxo foi de 0,5 mL·min⁻¹ e o volume injetado de 5 µL.

O espectrômetro Orbitrap foi acoplado a uma fonte de ionização por eletrospray aquecido (H-ESI), operando no modo de íon positivo. As condições de operação foram as seguintes: voltagem de spray de 4000 V, temperatura do vaporizador ajustada para 350 °C, fluxo de gás de bainha de 50 e gás auxiliar de 10 (em unidades arbitrárias), além de temperatura do tubo de transferência de íons de 325 °C. A aquisição dos dados foi realizada no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM), incluindo apenas para monitorização o precursor alvo, Tabela 8, com resolução de 60.000. Os parâmetros instrumentais incluíram voltagem da lente RF ajustada para 70%, alvo AGC padrão, tempo máximo de injeção automático e faixa de varredura de 2 m/z. As massas exatas dos precursores para cada aminoácido são apresentadas na Tabela 8. Os espectros e os picos

resultantes foram extraídos e avaliados manualmente utilizando o software Xcalibur® (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). As tolerâncias de erro de massa do precursor e dos fragmentos foram definidas em 5 ppm.

A identificação dos picos foi feita considerando a massa exata e a comparação dos tempos de retenção dos compostos presentes nas amostras com aqueles obtidos a partir dos padrões de referência.

Tabela 8 - Lista de aminoácidos detectados, tempos de retenção (Rt), massa exata ionizada, fórmula molecular e equações das curvas de calibração.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

COMPOSTO	ABREVIATURA	R _t /min	MASSA EXATA [M+H] ⁺	FÓRMULA MOLECULAR
Glicina	GLY	5,3	76,03919	C ₂ H ₅ NO ₂
Alanina	ALA	4,5	90,05476	C ₃ H ₇ NO ₂
Serina	SER	5,7	106,04965	C ₃ H ₇ NO ₃
Prolina	PRO	3,0	116,0703	C ₅ H ₉ NO ₂
Valina	VAL	3,0	118,08604	C ₅ H ₁₁ NO ₂
Treonina	THR	4,7	120,06526	C ₄ H ₉ NO ₃
Leucina	LEU	2,2	132,10164	C ₆ H ₁₃ NO ₂
Isoleucina	ILE	2,5	132,10164	C ₆ H ₁₃ NO
Asparagina	ASN	5,8	133,06056	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃
Ácido aspártico	ASP	9,6	134,0448	C ₄ H ₇ NO ₄
Glutamina	GLN	5,8	147,07617	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃
Lisina	LYS	6,8	147,11256	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂
Ácido glutâmico	GLU	8,3	148,0603	C ₅ H ₉ NO ₄
Metionina	MET	2,6	150,05809	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S
Histidina	HIST	6,5	156,07654	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂
Fenilalanina	PHE	2,1	166,08598	C ₉ H ₁₁ NO ₂
Arginina	ARG	6,6	175,11861	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
Tirosina	TYR	3,0	182,08086	C ₉ H ₁₁ NO ₃
Triptofano	TRP	2,0	205,09685	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂

A validação do método cromatográfico utilizado para a quantificação dos aminoácidos livres no pólen apícola foi realizada por meio da determinação dos parâmetros analíticos fundamentais: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão. Esses parâmetros asseguram a confiabilidade, sensibilidade e reprodutibilidade do método aplicado.

Os valores de LOD e LOQ foram calculados com base no desvio-padrão da resposta (σ) e no coeficiente angular da curva de calibração (slope), utilizando as fórmulas recomendadas pelas diretrizes internacionais de validação analítica [47].

$$LOD = 3,3 * \frac{\sigma}{slope} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$LOQ = 10 * \frac{\sigma}{slope} \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:

LOD = Limite de detecção;

LOQ = Limite de quantificação;

σ = Desvio-padrão do intercepto de várias curvas de calibração;

slope = Inclinação da curva de calibração para cada aminoácido;

A precisão do método foi avaliada pela análise repetida ($n = 6$) de uma solução padrão, expressa pelo coeficiente de variação (CV%), calculado pela fórmula [47]:

$$CV = \left(\frac{SD}{\bar{X}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

CV = Coeficiente de variação [%];

SD = desvio-padrão das medições;

\bar{X} = Valor médio das concentrações determinadas.

3.11 Análise de componentes principais (PCA)

Antes da realização da PCA, todas as variáveis foram padronizadas pelo método z-score, assegurando que diferenças de escala não influenciassem de forma desproporcional os componentes principais [48]. A análise foi conduzida com base na matriz de correlação, por ser mais adequada a variáveis expressas em unidades distintas. A determinação do número de componentes retidos considerou os autovalores superiores a 1,0 e a inspeção visual do gráfico de sedimentação (scree plot) [49].

Os componentes principais foram obtidos a partir da decomposição da matriz em autovetores, resultando nos gráficos de scores e loadings [50]. Os scores permitiram avaliar a distribuição das amostras no espaço multivariado, enquanto os loadings evidenciaram a contribuição individual de cada variável para a formação dos componentes [48]. A interpretação conjunta dessas representações possibilitou compreender de forma integrada o comportamento das amostras, destacando a influência da origem botânica nas características físico-químicas e no perfil de aminoácidos.

A análise foi realizada utilizando software estatístico apropriado, garantindo reprodutibilidade e consistência na avaliação das relações multivariadas entre as amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise polínica

A análise palinológica das amostras de pólen apícola permitiu identificar a origem botânica predominante e confirmar a autenticidade de cada amostra. A amostra monofloral MO1 ($\geq 80\%$) revelou-se pertencente ao tipo *Campanula*, muito provavelmente *Jasione montana*, característico da região de Mirandela, Portugal. A segunda amostra monofloral MO2 ($\geq 80\%$), proveniente do Egito, confirmou sua origem como sendo *Trifolium pratense*.

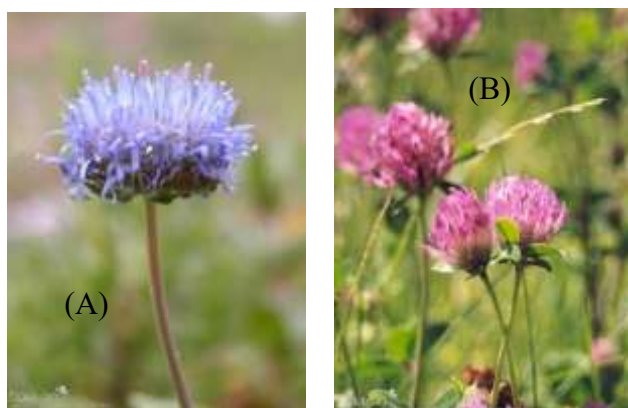


Figura 10 - *Jasione montana* (A); *Trifolium pratense* (B).
Fonte: Flora-on (acessado em 14/11/2025)

Para a amostra multifloral da região de Mirandela, Portugal, coletadas em 2024, foram encontrados 12 tipos polínicos diferentes, Tabela 9, onde predominava o pólen do tipo *Campanula*, Figura 10, com 48,2%, seguido do tipo *Scrophuralia* com 13,4% e *Cistus* sp. com 12,5%. Já a amostra comercial da região de Valpaços, Portugal, foram identificados 20 tipos polínicos, sendo o pólen mais abundante o de *Quercus* sp. (27,4%) seguido de *Rubus* sp. (23,0%) e *Salix* sp. (12,4%), Tabela 10.



