

Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola

Joana Filipa Monteiro da Rocha

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

Orientado por

Professor Doutor Altino Branco Choupina

Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho

**Bragança
2013**

“Penso 99 vezes e nada descubro. Deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio: e eis que a verdade se me revela.” Albert Einstein

Dedicatória

Aos meus Pais, porque a eles devo tudo o que sou hoje, pelos ensinamentos e apoio que me deram ao longo da vida. Pela dedicação e amor incondicional.

Dedico

Agradecimentos

É com grande satisfação e orgulho que agradeço a todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Altino Branco Choupina pela simpatia, dedicação e apoio profissional durante todas as fases deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho, pelo seu empenho e orientação em me manter pelos caminhos certos, pela sua amizade, simpatia, dedicação, disponibilidade, pela confiança que sempre me concedeu, ajuda e conhecimentos transmitidos, que sempre demonstrou ao longo da realização do trabalho.

À Mestre Ana Paula por todo o apoio, amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor Luís Dias, pela disponibilidade, simpatia, ajuda e conhecimentos transmitidos.

Ao Eng.º Jorge Sá Morais, pela disponibilidade, simpatia e conhecimentos transmitidos.

Ao António Filipe e Mestre Etelvina Pereira, pela disponibilidade, apoio, simpatia e ajuda.

A todas as funcionárias do Laboratório de Microbiologia e Biologia, D^a. Arminda, D^a. Fátima, D^a. Isabel e D^a. Amélia pela amizade, apoio e pelos bons momentos proporcionados.

Aos meus colegas do laboratório, Georgina, Vanessa e Ananias pelo apoio, auxílio, boa disposição e amizade, pelos conselhos e companhia, paciência e conhecimentos transmitidos ao longo do decorrer do trabalho.

Aos docentes do Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, da Escola Superior Agrária de Bragança, o meu muito obrigado pelos saberes que me foram transmitidos.

À Manuela pelo apoio no tratamento dos dados experimentais, paciência e disponibilidade.

Às minhas amigas, especialmente Sara, Rafaela, Sandra, Vânia e Andreia, por dividirmos e somarmos as dificuldades na conquista de mais um etapa na nossa vida, pela amizade, dedicação, diversão e alegria.

Ao Mário João que sempre me auxiliou em todas as dificuldades, pela força transmitida e constante ajuda, paciência, compreensão, amizade, incentivo e apoio demonstrado ao longo deste trabalho.

Por fim, mas muito importante, agradeço a toda a minha família. Aos meus pais por todos os esforços que fizeram para eu chegar até aqui e pela sua preciosa compreensão e amor incondicional. Aos meus Irmãos pelo carinho, amizade, apoio e compreensão em todos os momentos difíceis, pelas alegrias e companheirismo. E aos meus sobrinhos, Rita e Hugo, pelos sorrisos e momentos bem passados, que sempre me animaram.

A todos que, de qualquer forma, me ajudaram e incentivaram neste percurso e que não se encontram aqui mencionados, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

A todos, o meu sincero, muito obrigada!!!

Índice Geral

Dedicatória	III
Agradecimentos	IV
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	X
Lista de abreviaturas e símbolos	XII
Resumo	XIII
Abstract	XV
Capítulo 1	1
1. Revisão Bibliográfica	4
1.1 As abelhas e o pólen.....	4
1.2 Produção e comercialização do pólen apícola.....	6
1.3 Composição do pólen apícola	6
1.3 Microbiota do pólen	8
1.4 Compostos bioativos no pólen apícola.....	11
1.5 Benefícios do pólen apícola	15
1.6 Métodos de conservação do pólen apícola.....	17
1.6.1 Congelação	18
1.6.2 Secagem.....	19
Capítulo 2	22
2. Material e Métodos	23
2.1 Amostragem	23
2.2 Análise polínica.....	23
2.3 Avaliação da Qualidade Microbiológica.....	24
2.3.1 Preparação das amostras	24

2.3.2	Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos	24
2.3.3	Contagem de Bolores e Leveduras	25
2.3.4	Pesquisa de Clostrídios sulfito-redutores	25
2.3.5	Contagem de Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	26
2.3.6	Contagem e pesquisa <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.3.7	Isolamento e Identificação de Leveduras	27
2.4	Análises Físico-Químicas.....	27
2.4.1	Humidade	27
2.4.3	pH.....	28
2.4.4	Atividade da Água.....	29
2.4.5	Açúcares Redutores	29
2.4.6	Proteínas	29
2.4.7	Determinação dos Ácidos Gordos – Lípidos.....	30
2.4.8	Hidratos de Carbono.....	31
2.4.9	Valor energético	31
2.5	Avaliação das propriedades bioativas do pólen apícola.....	31
2.5.1	Preparação dos Extratos Metanólicos do Pólen (EMP).....	31
2.5.2	Propriedades bioativas.....	32
2.5.2.1	Compostos Fenólicos Totais	32
2.5.2.2	Flavonóides Totais	33
2.5.2.3	Atividade Antioxidante.....	33
2.5.2.3.1	Método do DPPH	34
2.5.2.3.2	Método do Poder Redutor	34
2.5.3.4	Atividade antimicrobiana.....	35
2.6	Extração dos compostos fenólicos por HPLC.....	36
2.6.1	Análise por HPLC	37
2.7	Análise Estatística	38

Capítulo 3	39
3. Resultados e Discussão	40
3.1 Análise Polínica.....	40
3.2 Contaminação microbiana.....	41
3.3 Composição físico-química do pólen.....	44
3.4 Perfil de ácidos gordos	49
3.4 Correlação entre a composição físico-química e a microbiota do pólen apícola	54
3.6 Identificação de leveduras	58
3.7 Propriedades Bioativas do pólen	58
3.7.1 Análise dos compostos fenólicos e flavonóides totais	58
3.7.2 Atividade Antioxidante	60
3.7.2.1 Atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH	60
3.7.2.2 Atividade antioxidante determinada pelo método do Poder redutor ...	61
3.7.3 Correlação entre o teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade antioxidante do pólen apícola	62
3.7.4 Atividade Antimicrobiana	64
3.7.5 Correlação entre o teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade antimicrobiana do pólen apícola.....	68
3.8 HPLC.....	69
Capítulo 4	75
Considerações finais	76
Referências Bibliográficas	78
ANEXO I.....	92
ANEXO II	95

Índice de figuras

Figura 1. Pólen apícola	4
Figura 2. Abelha a transportar os grãos de pólen	5
Figura 3. Grãos de pólen apícola	7
Figura 4. Estrutura química dos principais ácidos fenólicos	13
Figura 5. Estrutura química dos Flavonóides	14
Figura 6. Estruturas químicas das principais classes dos flavonóides	14
Figura 7. Caça-pólens	17
Figura 8. Secador do pólen apícola	20
Figura 9. Grãos de pólen.	24
Figura 10. Galerias API 20C AUX.....	27
Figura 11. Destilador Kjeldahl.	30
Figura 12. Unidade de extração B-815 e Unidade de determinação B-820.	31
Figura 13. Extratos metanólicos das amostras de pólen estudadas.	32
Figura 14. Cromatógrafo de alta eficiência com detetor de Diodo-Array.....	38
Figura 15. Representação dos pólen obtidos nas diferentes amostras de pólen.....	40
Figura 16. Microplacas com os resultados referentes às leveduras e bactérias.....	68
Figura 17. Compostos fenólicos identificados no pólen apícola desidratado e congelado após extração com amberlite.	71
Figura 18. Compostos fenólicos identificados no pólen apícola desidratado e congelado após extração metanólica.....	72