Figura 11 - *Quercus* sp.
Fonte: Flora-on (acessado em 14/11/2025)

Tabela 9 - Resultados da análise polínica da amostra M1 de Mirandela, Portugal.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

ORIGEM BOTÂNICA DA AMOSTRA M1	PORCENTAGEM (%)
<i>Campanula</i> type	48,2
<i>Scrophuralia</i>	13,4
<i>Cistus</i>	12,5
<i>Quercus</i>	10,7
<i>Echium</i>	4,5
<i>Taraxacum</i> type	3,6
<i>Olea</i>	2,7
<i>Rubus</i>	2,7
<i>Carduus</i>	1,8

Tabela 10 - Resultados da análise polínica da amostra M2, comercial de Portugal.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

ORIGEM BOTÂNICA DA AMOSTRA M2	PORCENTAGEM (%)
<i>Quercus</i>	27,4
<i>Rubus</i>	23
<i>Salix</i>	12,4
<i>Campanula</i>	8
<i>Erica arbórea</i>	7,1
<i>Sedum</i>	6,2
<i>Castanea</i>	3,5
<i>Cistus ladanifer</i>	3,5
<i>Prunus</i>	2,7
<i>Echium</i>	1,8
<i>Taraxacum type</i>	1,8
<i>Prunus</i>	1,8
<i>Cistus salvifolius</i>	0,9

As duas amostras multiflorais apresentam algumas semelhanças a nível políbico, por serem de regiões próximas.

A variação nas espécies identificadas entre as amostras portuguesas e egípcia reflete não apenas diferenças florísticas regionais, mas também condições edafoclimáticas e períodos de floração. Em termos nutricionais, a maior diversidade botânica dos pólen multiflorais tende a conferir um perfil químico mais equilibrado, com ampla variedade de aminoácidos, vitaminas e minerais, aumentando o seu valor biológico e funcional.

4.2 Umidade

As amostras de pólen apícola de mostraram uma umidade entre 5,79 e 7,09 %, um valor considerado adequado de acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [51], que estabelece valores inferiores a 10% como adequados para o pólen apícola desidratado. Mais recentemente, a regulamentação ISO/FDIS 24382 [43], estabeleceu o intervalo para a umidade entre 2-8% para pólen seco tanto por métodos tradicionais como por liofilização.

A amostra monofloral da região de Mirandela, MO1, do tipo *Campanula*, mostrou uma umidade de 6,63% e a amostra multifloral da mesma região mostrou uma umidade de 6,24%. A amostra monofloral do Egito mostrou uma umidade de 7,09% e a amostra multifloral comercial da região de Valpaços mostrou uma umidade de 5,79%. Para as mostras de pólen apícola da região de Trás-os-Montes, os valores de umidade estão de acordo com os resultados anteriormente descritos para amostras multiflorais desta região [52].

Esses resultados demonstram que as amostras foram submetidas a um processo de desidratação eficiente, evitando a proliferação microbiana e a degradação de compostos sensíveis à umidade.

Tabela 11 - Resultados das análises físico-químicas.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

AMOSTRA	UMIDADE (%)	pH	PROTEÍNAS (%)	CINZAS (%)	LIPÍDIOS (%)	CARBOIDRATOS (%)	ENERGIA (kcal/100g)
MO1	6,63	5,05	19,73	2,86	2,82	67,96	385,65
MO2	7,09	4,56	20,60	3,53	4,66	64,12	380,85
M1	6,24	5,34	18,76	2,52	4,14	68,35	377,42
M2	5,79	4,92	20,24	2,64	2,23	69,1	376,17

4.3 pH

Os valores de pH obtidos nas quatro amostras variaram entre 4,56 e 5,34, Tabela 9, indicando caráter levemente ácido, o que está em consonância com o perfil esperado para o pólen apícola seco de acordo com a regulamentação ISO/FDIS 24382 [43] que estabelece valores entre 3,30 e 6,30. O pH para a amostra de pólen apícola de *Trifolium pratense* com origem no Egito foi semelhante ao valor de 4,68 apresentado pelo mesmo tipo de pólen com origem no Canadá [53]. Anteriormente foram descritos valores entre os 4,00 e os 4,7 para amostras multiflorais da região nordeste de Trás-os-Montes, o que está de acordo com os valores apresentados por estas amostras da mesma região [52].

Essa acidez natural é atribuída à presença de ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que desempenham papel importante na conservação do produto, estabilizando as moléculas bioativas e inibindo o crescimento microbiano [53]. A variabilidade de pH apresentada entre amostras de pólen apícola pode estar relacionada com diferenças ambientais no meio envolvente das plantas, incluindo variações nos níveis de CO₂, nas propriedades físico-químicas do solo e nas condições pedoclimáticas. A exposição a níveis de CO₂ elevados, podem intensificar a acidificação e assim alterar a biodisponibilidade de nutrientes, perturbando as vias metabólicas. Estas perturbações podem não só afetar a composição bioquímica e a qualidade do pólen, como consequentemente influenciar a saúde e os processos metabólicos das abelhas, ao interferir na sua microbiota intestinal e no equilíbrio fisiológico geral [53]

4.4 Proteínas totais

O conteúdo em proteínas é um parâmetro que recebe sempre uma maior atenção por ser considerada uma medida fiável do valor nutricional de um alimento. O pólen é a principal fonte de proteína para as necessidades nutricionais da abelha melífera, podendo o seu teor proteico variar entre 4,5% a 40,7%, com uma média global de 21,3% [24], dependendo da origem floral. O conteúdo em proteínas totais nas amostras de pólen apícola analisado variou entre 18,76 e 20,60 %, Tabela 11.

A amostra monofloral MO1 apresentou um valor de 19,73%, para a amostra monofloral MO2 foi de 20,60%, o que está de acordo com os valores anteriormente descritos para pólen de *Trifolium pratense* recolhido no Canadá, onde foram descritos valores de 20,90% [53]. Esta consistência poderá sugerir que o conteúdo proteico neste tipo de pólen seja menos influenciado por factores geográficos. Para a amostra multifloral M1, o conteúdo em proteínas foi de 18,76%, que por ter uma composição rica em pólen tipo *Campanula*, apresenta um valor similar à amostra monofloral MO1. Por fim, a amostra multifloral M2, com uma composição rica em pólen de *Quercus* sp. e *Rubus* sp. foi de 20,24%. Na literatura estão descritos valores de 22,00% de proteínas para o pólen monofloral de *Rubus* sp. [54] e de 23,20% para pólen monofloral de *Quercus* sp. [32].

Ambas as amostras multiflorais apresentam valores dentro do intervalo de 15,10-23,30% descrito para pólen apícola do nordeste de Trás-os-Montes.

Os resultados para as diferentes amostras de pólen, também estão de acordo com a ISO/FDIS 24382 [43], que define um mínimo de 10% de proteínas totais para pólen seco.

Comparando as duas amostras monoflorais, o pólen apícola de *Trifolium pratense*, MO2, apresentou um valor ligeiramente superior ao pólen apícola tipo *Campanula*, MO1, Tabela 11. A variação observada entre os diferentes tipos de pólen, Tabela 9, evidencia a importância das origens botânicas do pólen na determinação da composição nutricional, conforme já anteriormente descrito. O pólen é a principal fonte de proteína e de aminoácidos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das abelhas [55]. Nas abelhas, os níveis de proteína existentes no pólen podem ter um grande impacto na fertilidade da rainha, na saúde e na produtividade da colónia, podendo obter-se uma maior resiliência das colónias quando elas têm acesso a fontes de pólen com elevado teor proteico [55]. Do ponto de vista da nutrição humana, o nível de proteínas apresentado pelo pólen é comparável ao de algumas leguminosas (20 a 25 g por 100 g) e superior ao da maioria dos cereais (8 a 15 g por 100 g) [56], [57], posicionando-se como uma potencial fonte de proteína, especialmente para dietas à base de plantas.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o pólen utilizado apresenta um teor proteico relevante, embora com valores levemente diferentes da média global, o que pode ser explicado por variações na origem botânica, origem geográfica e nas condições ambientais durante a coleta.

4.5 Cinzas

No geral, os valores estão de acordo com o mínimo de 1,3 %, estabelecido para pólen seco pela norma ISO/FDIS 24382 [43]. Os teores de cinzas variaram entre 2,52% e 3,53%, apresentando as amostras portuguesas valores mais próximos entre si e a amostra de *Trifolium pratense* do Egipto apresentando valor ligeiramente superior. Na literatura foi descrito um valor de 6,17% para cinzas em pólen de *Trifolium pratense* recolhido no

Canadá. Este valor superior poderá ser devido a condições ambientais tais como, tipo de solo, clima, altitude, mas também devido a contaminações por poeiras ou restos de abelha durante o processamento [53]. A fração mineral representada pelas cinzas reflete a presença de elementos essenciais, como cálcio, fósforo, potássio, magnésio e ferro, fundamentais tanto para o metabolismo humano quanto para o desenvolvimento das abelhas.

4.6 Lipídios totais

O conteúdo em lipídios totais foi quantificado usando o método de Soxhlet. Os resultados obtidos foram 2,82% para a amostra monofloral de Mirandela (MO1), 4,66% para a amostra monofloral do Egito (MO2), 4,14% para a amostra multifloral de Mirandela (M1) e, por fim, 2,23% para a amostra multifloral comercial de Valpaços (M2), Tabela 11. Os valores obtidos estão de acordo com o descrito na ISO/FDIS 24382 [43], que estabelece um mínimo de 1,3% de lipídios totais para amostras de pólen desidratado.

Observa-se que, apesar das amostras terem valores diferentes entre si, os valores são compatíveis com os encontrados na literatura, que variam de 0,41% a 13,5% [24]. Comparando as duas amostras monoflorais, o pólen de *Trifolium pratense* apresentou um valor superior ao do tipo *Campanula*. Esta diferença está associada às diferentes origens botânicas e condições ambientais, que desempenham um papel significativo na composição lipídica do pólen apícola. Os lipídios são essenciais para a nutrição das abelhas, fornecendo energia e ácidos gordos essenciais para o desenvolvimento, saúde e sobrevivência da colónia [55]. Para a nutrição humana, o teor de lipídios no pólen apícola contribui para o seu valor calórico e também fornece ácidos gordos benéficos para a saúde, incluindo ácidos gordos ω -3 e ω -6, que podem variar entre 8,07-44,1% e 1,77-38,3%, como descrito em estudos anteriores [58]. Comparado com outros alimentos semelhantes ou equivalentes, o conteúdo em lipídios do pólen apícola é relativamente moderado. Por exemplo, os frutos secos apresentam um conteúdo mais elevado, de 50-60 g/100g, as sementes (chia, linhaça) apresentam um valor aproximado de 30g/100g, enquanto os cereais (aveia, quinoa) apresentam um teor lipídico mais baixo de cerca de 5-10 g/100g [53].

4.7 Carboidratos e Energia

Os macronutrientes mais abundantes no pólen apícola são os carboidratos, com valores a variar entre 64,12% e 69,1%, Tabela 11.

A natureza destes carboidratos presentes no pólen apícola, inclui carboidratos simples, como os presentes no mel, mas também amido e polióis [52]. No geral, os valores estão de acordo com os intervalos encontrados na literatura para pólen da mesma origem botânica ou da mesma região [52]. Comparando as duas amostras monoflorais, o pólen do tipo *Campanula* apresentou um teor superior, de 67,96%, em relação ao de *Trifolium pratense*, de 64,12%. Este valor foi similar ao apresentado pela amostra multifloral M1, com predominância de pólen do tipo *Campanula*, Tabela 11. Observa-se que a amostra com mais espécies botânicas e variados grãos de pólen (M2) foi a que apresentou um maior número de carboidratos.

A amostra com maior valor energético foi a monofloral de Mirandela (MO1) com 385,65 kcal/100g, seguida da amostra monofloral do Egito (MO2) com 380,85 kcal/100g, a amostra multifloral comercial (M2) com 377,42 kcal/100g e, por fim, a amostra monofloral de Mirandela (MO1) com 376,17 kcal/100g.

A amostra M1 apresentou um dos maiores teor de lipídios (4,14%) e um valor considerável de carboidratos (68,35%), o que justifica seu valor energético elevado.

A amostra comercial M2, apesar de apresentar o maior teor de carboidratos (69,1%) e um dos maiores de proteínas (20,24%), apresentou o menor teor de lipídios (2,23%), o que afetou consideravelmente seu valor calórico total, pelo fato dos lipídios serem os macronutrientes com maior densidade energética. O mesmo acontece com a amostra MO1.

O conteúdo energético do pólen é relevante tanto do ponto de vista nutricional humano quanto para o metabolismo das abelhas, que utilizam esses nutrientes para sustentar suas atividades vitais. A combinação de carboidratos em alta proporção e proteínas de boa qualidade torna o pólen um alimento de elevado valor biológico e potencial funcional.

4.8 Análise de aminoácidos livres

4.8.1 Calibração externa

A quantificação dos aminoácidos livres presentes nas quatro amostras de pólen apícola foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplada a espectrometria de massa de alta resolução, utilizando o método de calibração externa. As curvas de calibração apresentaram coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,98 para todos os aminoácidos analisados, demonstrando uma linearidade boa e adequada para o método de quantificação escolhido.

Tabela 12 - Reta de calibração dos aminoácidos.

Fonte: Autoria própria, 2025.

AMINOÁCIDOS	CURVAS DE CALIBRAÇÃO	R^2
Glicina	$Y = 164422x - 441681$	$R^2 = 0,9938$
Alanina	$Y = 2 \cdot 10^6x - 3 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9955$
Serina	$Y = 296548x - 869550$	$R^2 = 0,9825$
Prolina	$Y = 3 \cdot 10^7x + 6 \cdot 10^7$	$R^2 = 0,9907$
Valina	$Y = 7 \cdot 10^6x - 4 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9905$
Treonina	$Y = 2 \cdot 10^6x - 6 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9932$
Leucina	$Y = 8 \cdot 10^6x - 4 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9867$
Isoleucina	$Y = 1 \cdot 10^7x - 1 \cdot 10^7$	$R^2 = 0,991$
Asparagina	$Y = 1 \cdot 10^6x + 6434,1$	$R^2 = 0,9998$
Ácido aspártico	$Y = 80312x + 113799$	$R^2 = 0,9979$
Glutamina	$Y = 730852x - 287383$	$R^2 = 0,994$
Lisina	$Y = 2 \cdot 10^6x - 3 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9929$
Ácido glutâmico	$Y = 1 \cdot 10^6x + 1 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9957$
Metionina	$Y = 4 \cdot 10^6x + 4 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9951$
Histidina	$Y = 3 \cdot 10^6x - 2 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9987$
Fenilalanina	$Y = 6 \cdot 10^6x + 6 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9863$
Arginina	$Y = 7 \cdot 10^6x - 6 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9943$
Tirosina	$Y = 2 \cdot 10^6x + 966624$	$R^2 = 0,9919$
Triptofano	$Y = 2 \cdot 10^6x + 711696$	$R^2 = 0,9939$

4.8.2 Validação do método cromatográfico (LOD, LOQ e precisão)

Antes da quantificação dos aminoácidos presentes nas amostras de pólen, foi realizada a validação do método cromatográfico utilizado, com o intuito de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Os parâmetros avaliados incluíram o limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ), reprodutibilidade e a precisão de dois dias, conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 - Validação do método.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