Índice de tabelas

Tabela 1. Composição química de pólen apícola português desidratado.	8
Tabela 2. Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos nas amostras de pólen desidratado.....	43
Tabela 3. Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos na amostra de pólen desidratado e congelado.....	44
Tabela 4. Composição química das amostras de pólen apícola desidratado.	47
Tabela 5. Composição química da amostra de pólen apícola desidratado e congelado.	49
Tabela 6. Perfil dos ácidos gordos das amostras de pólen desidratado.	52
Tabela 7. Perfil dos ácidos gordos da amostra de pólen desidratado e congelado.	53
Tabela 8. Matriz de correlação de Pearson entre a composição físico-química e os parâmetros microbiológicos para as amostras de pólen desidratado.....	55
Tabela 9. Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros físico-químicos e os microbiológicos para a amostra de pólen congelado.....	57
Tabela 10. Leveduras isoladas nas amostras de pólen apícola desidratado e congelado	58
Tabela 11. Teor de fenóis e flavonóides totais e valores de EC_{50} obtidos para a atividade antioxidante nas amostras de pólen desidratado.	60
Tabela 12. Teor de fenóis e flavonóides totais e valores de EC_{50} obtidos para a atividade antioxidante na amostra de pólen desidratado e congelado.	60
Tabela 13. Matriz de correlação de Pearson, entre o teor de fenóis e flavonóides totais e atividade antioxidante (DPPH e Poder redutor) nas amostras de pólen desidratado.....	63
Tabela 14. Matriz de correlação de Pearson, entre o teor de fenóis e flavonóides totais e atividade antioxidante (DPPH e Poder redutor) na amostra de pólen congelado.....	63
Tabela 15. Atividade antimicrobiana das amostras de pólen desidratado contra bactérias e leveduras.	67
Tabela 16. Atividade antimicrobiana da amostra de pólen desidratado e congelado contra bactérias e leveduras.	67
Tabela 17. Matriz de correlação de Pearson, entre os compostos fenólicos, flavonóides e atividade antimicrobiana (microrganismos em estudo).	69
Tabela 18. Tempo de retenção (T.r) e compostos fenólicos identificados por HPLC nas amostras de pólen apícola desidratado e congelado após extração com amberlite.	71

Tabela 19. Tempo de retenção (T.r) e possíveis famílias de compostos identificados por HPLC nas amostras de pólen apícola após extração com metanol..... 73

Lista de abreviaturas e símbolos

NaCl	Cloreto de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
NaOH	Hidróxido de Sódio
Na₂CO₃	Carbonato de Sódio
NaNO₂	Nitrito de Sódio
AlCl₃.H₂O	Cloreto de Alumínio hidratado
KOH	Hidróxido de Potássio
MeOH	Metanol
MeOH-EMP	Metanol - extrato metanólico de pólen
EMP	Extrato metanólico de pólen
DNS	Ácido 3,5- dinitrossalicílico
mL	Mililitros
mg	Miligramas
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
g	Gramas
mg/mL	Miligrama por mililitro
nm	Nanómetro
rpm	Rotação por minuto
GAE	Equivalente em ácido gálico por grama de extrato de pólen
CAE	Equivalente em catequina por grama de extrato de pólen
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de Díodo
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EC₅₀	Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH
CIM	Concentração mínima inibitória
ESA	Escola Superior Agrária de Bragança

Resumo

O pólen apícola é um dos alimentos naturais mais utilizado na medicina tradicional, em práticas clínicas, nas indústrias alimentar e farmacêutica. O presente estudo teve como objetivo comparar o efeito de diferentes condições de armazenamento nas características nutricionais, microbiológicas e nas propriedades bioativas do pólen apícola de modo de produção biológica. Teor de humidade, cinzas, a_w , pH, açúcares redutores, proteínas, lípidos, ácidos gordos, hidratos de carbono e valor energético, foram os parâmetros analisados. Os microrganismos estudados foram: aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e clostrídios sulfito redutores. A família botânica predominante no total de 8 famílias identificadas foi a *Rosáceae*. Os pólenes estudados são nutricionalmente bem equilibrados, uma vez que os parâmetros físico-químicos encontram-se dentro do estipulado por lei, à exceção da humidade do pólen desidratado. Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foram os mais abundantes em todas as amostras. Os pólenes revelaram uma qualidade microbiológica adequada. Os indicadores de qualidade sanitária e as espécies toxigénicas estavam ausentes em todas as amostras em estudo, sugerindo que o produto é seguro para o consumidor. O pólen congelado foi o que apresentou maior teor em compostos fenólicos totais ($48,40 \pm 0,39$ mg GAE/g). Em relação ao teor de flavonóides totais, o pólen que apresentou maior teor foi o desidratado ($6,99 \pm 0,33$ mg CAE/g). Relativamente à atividade antioxidante determinada pelo método do poder redutor, o pólen desidratado foi o que mais se destacou ($EC_{50} = 2,04 \pm 0,02$ mg/mL), enquanto que, o pólen que apresentou o maior efeito bloqueador foi o congelado ($EC_{50} = 0,74 \pm 0,01$ mg/mL). Os extratos metanólicos de pólen apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos em estudo (*Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cândida parapsilosis*, *Picha membranifaciens*, *Zygosaccharomyces mellis*), apresentando as bactérias Gram-negativas maior resistência. A quercitina foi o composto fenólico predominante quando se utilizou a Amberlite XAD-2 na extração, enquanto que, na extração metanólica foram identificadas possíveis famílias de compostos, sendo as flavonas e a crisina mais frequentes.

Palavra-chave: pólen apícola; análise polínica; composição nutricional; ácidos gordos; análise microbiológica; propriedades bioativas; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; HPLC.

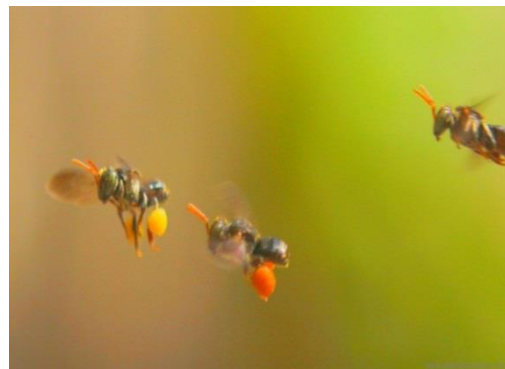
Abstract

The bee pollen is one of the natural foods more used in medical folk, clinical practises, food industry and pharmaceuticals. The present study aims to compare the effects of different conditions of storage in nutritional characteristics, microbiologic and in bioactive properties of bee pollen of biologic production mode. Content of humidity, ashes, a_w , pH, reducing sugars, proteins, lipids, fat acids, carbohydrates and energetic value, were the analyzed parameters. The studied microorganisms were: mesophylls, aerobic, yeast and mold, fecal coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and sulphite reducing clostridia. The prevailing botanic family in total of 8 identified families was *Rosáceae*. The studied pollens are nutritionally well balance, considering that physical and chemical parameter are within the prescribed by law, except for pollen dehydrated humidity. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) were the most abundant in all samples. Pollens revealed an adequate microbiological quality. The indicators of sanitary quality and the toxigenic species were absent in all samples analysed, suggesting that the product is safe for the consumer. The frozen pollen showed the highest content in phenolic compounds ($48,40 \pm 0,39$ mg GAE/g). Concerning the content of total flavonoids, the pollen which presented higher content was the dehydrated ($6,99 \pm 0,33$ mg CAE/g). Regarding the antioxidant activity determined by the method of reducing power dehydrated pollen was the one that stood out ($EC_{50} = 2,04 \pm 0,02$ mg/mL), whereas the frozen pollen showed higher blocking effect ($EC_{50} = 0,74 \pm 0,01$ mg/mL). The methanol extracts of pollen showed antimicrobial activity against all microorganisms studied (*Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cândida parapsilosis*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces mellis*), presenting the Gram-negative bacteria greater resistance. The quercetin was the predominant phenolic compound when using the Amberlite extraction XAD-2, whereas in methanol extraction were identified possible families of compounds, being the most frequent flavones and chrysin.

Keywords: bee pollen, pollen analysis, nutritional compound, fatty acids, microbiologic analysis, bioactive properties, antioxidant activity, antimicrobial activity, HPLC.



Capítulo 1



Introdução Geral

A apicultura Portuguesa é um dos setores da agricultura que mais resistência e persistência tem demonstrado ao longo da última década.

Atualmente é vista essencialmente como uma atividade ecológica, que pode ser desenvolvida em, praticamente, todo o espaço geográfico, não sendo destrutiva como a maioria das atividades rurais, e é uma das poucas atividades valiosas do ponto de vista económico, social e ambiental.

O pólen apícola é um produto da colmeia atualmente pouco valorizado em Portugal pela maioria dos apicultores, devido ao desconhecimento dos atributos que este produto possui e à falta de conhecimentos técnicos. Apesar de ser utilizado desde há muitos anos como um bom suplemento alimentar por se destacar com atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

A caracterização físico-química, microbiológica e a avaliação das propriedades terapêuticas do pólen apícola é importante quer no controlo de qualidade quer na produção do pólen Português para possível utilização nas indústrias alimentares, farmacêuticas e ainda no meio ambiente como bioindicador.