AMINOÁCIDOS	LOD* (ppm)	LOQ* (ppm)	Nível de concentração (ppm)	Reprodutibilidade** (n=6)	Precisão intermediária** (n=2)
Glicina	0,191	0,636	15	5,15	1,06
			45	2,39	3,38
Alanina	0,040	0,134	15	1,94	2,40
			45	1,70	22,13
Serina	0,116	1,160	15	1,88	6,53
			45	4,17	2,91
Prolina	0,007	0,023	15	1,63	0,40
			45	1,98	2,19
Valina	0,069	0,228	15	2,96	3,39
			45	3,68	4,15
Treonina	0,088	0,293	15	1,61	5,73
			45	3,12	9,67
Leucina	0,013	0,044	15	5,71	1,34
			45	10,14	3,05
Isoleucina	0,028	0,095	15	11,65	0,08
			45	10,72	10,17
Asparagina	0,020	0,065	15	2,37	0,08
			45	0,92	1,97
Ácido aspártico	0,301	1,003	15	3,93	2,65
			45	3,20	2,68
Glutamina	0,038	0,128	15	12,06	14,40
			45	1,17	1,44
Lisina	0,010	0,034	15	5,38	4,94
			45	14,85	2,2
Ácido glutâmico	0,008	0,027	15	1,74	0,87
			45	2,56	0,56
Methionina	0,010	0,033	15	2,12	1,63
			45	3,22	2,56
Histidina	0,010	0,032	15	15,40	5,10
			45	3,9	19,74
Fenilalanina	0,013	0,043	15	1,26	8,80
			45	4,8	5,82
Arginina	0,003	0,011	15	10,86	1,25
			45	8,7	11,18
Tirosina	0,010	0,033	15	2,89	0,06

			45	2,44	1,91
Triptofano	0,007	0,024	15	3,09	3,58
			45	1,20	0,93

*Estimativa do LOD = 3xS/N; LOQ = 10xS/N;

**Precisão = expressa como coeficiente de variação (%) da área do pico.

Os valores obtidos foram baixos para a maioria dos aminoácidos, localizados na faixa de 0,003 a 0,30 ppm para o LOD e 0,011 a 1,160 ppm para o LOQ, indicando que o método é sensível para detectar e quantificar pequenas concentrações dos aminoácidos, como prolina, triptofano, tirosina e arginina, que apresentaram valores menores, demonstrando maior eficiência do detector.

A reprodutibilidade, avaliada com seis repetições, apresentou coeficientes de variação geralmente inferiores a 10%, o que confirma a estabilidade dos instrumentos. Aminoácidos como glicina, prolina, treonina, metionina e fenilalanina apresentaram variação inferior a 5% em concentrações de 15 ppm, reforçando a consistência das áreas dos picos cromatográficos.

A precisão intermediária também apresentou coeficientes de variação aceitáveis para os métodos cromatográficos quantitativos, situando-se abaixo dos 10%. Alguns aminoácidos, como alanina, histidina e arginina, apresentaram CVs mais elevados em um dos níveis de concentração, embora dentro de limites adequados para matrizes complexas como o pólen apícola.

4.8.3 Resultados da análise de cromatográfica líquida

A partir da reta de calibração, obteve-se o valor médio (V. MED) e o desvio padrão (STD) para as quatro amostras de pólen apícola. O valor médio é a média aritmética dos resultados e representa o valor central obtido no HPLC. O desvio padrão mede quanto os resultados variam em torno da média. Um valor pequeno indica que os valores estão muito próximos do valor médio, o que representa boa reprodutibilidade. Um desvio padrão grande indica que os valores estão mais dispersos, ou seja, há mais variabilidade.

Na Tabela 14 tem-se os resultados das quatro amostras.

Tabela 14 – Resultados da quantificação dos aminoácidos nas diferentes amostras de pólen apícola.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

AMOSTRAS	MO1		MO2		M1		M2	
	V. MED (mg/Kg)	STD (mg/Kg)	V. MED (mg/Kg)	STD (mg/Kg)	V. MED (mg/Kg)	STD (mg/Kg)	V. MED (mg/Kg)	STD (mg/Kg)
Glicina	57,49	0,004	61,03	0,007	61,58	0,098	59,00	0,096
Alanina	10,82	0,056	7,58	0,129	8,01	0,044	8,31	0,114
Serina	8,41	0,026	12,63	0,100	11,36	0,116	8,69	0,009
Prolina	847,20	0,550	286,89	0,087	504,59	0,100	626,24	0,321
Valina	2161,84	0,070	375,15	0,059	485,17	0,152	159,82	0,070
Treonina	6,59	0,006	8,66	0,000	8,47	0,017	7,17	0,038
Leucina	10,91	0,299	26,68	0,098	20,36	0,125	12,62	0,324
Isoleucina	6,73	0,039	16,46	0,202	8,88	0,121	5,56	0,128
Asparagina	0,84	0,010	3,42	0,033	7,02	0,057	6,56	0,112
Aspartic Acid	D*	0,026	D*	0,012	D*	0,000	D*	0,015
Glutamina	3,05	0,040	4,38	0,101	4,53	0,051	2,67	0,030
Lisina	3,06	0,002	3,41	0,012	3,26	0,008	3,11	0,001
Glutamic Acid	2,29	0,037	0,48	0,052	D*	0,018	D*	0,063
Metionina	D*	0,003	1,11	0,024	D*	0,007	D*	0,012
Histidina	1,73	0,011	2,38	0,008	3,95	0,072	2,18	0,028
Fenilalanina	8,10	0,021	149,37	0,040	151,20	0,043	80,60	0,028
Arginina	1,85	0,002	2,39	0,006	2,60	0,028	2,52	0,014
Tirosina	0,40	0,013	12,72	0,424	10,32	0,166	5,29	0,062
Triptofano	6,23	0,079	38,05	0,539	41,77	0,935	29,46	0,619

*D = Detectado.

De forma geral, observou-se que a prolina, fenilalanina, valina e glicina foram os aminoácidos mais abundantes nas quatro amostras de pólen apícola, enquanto os que apresentaram teores mais baixos foram compostos como asparagina, histidina e tirosina. Na literatura, a prolina é o aminoácido mais característico e predominantes no pólen apícola, o que reflete no seu papel no metabolismo energético das abelhas [59]

Na amostra monofloral de Mirandela (MO1), os compostos que tiveram teores mais elevados foram a valina (2156,27 µg/g) e a prolina (850,53 µg/g), indicando uma composição rica em aminoácidos de cadeia ramificada. Estes aminoácidos são relevantes tanto para o metabolismo das abelhas quanto para os humanos. Os baixos desvios-padrão

para estes compostos evidenciam boa precisão das mediações e estabilidade do método analítico.

A amostra monofloral do Egito (MO2) mostrou um perfil distinto, com concentrações menores de aminoácidos totais, mas a fenilalanina em destaque com 148,44 $\mu\text{g/g}$ e o triptofano com 38,05 $\mu\text{g/g}$. O desvio padrão reduzido demonstra a reprodutibilidade das análises.

As amostras multiflorais (M1 e M2) exibiram um perfil mais equilibrado de aminoácidos, devido a mistura de diferentes fontes florais. A amostra M1 apresentou-se um teor expressivo de fenilalanina (150,37 $\mu\text{g/g}$) e triptofano (41,77 $\mu\text{g/g}$), ambos aminoácidos aromáticos associados a espécies vegetais ricas em compostos nitrogenados e fenólicos. Essa composição indica possível contribuição de flores com maior potencial bioativo e valor nutricional para o pólen multifloral.

Já a amostra M2 destacou-se pelo elevado conteúdo de prolina, com 622,91 $\mu\text{g/g}$, associado a boa homogeneidade química, e refletindo, também, no teor baixo de desvio-padrão.

No geral, os desvios-padrão obtidos para todas as amostras foram muito reduzidos, geralmente inferiores a 1% do valor médio, o que confirma a alta precisão instrumental e a reprodutibilidade do método. Esse resultado demonstra que o procedimento de extração e as condições cromatográficas foram adequadamente controlados.

Quando se comparam as amostras monoflorais e multiflorais, observa-se que os pólenes monoflorais apresentaram maior variação entre os aminoácidos, o que pode estar relacionado à especificidade botânica de cada origem floral. Já os pólenes multiflorais mostraram uma composição mais equilibrada, consequência natural da mistura de diferentes espécies vegetais.

4.9 Análise de componentes principais (PCA)

Quando se trata de produtos alimentícios, os efeitos percebidos são resultado da interação entre todos os parâmetros ao mesmo tempo. Portanto, é conveniente avaliar em

conjunto todos os parâmetros verificar a influência da origem floral nos atributos de qualidade do pólen. Para isso, os dados obtidos com relação ao percentual de umidade, valor de pH, teores de proteínas, cinzas, lipídeos, valor calórico e teor de carboidratos foram avaliados em conjunto a partir da análise de componentes principais (PCA – do inglês Principal Component Analysis) [48].

A PCA foi aplicada utilizando-se auto-escalamento das variáveis para dar a mesma importância a cada parâmetro, desconsiderando-se assim as diferenças de unidade. Considerando que se trata de um número reduzido de amostras (4), foram utilizadas 3 componentes principais (PCs) para explicar 100% da variância. A Figura 12 apresenta a variância capturada por parâmetro analisado em cada PC.

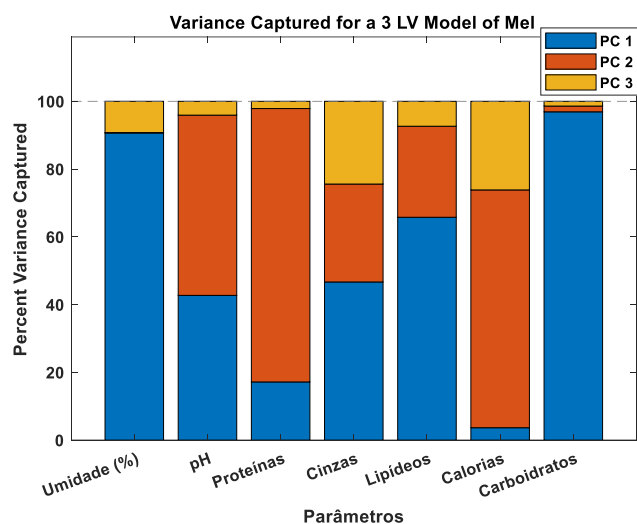


Figura 12 - Variância capturada por parâmetro analisado em cada PC.
Fonte: Autoria Própria, 2025.

Pode-se notar que a maior parte da variação observada nos dados está concentrada na PC 1 (51,94%). Porém, o teor de proteínas, as calorias e o valor de pH estão associados a PC 2 (37,38%). Uma pequena porção de variância relacionada às calorias, cinzas, umidade e lipídeos está explicada na PC 3 (10,68%). Com o intuito de verificar em quais parâmetros os pólenes se assemelham e em quais se diferenciam, deve-se avaliar os scores resultantes da análise. Para tanto, a Figura 13 apresenta os scores e a Figura 14 apresenta respectivos loadings de PC 1 vs PC 2 vs PC 3.

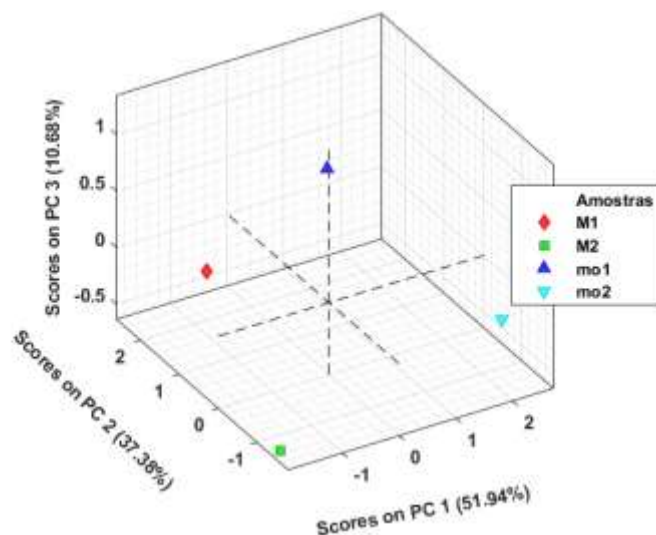


Figura 13 - Scores. Fonte: Autorial Própria, 2025.
 Fonte: Autorial Própria, 2025.

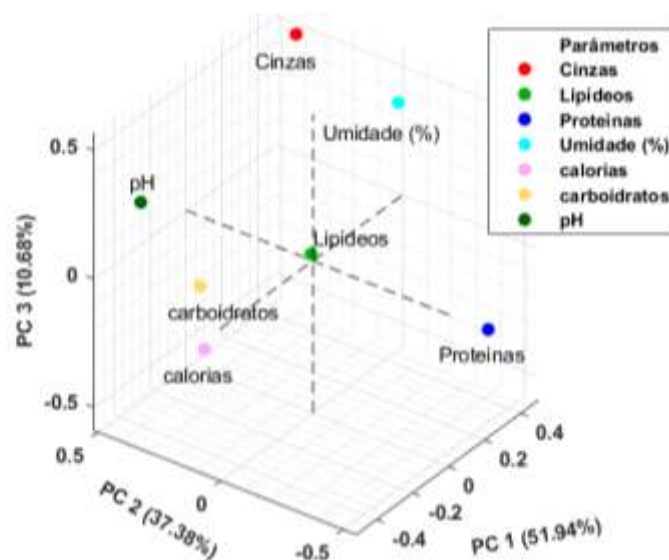


Figura 14 - Respetivos loadings.
 Fonte: Autorial Própria, 2025.

A amostra identificada como M1 (♦) representa o pólen apícola multifloral de Mirandela, enquanto a M2 (■) representa o pólen apícola multifloral de Trás-os-Montes (comercial). Representada como MO1 (▲) está a amostra de pólen apícola monofloral de Mirandela, sendo o pólen apícola monofloral do Egito representado por MO2 (▼). Para facilitar a visualização dos scores, a Figura 15 – (A) apresenta o gráfico de PC 1 vs PC 2, (B) PC 1 vs PC 3, e (C) PC 2 vs PC 3. Da mesma forma, para explicar quais parâmetros

são responsáveis pela diferenciação entre as amostras, os loadings estão apresentados em conformidade com os scores na Figura 16 – (A) PC 1 vs PC 2, (B) PC 1 vs PC 3, e (C) PC 2 vs PC 3.

Estudos de caracterização físico-química de amostras de pólen apícola demonstram consistentemente que a composição centesimal — incluindo lipídios, proteínas, cinzas e conteúdo energético — varia significativamente em função da origem botânica e geográfica das amostras. Assim, é plausível que uma amostra originária do Egito apresente scores distintamente positivos na PC 1 quando os loadings positivos dessa componente correspondem a lipídios, cinzas, proteínas e calorias, pois padrões semelhantes de variação foram observados em levantamentos comparativos de pólen multifloral e unifloral de diferentes regiões [50].