Apesar de todas as propriedades atribuídas ao pólen, Portugal carece de legislação para este produto da colmeia. A necessidade de elaborar legislação relativa a este produto é elevada, tendo em conta o crescimento exponencial dos apicultores em Portugal.

Com este trabalho pretende-se contribuir para a elaboração de normas e leis, bem como, estudar as propriedades bioativas do pólen apícola de modo de produção biológica sujeito a dois processos de conservação, o que permitirá valorizar este produto apícola quer a nível nacional quer internacional.

Objetivo global

Este trabalho teve como objetivo global, estudar o efeito de dois processos de secagem nas características nutricionais e na qualidade microbiológica do pólen apícola de produção biológica.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos podem-se considerar os seguintes aspetos:

- ✎ Caracterização polínica;
- ✎ Caracterização físico-química;
- ✎ Determinação dos ácidos gordos;
- ✎ Avaliação da qualidade microbiológica;
- ✎ Identificação dos compostos fenólicos;
- ✎ Avaliação das propriedades bioativas.

Enquadramento

Após uma breve introdução geral ao tema, no primeiro capítulo apresentamos uma revisão bibliográfica sobre: o pólen apícola, caracterização e microbiota, propriedades bioativas e breve descrição dos métodos de conservação. No segundo capítulo procedeu-se à descrição das metodologias utilizadas para a realização do trabalho experimental. No terceiro capítulo apresentam-se os resultados obtidos e a respetiva discussão, recorrendo a comparação com trabalhos realizados por outros investigadores. Por fim, no quarto capítulo estão sumariadas as principais conclusões, tendo em conta os objetivos.

1. Revisão Bibliográfica

1.1 As abelhas e o pólen

O pólen apícola resulta da aglutinação do pólen das flores (Özcan *et al.*, 2004), com pequenas quantidades de néctar ou mel e substâncias salivares pelas abelhas operárias (Krell, 1996; González *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008; Carpes *et al.*, 2008; Correia-Oliveira *et al.*, 2008; Devi *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2011; Feás *et al.*, 2012; Arruda *et al.*, 2013) (Fig.1).



Figura 1. Pólen apícola (fonte: <http://www.polenectar.com/default.asp>).

A abelha (*Apis mellifera*) utiliza o pólen como fonte de proteínas, hidratos de carbono, lípidos (ácidos gordos e esteróis), vitaminas, minerais (Abouda *et al.*, 2011; Hassam, 2011), e fitoquímicos (carotenóides, flavonóides e fitosteróis) (Kacániová *et al.*, 2012).

O pólen apícola é um pó fino e colorido (amarelo, verde, castanho) devido à diversidade das espécies botânicas visitadas pelas abelhas. Apresenta diversas formas e dimensões (Ribeiro *et al.*, 2007; Kacániová *et al.*, 2012). A cor do grão de pólen é determinada pela presença de pigmentos, nomeadamente flavonóides ou carotenóides (Montenegro *et al.*, 1997).

O pólen das flores é recolhido pelos pêlos do corpo das abelhas quando contactam com os estames, posteriormente aglutinado e transportado para a colmeia, onde é colocado nos alvéolos dos favos de mel (LeBlanc *et al.*, 2009) e, compactado até obter uma massa espessa. Esta massa passa por várias transformações, devido à humidade e temperatura do interior da colmeia, e à ação das secreções salivares das abelhas, que são ricas em enzimas. No final das transformações, a massa é designada por pão das abelhas (Vicenzi, 2004) (Fig. 2).

O pão de abelhas é utilizado como única fonte de proteína das abelhas (Loper *et al.*, 1980; Estevinho *et al.*, 2012).

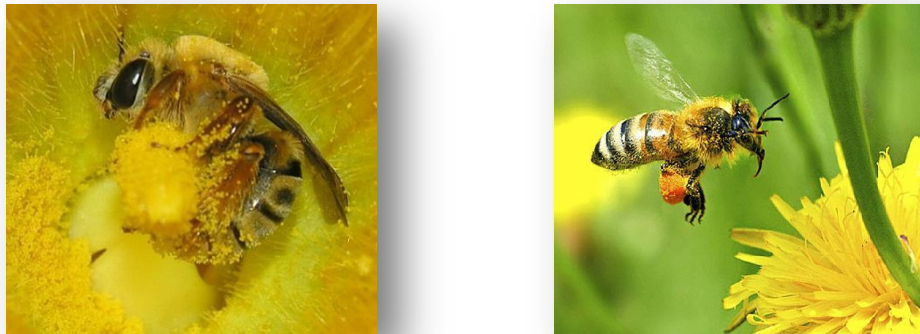


Figura 2. Abelha a transportar os grãos de pólen (fonte: www.alecrimdocampo.com.br e www.chrisduran.com.br).

O pólen é extremamente importante para a colmeia, além de servir de alimento às larvas (Luz *et al.*, 2010), proporciona nutrientes importantes, como é o caso das proteínas (Cook *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2005; Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Modro *et al.*, 2007; Ministério da Agricultura do desenvolvimento Rural e das Pescas 2007; FNAP 2010), necessárias à manutenção e desenvolvimento das colónias (Cook *et al.*, 2003). Na ausência de pólen, as abelhas recorrem às suas reservas, nomeadamente aos tecidos do corpo (Marchini *et al.*, 2006; Modro *et al.*, 2007).

1.2 Produção e comercialização do pólen apícola

A produção mundial de pólen apícola é de aproximadamente 1500 toneladas por ano, sendo o maior produtor mundial a Espanha, seguindo-se a China, Austrália e da Argentina (Estevinho *et al.*, 2012).

Ao nível do comércio mundial, os maiores exportadores mundiais são a Espanha, China, Argentina e Hungria, e os principais importadores os EUA, o Reino Unido, a Alemanha, a França e a Itália (Ministério da Agricultura do desenvolvimento Rural e das Pescas 2010).

No mercado Português ainda não existe muita oferta de pólen apícola, devido quer à falta de informação sobre os sistemas de produção e conservação, quer à falta de conhecimento sobre a sua composição e propriedades terapêuticas.

1.3 Composição do pólen apícola

O consumidor é cada vez mais exigente relativamente à qualidade dos produtos que consome. Verifica-se o aumento do consumo de produtos de origem natural por serem menos agressivos para a saúde (Packer *et al.*, 2007).

Devido à importância nutricional e funcional dos componentes existentes nos alimentos (Souza *et al.*, 2004), é de extrema importância controlar e inspecionar todas as etapas de processamento, armazenamento e distribuição, de modo a assegurar aos consumidores alimentos com todos os nutrientes disponíveis e, em conformidade com as suas necessidades mantendo as propriedades organoléticas e a qualidade microbiológica (Arruda *et al.*, 2013).

O pólen (Fig. 3) é considerado monofloral, quando mantém as propriedades organoléticas (González-Martín *et al.*, 2007) e bioquímicas da planta original. O pólen heterofloral tem propriedades bioquímicas variáveis, devido às abelhas visitarem uma grande variedade de flores (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Carpes *et al.*, 2012).



Figura 3. Grãos de pólen apícola (fonte: www.zeroporcento.com.br).

Convém salientar que, a composição do pólen apícola depende da origem botânica e geográfica, da época de colheita, do meio ambiente (Estevinho *et al.*, 2012), das condições climáticas, da idade da planta (Isidorov *et al.*, 2009), dos métodos de extração, do período de armazenamento (Herbert *et al.*, 1978), do tipo de solo e da atividade do apicultor (Feás *et al.*, 2012). Segundo Panizzi e Parra (2009) os grãos de pólen anemófilos apresentam menor teor proteico do que os zoófitos, embora os grãos de pólen anemófilos sejam frequentemente recolhidas por *Apis mellífera*.