Em vários trabalhos que aplicaram análises físico-químicas e abordagens multivariadas (incluindo PCA) em coleções de pólen, verificou-se grande variabilidade interamostral nos teores de lipídios e cinzas; esses autores atribuem tal variabilidade à combinação de fatores florais (espécies visitadas pelas abelhas), condições climáticas e práticas de colheita/armazenamento. Portanto, a interpretação de que os loadings positivos na PC 1 (lipídios, cinzas, calorias, proteínas) estão vinculados à origem da amostra está em concordância com a literatura que relaciona composição química a diferenças botânicas e geográficas [50].

A separação observada na PC 2, que distingue a amostra multifloral comercial da multifloral de Mirandela com os parâmetros mais influentes sendo calorias, pH, cinzas e lipídeos (nesta ordem), é compatível com achados empíricos: pH e o conteúdo energético variam entre amostras comerciais e amostras regionais/frescas em função tanto da origem botânica quanto de fatores de processamento e armazenamento (secagem, exposição, mistura de lotes), que podem alterar acidez aparente, composição de açúcares e proporção de lipídios, impactando o valor energético calculado.

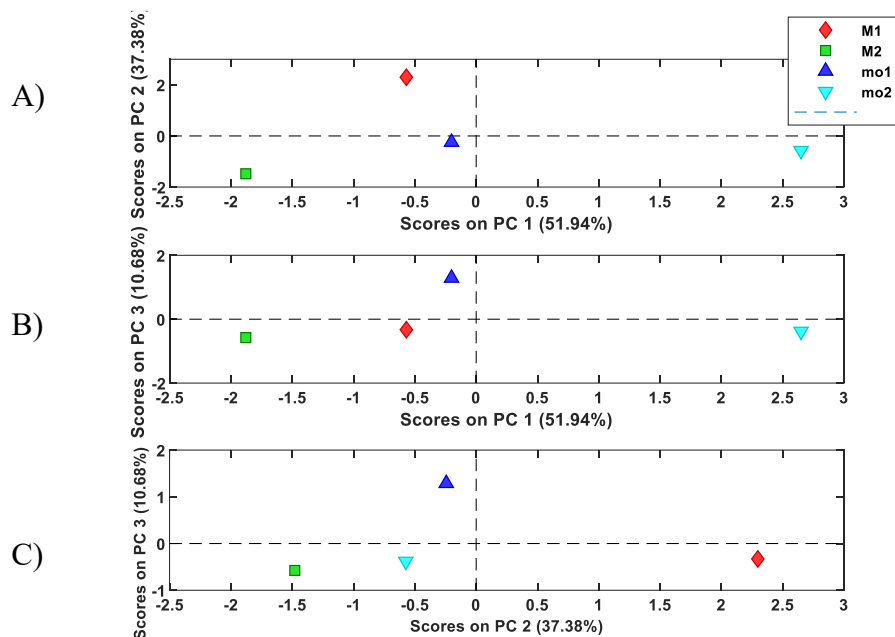


Figura 15 - Scores de (A) PC 1 vs PC 2; (B) PC 1 vs PC 3; (C) PC 2 vs PC 3.
Fonte: Autoria Própria, 2025.

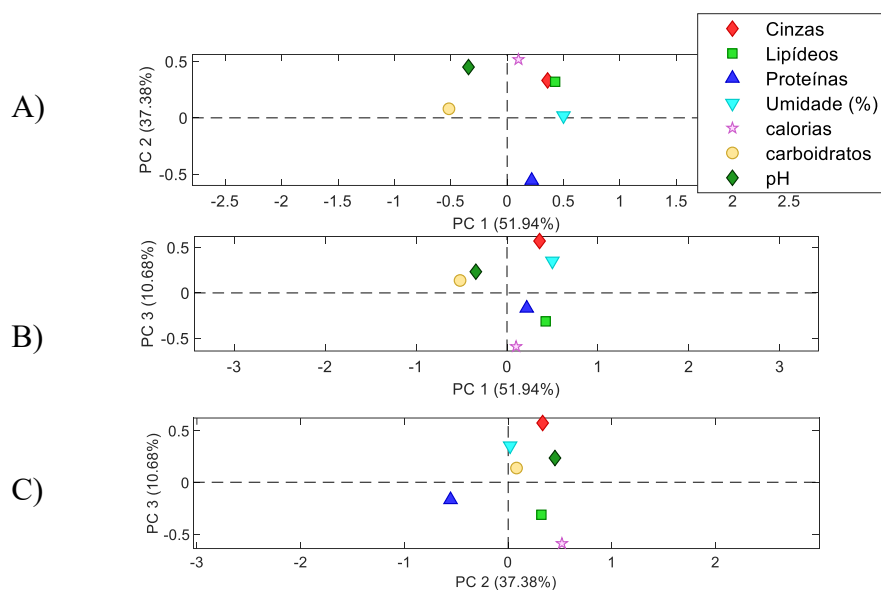


Figura 16 - Loadings de (A) PC 1 vs PC 2; (B) PC 1 vs PC 3; (C) PC 2 vs PC 3.
Fonte: Autoria Própria, 2025.

Observa-se que a PC 2 separa principalmente a amostra de pólen multifloral comercial da multifloral de Mirandela, uma vez que as amostras monoflorais apresentam scores próximos de zero nesta PC. Os parâmetros associados a estas diferenças são principalmente calorías, pH, cinzas e lipídeos (nesta ordem).

Na PC 3, a maior diferença observada está entre a amostra monofloral de Mirandela e a amostra multifloral comercial. Os parâmetros mais importantes associados à amostra monofloral são cinzas, umidade e pH, enquanto as calorias e os lipídeos são os parâmetros mais importantes associados à amostra comercial. Outro fato interessante que aparece na PC 3 é a relação entre as amostras multiflorais e a amostra monofloral do Egito, que mostraram alguma semelhança relacionada às calorias, aos teores de lipídeos e de proteínas.

Na PC 3, onde a maior diferença se dá entre a amostra monofloral de Mirandela (associada a cinzas, umidade e pH) e a amostra multifloral comercial (associada a calorias e lipídeos), pode-se propor a seguinte explicação: enquanto teores de cinzas, umidade e pH tendem a refletir características mais intrínsecas da flora local e das condições ambientais/colheita (por exemplo, solos ricos em certos minerais elevam a fração de cinzas; umidade e pH podem refletir secagem e contaminação microbiana), os lipídeos e o conteúdo calórico refletem a composição macronutricional das fontes florais dominantes e, em amostras comerciais multiflorais, da mistura de fontes coletadas e potenciais ajustes por processamento. Estudos que compararam amostras monoflorais e multiflorais encontraram exatamente esse tipo de divergência na contribuição relativa de cinzas/pH versus lipídios/calorias para discriminar amostras.

Além disso, a observada semelhança entre algumas amostras multiflorais e a amostra monofloral do Egito — em termos de calorias, lipídeos e proteínas — pode ser explicada por convergência das fontes florais (por exemplo, se a flora de certas áreas fornece pólen com perfil lipídico elevado) ou por práticas de manejo/armazenamento semelhantes que preservam/alteram proporções relativas de macronutrientes. A literatura de revisão e vários estudos experimentais demonstram que, mesmo entre regiões distintas, amostras de pólen provenientes de plantas com perfil vegetal nutritivo similar podem apresentar composição energética e lipídica comparável, o que explicaria a projeção conjunta nas componentes principais.

Por fim, recomenda-se cautela ao interpretar PCs em termos causais: a PCA indica combinações lineares de variáveis que melhor explicam a variância dos dados, mas não identifica, por si só, mecanismos biológicos. Para fortalecer a inferência de que a origem geográfica (localidade) é a causa das diferenças, é desejável complementar a PCA com análises adicionais, por exemplo: (i) identificação palinológica detalhada (para confirmar as espécies/constituintes florais dominantes em cada amostra), (ii) análises estatísticas

que testem a associação entre agrupamentos por localidade e medidas químicas (ANOVA multivariada / PERMANOVA), e (iii) regressões entre variáveis ambientais (solo, clima) e parâmetros químicos do pólen — todas abordagens usadas em estudos que tratam da discriminação geográfica de pólen.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitiram caracterizar de forma geral a composição físico-química e o perfil de aminoácidos livres do pólen apícola, demonstrando a sua importância como fonte nutricional tanto para o consumo humano quanto para a manutenção das colônias de abelhas. As análises evidenciaram que as amostras de pólen apícola possuem teores expressivos de proteínas, carboidratos e lipídios, bem como uma variedade considerável de aminoácidos essenciais e não essenciais.

Os valores de umidade observados indicaram uma estabilidade adequada e uma conservação apropriada das amostras, enquanto o pH levemente ácido se mostrou compatível a literatura referente ao pólen apícola, favorecendo para a sua durabilidade e qualidade. A concentração de cinzas revelou um conteúdo mineral equilibrado, o que demonstrou a influência que a origem botânica tem sobre o perfil químico das amostras de pólen apícola.

A análise dos aminoácidos permitiu quantificar aminoácidos relevantes, tais como prolina, fenilalanina, triptofano, leucina e lisina. A diversidade floral observada nas amostras multiflorais contribuiu para uma composição mais harmoniosa de nutrientes e para valores energéticos mais elevados, reforçando o papel central da origem botânica como fator determinante da qualidade nutricional do pólen.

A utilização de técnicas analíticas de elevada sensibilidade, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, mostrou-se adequada para a detecção e quantificação dos aminoácidos em concentrações reduzidas. A validação do método, expressa pelos baixos limites de detecção e quantificação, bem como pelos coeficientes de variação inferiores a 10% na maior parte dos compostos avaliados, confirmou a precisão, exatidão e reprodutibilidade das determinações cromatográficas. Assim, os resultados obtidos refletem com fiabilidade a composição real das amostras analisadas.

A aplicação da análise de componentes principais permitiu sintetizar as informações provenientes das variáveis físico-químicas e do perfil de aminoácidos, evidenciando padrões de agrupamento relacionados à origem floral das amostras. Esta abordagem multivariada reforçou a interpretação dos dados e demonstrou ser uma

ferramenta útil para a diferenciação e caracterização de pólen apícola, contribuindo para a consolidação das conclusões obtidas.

Conclui-se, portanto, que o pólen apícola apresenta composição nutricional equilibrada e propriedades que o qualificam como uma excelente fonte natural de proteínas, aminoácidos e vitaminas, podendo contribuir significativamente para a saúde humana e para o desenvolvimento sustentável da apicultura.

Investigações futuras poderão incluir um maior número de amostras e diferentes períodos sazonais, permitindo compreender com mais precisão a influência das condições ambientais na composição do pólen apícola. A integração de análises de aminoácidos e vitaminas poderá fornecer uma visão nutricional mais abrangente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. Martinho, C. Ferradeira, J. Catita, e A. Faustino-Rocha, “APICULTURA: revisão de literatura”, *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*, vol. 12, p. 1–17, 2022.
- [2] Nicolas. Vidal-Naquet, Bernard. Vallat, e Greg. Lewbart, “Honeybee veterinary medicine : apis mellifera L.”, p. 260, 2015.
- [3] C. Pech-Jiménez, “Nutritional influence on the defense system of *Apis mellifera*”, doi: 10.13140/RG.2.2.30656.28169.
- [4] A. N. Mortensen, B. Smith, e J. D. Ellis, “ENY-166/IN1102: The Social Organization of Honey Bees”. Acessado: 30 de janeiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/IN1102>
- [5] A. Mañaes, M. Pascual, e R. Hernández, *40 Q&A sobre Sanidad y producción apícola*. Madrid, 2018.
- [6] R. Owen, “The Australian beekeeping manual”, *Exisle Publishing Pty Lda*, Austrália, 2020.
- [7] J. André Lara Pereira *et al.*, “Apicultura em Números E Investigação Apícola em Números”.
- [8] A. Tomás, P. Russo-Almeida, e M. Vilas-Boas, “Avaliação do perfil de açúcares do mel de rosmaninho Português”, *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 40, n° SP, p. S195–S202, 2017, doi: 10.19084/rca16211.
- [9] E. C. F. Caminha, “A recolha de pólen e o impacto na produção de mel na região de Trás-os-Montes e Alto Douro”, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2014.
- [10] P. B. Olaitan, O. E. A. Adeleke, e O. Iyabo, “Honey: a Reservoir for Microorganisms and an Inhibitory Agent for Microbes”, 2007. [Online]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/5794975>

- [11] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, e J. A. Pérez-Álvarez, “Functional properties of honey, propolis, and royal jelly”, *J Food Sci*, vol. 73, nº 9, nov. 2008, doi: 10.1111/J.1750-3841.2008.00966.X.
- [12] S. Bogdanov, “Propolis: Origine, Production, Composition”. [Online]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/304012141>
- [13] P. Branco, *O milagre das abelhas - pela nossa saúde*, Edições Colibri. Lisboa, 2018.
- [14] M. Wytrychowski *et al.*, “Physicochemical characterisation of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding”, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 29, nº 2, p. 126–133, mar. 2013, doi: 10.1016/J.JFCA.2012.12.002.
- [15] A. H. Banskota, Y. Tezuka, e S. Kadota, “Recent progress in pharmacological research of propolis”, *Phytotherapy Research*, vol. 15, nº 7, p. 561–571, 2001, doi: 10.1002/PTR.1029.
- [16] D. Elieh Ali Komi, F. Shafaghat, e R. D. Zwiener, “Immunology of Bee Venom”, *Clin Rev Allergy Immunol*, vol. 54, nº 3, p. 386–396, jun. 2018, doi: 10.1007/S12016-017-8597-4.
- [17] K. Münstedt e S. Bogdanov, “Bee products and their potential use in modern medicine”, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, vol. 1, nº 3, p. 57–63, jul. 2009, doi: 10.3896/IBRA.4.01.3.01.
- [18] K. C. L. da S. Oliveira, “Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas anti-oxidantes como indicadores do processo de desidratação”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- [19] B. M. da Silva, “Processo de Polinização - Banco de Imagens da Casa das Ciências”. Acessado: 30 de janeiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.casadasciencias.org/imagem/9651>
- [20] M. Teresa *et al.*, “Pólen apícola Características da produção e da qualidade”, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Teresina, 2022. [Online]. Disponível em: www.embrapa.br/meio-norte

- [21] T. S. R. Orvalho, “Avaliação físico-química, nutricional e microbiológica de pólen apícola submetido a diferentes processos de conservação”, Politécnico de Leiria, 2023.
- [22] J. F. B. Fernandes, “Estudo da atividade antioxidante de pólen apícola”, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, 2015.
- [23] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods”, *J Apic Res*, vol. 47, nº 2, p. 154–161, jun. 2008, doi: 10.3896/IBRA.1.47.2.12.
- [24] M. Thakur e V. Nanda, “Composition and functionality of bee pollen: A review”, *Trends Food Sci Technol*, vol. 98, p. 82–106, abr. 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.001.
- [25] S. T. Carpes, “Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região do sul do Brasil”, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- [26] P. B. Dra Delia Rodriguez-Amaya Orientadora Marcelo Antonio Morgano Co-Orientador, “PÓLEN APÍCOLA BRASILEIRO: valor nutritivo e funcional, qualidade e contaminantes inorgânicos”, Campinas, 2010.
- [27] S. I. Anjum *et al.*, “Bee pollen as a food and feed supplement and a therapeutic remedy: recent trends in nanotechnology”, *Front Nutr*, vol. 11, jun. 2024, doi: 10.3389/fnut.2024.1371672.
- [28] M. S. Brys e A. Strachecka, “The Key Role of Amino Acids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology—A Review”, 1º de junho de 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/molecules29112605.
- [29] F. O. Bobbio e P. A. Bobbio, *Introdução á química de alimentos*, 2ª Edição. São Paulo, Brasil: Livraria Varela, 1989.
- [30] G. DeGrandi-Hoffman *et al.*, “Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies”, *J Insect Physiol*, vol. 109, p. 114–124, ago. 2018, doi: 10.1016/J.JINSPHYS.2018.07.002.