O pólen apícola é constituído por proteínas (Loper *et al.*, 1980; Szczęśna, 2006), é dos poucos alimentos que possui todos os aminoácidos essenciais (Estevinho *et al.*, 2012), é o caso da lisina, triptofano, histidina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, ácido glutâmico, arginina, cistina, trionina, valina (Ribeiro *et al.*, 2007). Possui hidratos de carbono, sendo os mais abundantes a glicose e a frutose (González-Martín *et al.*, 2007), lípidos (maioritariamente ácido mirístico, linoleico, linolénico, palmítico e oleico) (Szczęśna, 2006; Devi *et al.*, 2010), açúcares (Silva *et al.*, 2006), fibras, minerais como o fósforo, cálcio, magnésio, ferro, cobre, manganésio, zinco, selénio (Keller *et al.*, 2005), boro, iodo, cromo (Szczęśna, 2007), oligominerais (cobalto, níquel, silício, titânio) (Ribeiro *et al.*, 2007). As vitaminas antioxidantes (β – caroteno, pró-vitamina A, C e E) (Melo *et al.*, 2010; Hani *et al.*, 2012), vitaminas D e do complexo B solúveis em água, corantes, enzimas e coenzimas (Özcan *et al.*, 2004). Compostos fenólicos (Carpes *et al.*, 2007), nomeadamente, flavonóides (Kroyer *et al.*, 2001) carotenóides, terpenos e fitoesteróis (Morais *et al.*, 2011) estão também presentes neste produto da colmeia (Tabela1).

Tabela 1. Composição química de pólen apícola português desidratado.

	Referências		
	1	2	3
Humidade (%)	N.a	7,3	16,84
Cinzas (%)	2,9	2,1	3,2
Açúcares redutores (%)	N.a	33,3	47,2
Proteínas (%)	21,8	20,3	30
Lípidos (%)	5,2	2,81	2,82

1- Feás *et al.* (2012);

2- Nogueira *et al.* (2012);

3- Morais (2009);

N.a – Não analisado.

Em Portugal não existem especificações para o pólen apícola pelo que iremos considerar a legislação do Brasil, Argentina, Suíça, Bulgária, Espanha (Féas *et al.*, 2012) e da Polónia (Arruda *et al.*, 2013), pois são os únicos países que estabeleceram padrões oficiais de qualidade, ou seja, que reconhecem o pólen legalmente.

No Brasil, o pólen apícola para ser comercializado tem de apresentar os seguintes requisitos: humidade máxima de 30% para pólen fresco e 4% para pólen seco. Teor em cinzas valor máximo de 4%, teor em proteínas mínimo de 8% e teor em açúcares totais de 14,5 a 55%. Para os lípidos o teor mínimo é 1,8% variando o pH entre 4 a 6.

Estudos efetuados no pólen apícola português observou-se que apresenta: 5 a 30% de proteínas, 10 e 40% de hidratos de carbono, 1 a 5 % de lípidos e 20 a 26 % de açúcares redutores (Estevinho *et al.*, 2012).

1.3 Microbiota do pólen

A qualidade microbiana é um dos critérios mais exigentes relacionados com a segurança, uma vez que altera as propriedades do produto (Rodrigues *et al.*, 2008) além de fornecer informações que permitem avaliar as condições de processamento,

armazenamento e distribuição do produto. O consumidor preocupa-se cada vez mais com a qualidade e segurança dos alimentos (Melo *et al.*, 2011), devido ao aumento da ocorrência de surtos de doenças causadas por microrganismos patogênicos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Para aumentar a aceitabilidade dos produtos apícolas no mercado, contribuindo deste modo para a sua valorização é necessário garantir não só a sua qualidade nutricional mas também a sua segurança microbiológica (Correia-oliveira *et al.*, 2008).

O pólen apesar de ter bastantes benefícios para a saúde, é necessário que a manipulação seja adequada, pois este produto é suscetível a contaminações ambientais e ao crescimento de microrganismos devido, sobretudo, ao seu elevado teor de nutrientes. De facto, o pólen está exposto a contaminações microbianas, que podem ter origem nas abelhas, materiais vegetais, insetos, animais, manipulação e equipamentos agrícolas (Hani *et al.*, 2012).

Os microrganismos de interesse sanitário e os responsáveis pela deterioração dos alimentos, diferem na fonte bem como nas características bioquímicas. Os alimentos nem sempre apresentam sinais de contaminação, no entanto podem funcionar como um veículo transmissor de microrganismos potencialmente patogênicos ou conter quantidades de toxinas capazes de causar doenças ao consumidor (Mossel e Garcia, 1985; Mossel *et al.*, 1995; Eifert *et al.*, 2006).

A proliferação dos microrganismos depende das características do produto, e o seu desenvolvimento é influenciado pelos parâmetros intrínsecos (pH, a_w e nutrientes), extrínsecos (temperatura e humidade) e pelo processo de conservação (Sinell, 1980).

Os microrganismos aeróbios mesófilos são indicadores do grau de deterioração e fornecem informação sobre a higiene durante todas as fases de processamento do pólen, além de desempenharem um papel determinante no tempo de vida de prateleira do produto.

No que diz respeito aos Clostrídios são bactérias Gram-positivas, anaeróbios formadores de esporos sendo, mais resistentes às condições ambientais adversas. Por esses motivos são indicadores (*C. perfringens*) de poluição hídrica de origem fecal, remota ou intermitente, devido aos longos períodos de permanência e às condições de sobrevivência dos seus esporos (Martins *et al.*, 1991). Ao nível da saúde pública existem duas espécies transmitidas pelos alimentos causadores de doenças,

nomeadamente, o *C.botulinium* e *C. perfringens*. Segundo a literatura consultada (Nogueira *et al.*, 2012; Féas *et al.*, 2012; Estevinho *et al.*, 2012), nunca foi detetada a presença deste grupo de microrganismos.

Os coliformes são um grupo de bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporulados, crescem na presença de sais biliares e fermentam a lactose com produção de ácido e gás. A presença de coliformes nos alimentos é indicadora de contaminação durante o processamento do alimento. Este tipo de indicador é amplamente utilizado na indústria alimentar (Franco e Landgraf, 1996). O grupo dos coliformes inclui: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*.

Atualmente *Escherichia coli* é reconhecida como uma espécie bacteriana que provoca no Homem infeções de origem alimentar grave. É provavelmente a fonte de contaminação mais importante na manipulação dos alimentos. Esta bactéria integra a microflora do trato intestinal do Homem e dos animais. É usada como indicador de qualidade sanitária ou contaminação fecal, e não representam por si só um perigo para a saúde, servindo antes como indicadores da presença de outros organismos causadores de problemas para a saúde.

Staphylococcus aureus são bactérias anaeróbios facultativos, no entanto, multiplicam-se a uma elevada taxa de oxigénio. A temperatura ideal para a sua multiplicação é de 30°C a 37°C, a mesma do corpo humano (Doyle, 1989). A intoxicação alimentar com estafilococcus causado pelo *S. aureus* é um dos tipos de intoxicação alimentar mais comum em todo o mundo. A deteção e enumeração deste microrganismo ajuda a fornecer informação sobre o potencial risco de saúde nos alimentos, assim como representa um indicador de falta de higiene. O *S. aureus* é resistente ao processo de congelação e descongelação, sobrevivendo em alimentos conservados a temperaturas inferiores a -20°C (Mossel *et al.*, 1995).

Bacillus megaterium, *B. subtilis*, *B. circulans* e *B. licheniformis* foram as principais bactérias encontradas por Gilliam *et al.* (1990) em pólen embalado do Panamá, sendo as abelhas a principal fonte de contaminação. *Bacillus* apesar de menos frequentes na microbiota do pólen, do que as leveduras são igualmente importantes devido à sua atividade metabólica, especialmente, no que diz respeito à produção de enzimas proteolíticas, lipolíticas e glicosidasas (Gilliam, 1979).

Os bolores, nomeadamente *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* são os microrganismos mais abundantes. Rodrigues *et al.* (2008) em amostras de pólen do Brasil detetaram a presença de *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides* em 100 e 67% das amostras, respetivamente. De facto, as condições de conservação deste produto devem ser adequadas, pois se a a_w e a temperatura não forem as mais corretas os fungos multiplicam-se podendo, algumas espécies produzir toxinas. O pólen congelado contém muita água, tornando-se, um meio propício à multiplicação de fungos (Sert *et al.*, 2009). No entanto, se o teor de água do pólen for baixo pode rancificar (Morgano *et al.*, 2011).

As micotoxinas podem provocar intoxicações e danos agudos ou crónicos ao Homem. Entre as micotoxinas, as aflatoxinas e ocratoxina A (OTA) são as mais perigosas devido à elevada toxicidade (González *et al.*, 2005). Segundo este autor, as fases críticas para a contaminação do pólen por fungos, são a permanência por longos períodos nos caça-pólenes, o tempo e condições de secagem. Na primeira fase a humidade relativa do pólen pode aumentar, na segunda fase, deve evitar-se a secagem ao ar livre, porque a temperatura é baixa. Os fatores referidos anteriormente favorecem quer o crescimento dos fungos quer a produção de micotoxinas.

A época de colheita do pólen nas colmeias tem também influência na contaminação por bolores e leveduras. Sendo assim, os processos de conservação devem ser melhorados de modo a permitir a obtenção de produtos isentos de contaminações microbiológicas (Nogueira, 2012).

Hervatin (2009) observou a predominância de bolores e leveduras, seguidos por *Bacillus cereus* e por coliformes totais em amostras de pólen do Brasil.

Até ao momento, não existe normas nem legislação, sobre a aplicação de boas práticas de fabrico, procedimentos de higienização e análises de perigos e pontos críticos de controlo para produtos da colmeia, há exceção do mel.

1.4 Compostos bioativos no pólen apícola

O pólen, bem como os outros produtos da colmeia, têm merecido particular atenção por parte dos investigadores de todo o mundo, devido às suas propriedades

terapêuticas (Carpes *et al.*, 2007), nomeadamente, atividade antibacteriana (Özcan *et al.*, 2004; Basim *et al.*, 2006; Kacániová *et al.*, 2012), antifúngica, anti-inflamatória, anticancerígena, anti-radiação (Feás *et al.*, 2012), antiviral, antialérgica (Kroyer *et al.*, 2001), estrogénica (Cushnie *et al.*, 2005) e imunomoduladora (Fatrocová *et al.*, 2013).

Carpes *et al.* (2009) e Freire *et al.* (2012) demonstraram que a ação biológica e os efeitos terapêuticos do pólen estão relacionados com a presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos.

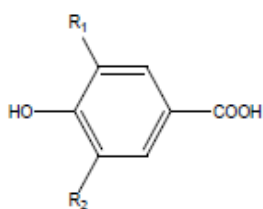
1.4.1 Compostos fenólicos totais

Em termos de proteção dos sistemas biológicos, os principais compostos com propriedades terapêuticas encontrados no pólen apícola são os compostos fenólicos (Menezes, 2009).

Os compostos fenólicos, são considerados benéficos para a saúde humana, porque diminuem o risco de doenças degenerativas, reduzindo o stress oxidativo e a inibição da oxidação de macromoléculas (Pereira *et al.*, 2007). São substâncias abundantes no reino vegetal, essenciais ao crescimento e reprodução, além de possuírem atividade antimicrobiana e de contribuírem para a pigmentação (Ângelo, 2007). Nos alimentos, são responsáveis pela adstringência, cor, aroma e estabilidade oxidativa (Mamede *et al.*, 2009).

Possuem um ou mais anéis aromáticos com pelo menos um grupo hidroxilo. Estão divididos em dois grupos, os ácidos benzóicos que possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁) e os ácidos cinâmicos, com nove átomos de carbono (C₆-C₃) que existem predominantemente na forma hidroxilada (Sousa, 2008) (Fig. 4).

Ácidos Hidroxibenzóicos C₆-C₁



Ácido *p*- hidroxibenzóico: R₁= R₂ = H

Ácido protocatéquico: R₁= OH, R₂= H

Ácido vanílico: R₁= OCH₃, R₂ = H

Ácido gálico: R₁=R₂= OH

Ácido siríngico: R₁= R₂ = OCH₃

Ácidos Cinâmicos C6-C3

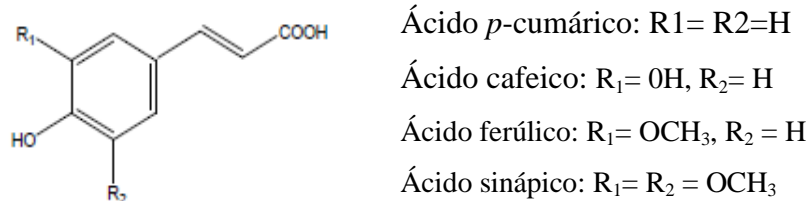


Figura 4. Estrutura química dos principais ácidos fenólicos (Lima, 2008).

Os compostos fenólicos presentes no pólen apícola são principalmente flavonóides glicosíladados (Škerget *et al.*, 2005) e ácidos hidroxicinâmicos (Fatrocová *et al.*, 2013).

LeBlanc *et al.* (2009) identificou os seguintes compostos fenólicos no pólen apícola dos Estados Unidos: ácidos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, vanílico, gálico e ferúlico. No entanto, Bonvehí *et al.* (2001) no pólen apícola de Espanha encontrou os ácidos 3,4-dihidroxibenzóico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, *o*-cumárico, 4-hidroxibenzóico, transcinâmico, gálico, cafeico e ferúlico.

1.4.2 Flavonóides totais

Os flavonóides são sempre encontrados no reino vegetal e encontram-se em grande quantidade no pólen apícola. A sua estrutura básica é constituída por um núcleo fundamental, contendo quinze átomos de carbono (C₁₅). Este grupo de compostos apresenta dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um heterocíclico oxigenado (anel C), formando um sistema C₆-C₃-C₆ (Araújo *et al.*, 2005; Dornas *et al.*, 2007), (Fig. 5).

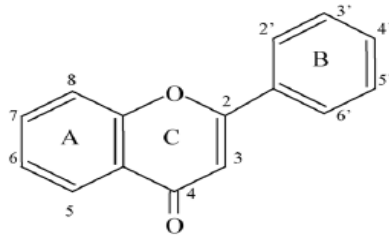
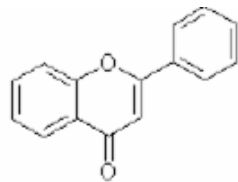
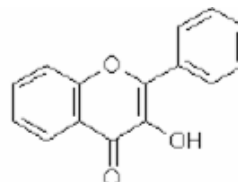


Figura 5. Estrutura química dos Flavonóides (Cushnie *et al.*, 2005).

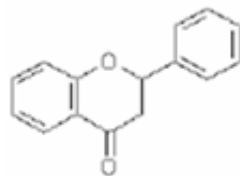
Os flavonóides consistem principalmente em antocianinas, flavonóis, flavonas, catequinas, e flavononas (Fig. 6). Bonvehi *et al.* (2001) refere que estes compostos podem ser muito importantes na redução da incidência de doenças degenerativas tais como, a arteriosclerose e o cancro.



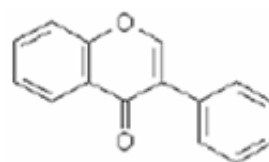
Flavonas



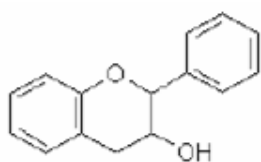
Flavonol



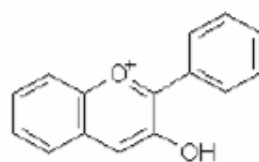
Flavonona



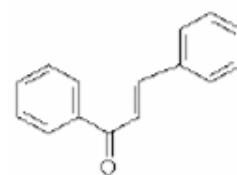
Isoflavona



Flavonol (Catequina)



Antocianinas



Chalcona

Figura 6. Estruturas químicas das principais classes dos flavonóides (Carpes, 2008).

Entre os vários flavonóides associados ao pólen apícola, à quercetina tem sido atribuída atividade anti-inflamatória, enquanto que, o campferol e os seus derivados estão associados à redução da hiperplasia prostática e a miricetina ao combate das alergias (Vit. *et al.*, 2009).

Os principais flavonóides identificados no pólen apícola brasileiro por Carpes *et al.* (2008) foram: rutina e miricetina. Enquanto que, Bonvehí *et al.* (2001) no pólen apícola espanhol observou a presença de rutina, quercetina, miricetina, campferol e isoramnetina.

Diversos investigadores (Leja *et al.*, 2007; Carpes, 2008; Menezes, 2009) constataram diferenças significativas entre os flavonóides presentes no pólen apícola de diferentes regiões, tendo atribuído estas variações à origem botânica e geográfica das amostras.