- [31] E. K. A. Taha, S. Al-Kahtani, e R. Taha, “Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia”, *Saudi J Biol Sci*, vol. 26, n° 2, p. 232–237, fev. 2019, doi: 10.1016/J.SJBS.2017.06.003.
- [32] S. Ghosh e C. Jung, “Nutritional value of bee-collected pollens of hardy kiwi, *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) and oak, *Quercus* sp. (Fagaceae)”, *J Asia Pac Entomol*, vol. 20, n° 1, p. 245–251, mar. 2017, doi: 10.1016/J.ASPEN.2017.01.009.
- [33] P. C. H. Hollman, J. H. Slangen, P. J. Wagstaffe, U. Faure, D. A. T. Southgate, e P. M. Finglas, “Intercomparison of methods for the determination of vitamins in foods. Part 1. Fat-soluble vitamins”, *Analyst*, vol. 118, n° 5, p. 475–480, 1993, doi: 10.1039/AN9931800475.
- [34] H. Van Den Berg, F. Van Schaik, P. M. Finglas, e I. De Froidmont-Görtz, “Third EU MAT intercomparison on methods for the determination of vitamins B-1, B-2 and B-6 in food”, *Food Chem*, vol. 57, n° 1, p. 101–108, set. 1996, doi: 10.1016/0308-8146(96)00145-8.
- [35] G. F. Combs, *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 4° ed. Ithaca, NY: Elsevier Science, 2012.
- [36] N. Rzetecka, E. Matuszewska, S. Plewa, J. Matysiak, e A. Klupczynska-Gabryszak, “Bee products as valuable nutritional ingredients: Determination of broad free amino acid profiles in bee pollen, royal jelly, and propolis”, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 126, 2024, doi: 10.1016/j.jfca.2023.105860.
- [37] A. M. G. Paramás, J. A. G. Bárez, C. C. Marcos, R. J. García-Villanova, e J. S. Sánchez, “HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen)”, *Food Chem*, vol. 95, n° 1, p. 148–156, mar. 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.008.
- [38] W. M. A. . Niessen, *Liquid chromatography--mass spectrometry*. Taylor & Francis, 2007.
- [39] A. Makarov, “Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis”, *Anal Chem*, vol. 72, n° 6, p. 1156–1162, mar. 2000, doi: 10.1021/ac991131p.

- [40] S. Gallien, E. Duriez, K. Demeure, e B. Domon, “Selectivity of LC-MS/MS analysis: Implication for proteomics experiments”, *J Proteomics*, vol. 81, p. 148–158, abr. 2013, doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.005.
- [41] Y. Wu, J. R. Engen, e W. B. Hobbins, “Ultra performance liquid chromatography (UPLC) further improves hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry”, *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 17, n° 2, p. 163–167, fev. 2006, doi: 10.1016/j.jasms.2005.10.009.
- [42] J. Louveaux, A. Maurizio, e G. Vorwohl, “Methods of Melissopalynology”, *Bee World*, vol. 59, n° 4, p. 139–157, jan. 2015, doi: 10.1080/0005772X.1978.11097714.
- [43] “ISO 24382:2023”, 2023. Acessado: 9 de novembro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/78544.html>
- [44] AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS., “Official methods of analysis.”, *Gaithersburg, MD: AOAC Internacional*, vol. 17, 2000.
- [45] G. Tomassi e N. Merendino, “Energy Values of Foods”, em *Cachexia and Wasting: A Modern Approach*, Milano: Springer Milan, p. 47–52. doi: 10.1007/978-88-470-0552-5_5.
- [46] L. R. C. Lima, C. Molineri, L. M. Vieira, U. Pinheiro, e F. F. Salles, “Phylogenetic analysis supports the monophyly of the South American mayfly genus *Brasilocaenis* Puthz, 1975 (Insecta: Ephemeroptera: Caenidae)”, *Zool Anz*, vol. 280, p. 78–94, maio 2019, doi: 10.1016/j.jcz.2019.04.001.
- [47] ICH, “ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”, nov. 2005.
- [48] H. Abdi e L. J. Williams, “Principal component analysis”, *WIREs Computational Statistics*, vol. 2, n° 4, p. 433–459, jul. 2010, doi: 10.1002/wics.101.
- [49] M. Ringnér, “What is principal component analysis?”, *Nat Biotechnol*, vol. 26, n° 3, p. 303–304, mar. 2008, doi: 10.1038/nbt0308-303.
- [50] I. T. Jolliffe, “Discarding Variables in a Principal Component Analysis. I: Artificial Data”, *Appl Stat*, vol. 21, n° 2, p. 160, 1972, doi: 10.2307/2346488.

- [51] R. Krell, “Value-added products from beekeeping.”, *Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations*, vol. 124, 1996.
- [52] V. Aylanc, S. I. Falcão, e M. Vilas-Boas, “Bee pollen and bee bread nutritional potential: Chemical composition and macronutrient digestibility under in vitro gastrointestinal system”, *Food Chem*, vol. 413, p. 135597, jul. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135597.
- [53] L. Haroune, S. Saibi, I. Rabbat, Y. Loranger, e M. L. Tissier, “Multidimensional assessment of nutritional composition, contaminants and biological properties of bee pollen”, *Applied Food Research*, vol. 5, nº 2, p. 101223, dez. 2025, doi: 10.1016/j.afres.2025.101223.
- [54] G. Di Pasquale *et al.*, “Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter?”, *PLoS One*, vol. 8, nº 8, p. e72016, ago. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0072016.
- [55] K. W. Stephen, K. D. Chau, e S. M. Rehan, “Dietary foundations for pollinators: nutritional profiling of plants for bee health”, *Front Sustain Food Syst*, vol. 8, jun. 2024, doi: 10.3389/fsufs.2024.1411410.
- [56] C. J. Seal, C. M. Courtin, K. Venema, e J. de Vries, “Health benefits of whole grain: effects on dietary carbohydrate quality, the gut microbiome, and consequences of processing”, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 20, nº 3, p. 2742–2768, maio 2021, doi: 10.1111/1541-4337.12728.
- [57] H. F. Erbersdobler, C. A. Barth, e G. Jahreis, “Legumes in human nutrition nutrient content and protein quality of pulses”, *Ernährungs Umschau*, vol. 64, nº 9, p. 134–139, set. 2017.
- [58] V. Aylanc, S. I. Falcão, S. Ertosun, e M. Vilas-Boas, “From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread”, *Trends Food Sci Technol*, vol. 109, p. 464–481, mar. 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.042.
- [59] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods”, *J Apic Res*, vol. 47, nº 2, p. 154–161, jun. 2008, doi: 10.3896/IBRA.1.47.2.12.