Os flavonóides podem ser usados para estabelecer padrões de qualidade no que diz respeito às propriedades nutricionais, fisiológicas e de controlo de qualidade de preparações de pólen comerciais (Kroyer *et al.*, 2001).

1.5 Benefícios do pólen apícola

O pólen apícola é um produto natural que se tem vindo a destacar-se pelas suas propriedades terapêuticas (úlceras, anemia e gripes) (Campos *et al.*, 1997), nutricionais (rico em proteínas e vitaminas), uso dermatológicas (emulsões, detergentes como shampoos, sabonetes e géis de banho) (Vit *et al.*, 2008) e farmacológicas, nomeadamente: suplemento alimentar, atividade hormonal, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante. Foi usado durante muitos anos na medicina tradicional, como um suplemento alimentar, devido principalmente às suas propriedades benéficas na saúde (Freire *et al.*, 2012).

Os antioxidantes são compostos que podem atrasar ou inibir a oxidação dos lípidos ou outras moléculas inibindo o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia. São definidos como, qualquer substância que quando presente em menores concentrações, em comparação com a de um substrato oxidável, atrasa ou inibe

significativamente a oxidação desse substrato antioxidante (Antolovich *et al.*, 2002; Atoui *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redox, que tem um papel importante como agentes redutores (Sousa *et al.*, 2007), doadores de hidrogénio e supressores de oxigénio (Zheng *et al.*, 2001; Atoui *et al.*, 2005). De facto, estes compostos desempenham um importante papel na conservação dos alimentos e na saúde humana.

Quantidades consideráveis de compostos fenólicos, principalmente de flavonóides, podem atuar como antioxidantes muito eficazes (Leja *et al.*, 2007; Mărghitas *et al.*, 2009). Verificou-se, que a atividade antioxidante do pólen apícola depende da origem botânica e geográfica, bem como do teor em flavonóides (Campos *et al.*, 2003). Também a idade do pólen e as condições de armazenamento pode influenciar as propriedades biológicas deste produto (Frigerio, 2009).

O pólen apícola é muito conhecido pela sua atividade antioxidante, contudo também possui atividade antimicrobiana. Apesar de haver poucos estudos sobre a atividade antimicrobiana do pólen, os poucos trabalhos existentes evidenciam que o pólen possui propriedades contra algumas espécies bacterianas (Frigerio, 2009).

Esin *et al.* (2006) estudaram a atividade antimicrobiana de pólen turco contra 13 espécies bacterianas patogénicas para plantas. Os resultados evidenciaram que o extrato de pólen inibiu o crescimento de todos os microrganismos em estudo dependendo do efeito do microrganismo e do tipo de pólen.

Nogueira (2012) verificou que o pólen português evidenciou maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas. Apesar dos mecanismos responsáveis por estas diferenças ainda não estarem bem elucidados, pensa-se que os compostos fenólicos não são os únicos responsáveis pela atividade antimicrobiana. No entanto, Estevinho *et al.* (2008) demonstraram que a atividade antimicrobiana está correlacionada com o teor em compostos fenólicos.

Além disso, o pólen apícola pode também representar um risco considerável de reação alérgica em pessoas sensíveis. O pólen apícola contém partículas de plantas e flores, algumas das quais podem ser altamente alergénicas para o Homem.

1.6 Métodos de conservação do pólen apícola

Os alimentos podem ser conservados através de diversos métodos. É fundamental eliminar ou reduzir os microrganismos responsáveis, quer pela alteração de alimentos como perda das qualidades nutritivas, quer pelo aparecimento nefasto de doenças, mantendo a qualidade do alimento.

O pólen ao contrário do mel, não precisa de ser armazenado na colmeia em quantidades muito superiores às necessidades das colónias (FNAP, 20010).

Para recolher este produto apícola é utilizado um acessório denominado coletor de pólen ou caça pólen (Fig. 7) que é colocado na entrada da colmeia (alvado) ou entre as suas partes. Assim, as abelhas são obrigadas a passar por este acessório antes de entrarem na colmeia. No seu interior existe uma grade perfurada que permite a passagem das abelhas mas, retém o pólen que está armazenado nas corbículas. Deste modo, o pólen é raspado das patas traseiras das abelhas e cai numa gaveta, de onde é retirado e desidratado (Parkhill, 1996). Na construção deste equipamento deve utilizar-se material apropriado, para que a água saía facilmente e haja uma boa circulação do ar, evitando-se a deterioração do pólen (FNAP, 2010).



Figura 7. Caça-pólens (fonte: montedomel.blogspot.com e Arruda, 2009).

Na altura da recolha, o pólen pode ter uma percentagem de humidade superior a 18%, no entanto, para garantir a sua qualidade e a ausência de contaminações é necessário que a humidade baixe para valores de aproximadamente 6% (Melo *et al.*, 2011) através da secagem (FNAP, 2010).

O sucesso da preservação do pólen apícola depende de vários fatores a referir: temperatura, humidade relativa do meio ambiente e humidade do pólen. Muitas técnicas são utilizadas para a conservação do pólen apícola, entre os métodos de conservação, destacam-se a congelação e a secagem.

1.6.1 Congelação

Após a colheita, e na impossibilidade de uma secagem imediata, deve ser efetuada a congelação do pólen, para permitir que este se conserve “in natura” (FNAP, 2010), pois o frio provoca a inibição total ou parcial dos principais agentes causadores de alterações, nomeadamente atividade microbiana, enzimática e metabólica (Ordóñez, 2005).

Durante a congelação devido à formação de cristais de gelo, a atividade de água do alimento diminui, conduzindo ao aumento do tempo de vida de prateleira do produto (Fellows, 2006).

A congelação tem como objetivo, manter as características físicas e químicas do pólen e destruir os ácaros, ovos e larvas que possam estar no produto (Barreto *et al.*, 2006). Evita também a multiplicação dos microrganismos (fungos e bactérias) presentes no pólen (Ribeiro *et al.*, 2007). De facto, segundo Carpes *et al.* (2008) e Arruda *et al.* (2013) a congelação não causa qualquer alteração substancial na composição química do pólen, por isso pode ser utilizada para preservar o pólen a utilizar na alimentação ou para fins terapêuticos. Este processo é também aconselhado, quando se pretende utilizar o pólen para a alimentação das colónias (Morais, 2009).

A conservação do pólen apícola deve efetuar-se, em sacos plásticos a -20°C durante 2 a 3 dias. O pólen é colocado em bandejas com capacidade de 2,5 Kg durante uma a duas horas, devendo ser agitado de forma a facilitar o congelamento, e evitar agregação dos grãos (FNAP, 2010). Nestas condições de congelamento, o crescimento microbiano é inibido, uma vez que, a maioria dos microrganismos não se desenvolve a temperaturas inferiores a -10°C (Freitas e Figueiredo, 2000).

Após congelação, o pólen deve ser descongelado à temperatura ambiente durante aproximadamente 3 a 4 horas, devendo seguidamente ser processado o mais rápido possível por se tratar de um produto higroscópico (capacidade de absorver humidade).

As principais vantagens da congelação são: a pouca alteração organolética; desacelera ou retarda o crescimento dos microrganismos; inibe ou retarda a atividade das enzimas alimentares e microbianas, assim como a velocidade de outras reações químicas não enzimáticas (oxidações); baixo custo e método fácil de conservar.

1.6.2 Secagem

A secagem é uma das mais antigas e usuais operações de desidratação, usada na indústria alimentar. É também uma das operações mais complexas, devido aos processos de transferência de calor e de massa envolvidos (Menon e Mujumdar, 1987). O principal objetivo da secagem é garantir a conservação dos alimentos e assegurar uma redução do teor de água até ao nível a partir do qual as concentrações de açúcares, sais, ácidos e outros componentes sejam suficientemente altas para reduzir a atividade da água, impedindo assim o crescimento de microrganismos responsáveis pela deterioração dos alimentos (Travaglini *et al.*, 1993).

O processo da secagem é essencial para aumentar o tempo de vida de prateleira do pólen. Este produto apresenta na sua composição um elevado teor de humidade e proteínas, pelo que a desidratação, é essencial, para evitar a deterioração do produto (Arruda *et al.*, 2013). Deve ser realizada com um especial cuidado para garantir a sua qualidade nutricional (Morgano *et al.*, 2011).

Os processos de desidratação mais utilizados pelos apicultores são a desidratação ao ar livre e o aquecimento artificial. O aquecimento artificial é o mais usado na produção de pólen apícola para fins comerciais (Almeida-Muradian *et al.*, 2005).

No processo de aquecimento artificial o pólen é introduzido num secador/forno, a 40°C, durante 12 a 48 horas. Convém salientar, que o binómio tempo/temperatura de secagem variam bastante de autor para autor, o que poderá estar relacionado com a humidade do pólen a quando da colheita.

O secador deve possuir um sistema de circulação e renovação do ar. A sala de processamento deve estar equipada com um dispositivo capaz de retirar o excesso de humidade do meio ambiente (FNAP, 2010). Se o secador for constituído por várias gavetas (Fig. 8), estas devem ser mudadas de lugar de forma alternada, para garantir a secagem uniforme do produto. Durante todo o processamento é imperioso o controlo de

temperatura de secagem, porque temperaturas muito altas, levam a perdas muito significativas no valor nutricional do pólen (Ribeiro *et al.*, 2007). Fatores como a humidade e o processo de descongelação devem também ser controlados, pois estão diretamente relacionados com o metabolismo do pólen, podendo ocorrer contaminações por microrganismos e a reativação dos processos metabólicos pós-conservação (Cuchiara *et al.*, 2012).

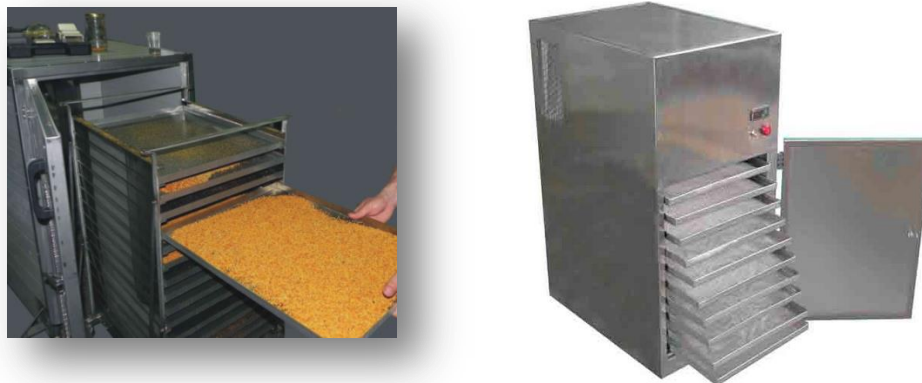


Figura 8. Secador do pólen apícola (fonte: <http://montedomel.blogspot.pt> e <http://apiariosforte.blogspot.pt>).

No que diz respeito às vantagens da secagem salienta-se a fácil conservação do produto; inibição do crescimento dos microrganismos; aumento do tempo de vida útil do produto; económica e redução de peso.

Após a secagem do pólen, para remover a sujidade, nomeadamente fragmentos de abelhas, deve proceder-se à sua limpeza. Esta pode ser efetuada manualmente através de pinças, por exemplo, ou através de um sistema mecanizado (ventilador).

Depois de limpo e selecionado, o pólen pode ser embalado em sacos plásticos, hermeticamente fechados, ou em embalagens de vidro de capacidade variável (FNAP, 2010).

O pólen apícola, bem como outros alimentos ricos em proteínas, pode perder facilmente o seu valor nutricional se armazenado de forma inadequada. O pólen fresco à temperatura ambiente, perde em poucos dias a sua qualidade. Congelado, as perdas começam a ser significativas após um ano. Porém, se for desidratado a pelo menos 10%

de humidade, este produto pode ser conservado por meses à temperatura ambiente, protegido da luz. Assim, ambientes secos, frios e escuros são considerados ideais para o armazenamento do pólen apícola, de modo a conservar o seu valor nutricional. De facto, Barreto *et al.* (2006) ao avaliarem o tempo de vida de prateleira do pólen apícola desidratado do Brasil constataram que o mesmo é em função da temperatura de armazenamento. Segundo Arruda (2009) o pólen torna-se impróprio para consumo aos 240 dias à temperatura ambiente, sofrendo reações de Maillard, enquanto conservado a -12°C a duração é maior (360 dias).



Capítulo 2



2. Material e Métodos

2.1 Amostragem

Neste trabalho analisaram-se duas amostras de pólen desidratado diferentes (B1 e B2) e uma amostra (B0) que sofreu dois processos distintos de conservação: desidratação e congelação.

As amostras de pólen de modo de produção biológica foram recolhidas em 2012 em Trás-os-Montes, Portugal.

Para comparar o efeito do método de conservação apenas foi utilizada uma amostra, porque como a congelação ainda não é um método usado frequentemente pelos apicultores Portugueses, não foi possível obter as restantes amostras congeladas.

2.2 Análise polínica

A análise polínica ao pólen foi realizada de acordo com o método descrito por Almeida-Muradian *et al.* (2005). Pesaram-se 2g de cada amostra, posteriormente, os grãos de pólen foram separados por cores (amarelo, laranja, beje, verde, rosa, entre outras) (Fig. 9), já que cada cor representa uma família botânica que se encontra presente na amostra. Cada conjunto foi pesado, para se calcular a percentagem total da amostra.

De seguida, as amostras colocaram-se entre lâmina e lamela utilizando-se gel de glicerina como meio de montagem. Na visualização dos pólenes utilizou-se o microscópio modelo Leica. Como referência, foi usada uma coleção de pólenes do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e bases de dados.



Figura 9. Grãos de pólen.

2.3 Avaliação da Qualidade Microbiológica

Foram avaliados microrganismos indicadores de qualidade comercial (aeróbios mesófilos, bolores e leveduras), de qualidade sanitária (coliformes totais, *E.coli* e *S. aureus*) e de segurança (esporos de Clostrídios sulfito-redutores).

As análises microbiológicas foram realizadas em triplicado e, de acordo com as Normas Portuguesas, Europeias e por Kits (Métodos Oficiais da AOAC).

2.3.1 Preparação das amostras

A preparação das amostras foi efetuada de acordo com a norma portuguesa NP - 1829 (1982).

A preparação e composição dos vários meios de cultura utilizados encontram-se descritas no anexo I.

2.3.2 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos

Na contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos utilizou-se a norma portuguesa NP – 3788 (2002).

Procedeu-se à sementeira por incorporação, transferindo 1 mL de cada diluição decimal, 10^{-1} e 10^{-2} , para placas de Petri contendo meio de cultura Plate Count Agar

(PCA). A contagem das colónias foi efetuada após incubação das placas a 30°C durante 48 horas em aerobiose, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{UFCs/g} = \frac{\Sigma C}{V \times (n_1 + 0,1 n_2) \times d}$$

Sendo:

ΣC soma das colónias em todas as placas contadas (15 a 150 colónias)

d diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens

n_1 número de placas da 1ª diluição contada

n_2 número de placas da 2ª diluição contada

V volume de inóculo semeado em cada placa

Os resultados foram expressos em UFC/g.

2.3.3 Contagem de Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e de leveduras foi realizada segundo a ISO 21572-2: (2008).

Procedeu-se à sementeira por espalhamento de 0,1 mL de cada uma das diluições, em placas de Petri com meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA), acidificado com ácido tartárico a 10%. Após incubação durante 5 dias a 25°C efetuou-se a contagem das colónias.

Os resultados expressam-se em UFC/g.

2.3.4 Pesquisa de Clostrídios sulfito-redutores

A pesquisa e quantificação de Clostrídios sulfito-redutores foi efetuada segundo a norma portuguesa NP – 2262 (1986).

Colocaram-se 10, 5, 1 e 0,1 mL da suspensão mãe em tubos de ensaio. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 80°C, durante 10 minutos para inativar a amostra. Posteriormente, as amostras foram distribuídas pelas placas de Petri contendo meio de cultura Reinforced Clostridial Agar (RCA) com sulfito de sódio e citrato de ferro. De

seguida adicionou-se mais uma camada de meio à placa e selou-se com parafilme. Após solidificação, as placas incubaram-se numa estufa a 37°C durante 72 horas.

O aparecimento de colónias negras, nas placas, considerou-se resultado positivo.

2.3.5 Contagem de Coliformes totais e *Escherichia coli*

A quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*, foi efetuada através de um Kit Simplate, da Bio Control.

O meio de cultura fornecido foi hidratado em 100 mL de água estéril. De seguida, colocou-se em tubos de ensaio 9 mL da solução preparada anteriormente e 1mL da solução mãe. A amostra foi vertida para uma placa com 84 poços. Posteriormente espalhou-se a mistura na placa com movimentos circulares, para que todos os poços ficassem cobertos sem bolhas de ar. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 a 48 horas.

Os coliformes totais provocaram uma mudança de cor da solução contida nos poços de azul para rosa. A *E.coli* foi quantificada através dos poços onde se verificou fluorescência após exposição a uma luz UV a um comprimento de onda de 365 nm (Vilber Lourma. MERCK, TLC Silica gel 60 F₂₅₄).

O número de coliformes e *E.coli* presentes na amostra foi calculado utilizando a tabela de conversão SimPlate, fornecida pelo fabricante.

2.3.6 Contagem e pesquisa *Staphylococcus aureus*

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* foi efetuada de acordo a norma portuguesa NP – 4400-1 (2002).

Segundo a norma, diluições sucessivas da amostra foram inoculadas em Agar Baird-Parker (BP) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Seguidamente procede-se à contagem das placas que continham menos de 150 colónias. Selecionaram-se 3 a 5 colónias características (colónias negras ou cinzentas, brilhantes e convexas rodeadas de um halo claro) e 3 a 5 colónias não características e inoculou-se uma pequena porção de cada uma delas em BHI (Brain Heart Infusion). Incubou-se a 37°C durante 24 horas. No final, efetuou-se a prova bioquímica confirmativa de coagulase em tubo. Em alguns

casos, utilizou-se a prova da catalase para diferenciar os *Staphylococcus* dos *Streptococcus*.

Os resultados expressaram-se em número de *Staphylococcus* coagulase positiva por grama de produto.

2.3.7 Isolamento e Identificação de Leveduras

A identificação de leveduras isoladas foi realizada utilizando sistemas miaturizadas, galerias API 20C AUX (bioMérieux SA), constituído por 20 cúpulas (poços). Seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Fig. 10).



Figura 10. Galerias API 20C AUX.

2.4 Análises Físico-Químicas

Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.4.1 Humidade

A humidade foi determinada de acordo com o descrito por Nogueira *et al.* (2012). Pesaram-se, em cadinhos, cerca de 3g de cada amostra de pólen. As amostras foram secas numa estufa (SOTEL marca Heraeus) a uma temperatura de 100°C a 105°C até peso constante (aproximadamente 4 dias).

O teor de humidade foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Teor de Humidade} = \frac{P1 - P2}{P \text{ amostra}} \times 100$$

Sendo:

P1 – Peso do cadinho com amostra

P2 – Peso do cadinho com amostra seca

P amostra – Peso da amostra

2.4.2 Cinzas

Este parâmetro foi calculado segundo o método reportado por Carpes (2008). Colocaram-se 2g de pólen em cadinhos, previamente incinerados numa mufla (Lindberg de modelo 51894), a uma temperatura de 550°C cerca de 4 horas, ou seja, até as cinzas ficarem completamente brancas.

Após 4 horas, retiraram-se os cadinhos da mufla e colocaram-se num exsiccador para arrefecimento.

As cinzas foram determinadas com base na seguinte equação:

$$\% \text{ Teor de Cinzas} = \frac{P1-P2}{P \text{ amostra}} \times 100$$

Sendo:

P1 – Peso do cadinho com cinzas

P2 – Peso do cadinho vazio

P amostra – Peso da amostra

2.4.3 pH

O pH foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Nogueira *et al.* (2012). Para tal misturaram-se 10g de pólen com 75 mL de água destilada. Colocou-se a mistura em agitação e efetuou-se a leitura do pH num potenciómetro (Crison pH Meter Basic 20).

2.4.4 Atividade da Água

Para avaliar a atividade da água as amostras de pólen foram introduzidas em caixas de plástico apropriadas e colocadas no medidor da atividade da água (Rotronic HygroPalm. Bassersdorf CH-8303).

2.4.5 Açúcares Redutores

Na determinação dos açúcares redutores utilizou-se a metodologia descrita por Silva *et al.* (2003).

Pesaram-se 60 mg de cada amostra de pólen, dissolveram-se em 10 mL de uma solução de H₂SO₄ (1,5M). As soluções foram colocadas em banho-maria (100°C) durante 20 minutos. Após este período, procedeu-se ao arrefecimento. Posteriormente, as soluções foram neutralizadas com 12 mL de NaOH (0,1% m/v) e filtradas para um balão de 60 mL, perfazendo-se o volume com água destilada.

Como padrão foi utilizada a glicose.

A quantificação dos açúcares redutores foi determinada por espectrofotometria a 540 nm, utilizando-se um espectrofotômetro (Varian UV- Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan).

2.4.6 Proteínas

O teor em azoto total foi determinado pelo método de Kjeldahl (Fig. 11) recomendado por Almeida-Muradian *et al.* (2005).

Pesaram-se aproximadamente 0,07g de pólen para um tubo. Adicionaram-se duas pastilhas Kjeldahl (aproximadamente 10g), uma quantidade muito reduzida de ácido esteárico (colher mais pequena de laboratório) e 20 mL de H₂SO₄.

A proteína foi calculada num destilador Kjeldahl (Büchi AutoKjeldahl Unit K-370) multiplicando o valor de azoto total pelo fator 6,25 ($P = N \times 6,25$).



Figura 11. Destilador Kjeldahl.

2.4.7 Determinação dos Ácidos Gordos – Lípidos

A determinação dos ácidos gordos foi realizada de acordo o método descrito por Human *et al.* (2006) modificado.

Este método consiste em duas fases. Na primeira fase efetuou-se a extração e na segunda, a análise e determinação dos ácidos gordos.

Para esterificação dos ácidos gordos pesou-se 0,7g de pólen e adicionou-se 0,2000 a 0,2009g de C13, 0,05g de ácido ascórbico, 15 pastilhas de Hidróxido de potássio (KOH), 2 mL de água destilada e 45 mL de Butanol. Posteriormente colocou-se a mistura na unidade de extração (Büchi Extraction Unit B-815) durante 30 minutos. Após este período acrescentou-se 40 mL de solução acídica e deixou-se repousar durante algum tempo, para se conseguir obter uma separação de fases. Posteriormente recolheu-se o sobrenadante.

Os ácidos gordos foram identificados num cromatógrafo gasoso (Büchi Fat Determination B-820). Injetou-se 2 μ L de amostra, e a deteção foi efetuada através de um detetor de ionização de chama (FID) (Fig. 12).



Figura 12. Unidade de extração B-815 e Unidade de determinação B-820.

2.4.8 Hidratos de Carbono

O teor de hidratos de carbono foi calculado de acordo com a seguinte equação (Nogueira *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Hidratos de Carbono} = 100 - (\% \text{ cinzas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lípidos})$$

2.4.9 Valor energético

O valor energético expresso em Kcal, foi calculado de acordo com a seguinte equação (Estevinho *et al.*, 2012):

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

2.5 Avaliação das propriedades bioativas do pólen apícola

2.5.1 Preparação dos Extratos Metanólicos do Pólen (EMP)

A extração foi realizada de acordo com o método descrito por Dias *et al.* (2011).

Pesou-se aproximadamente 1g de pólen e dilui-se em 50 mL de metanol num goblé. De seguida, colocou-se a mistura sob agitação magnética a 150 rpm durante 1

hora. Após esse período, procedeu-se à filtração através de um papel de filtro (Whatman nº.4) (Fig.13). Repetiu-se o procedimento mais uma vez. Posteriormente misturou-se os dois filtrados para um matraz, obtendo-se assim os extratos metanólicos do pólen.

Os extratos foram evaporados num evaporador rotativo (Rotavapor Buchi RE 111), à temperatura de 45°C durante aproximadamente 1 hora.

O extrato seco de pólen foi guardado à temperatura ambiente e no escuro para a determinação dos compostos fenólicos totais, flavonóides e atividades antioxidante e antimicrobiana.



Figura 13. Extratos metanólicos das amostras de pólen estudadas.

2.5.2 Propriedades bioativas

Todas as análises foram efetuadas em triplicado.

2.5.2.1 Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação dos compostos fenólicos seguiu-se o método de Folin-Ciocalteu descrito por Moreira *et al.* (2008) e Morais *et al.* (2011).

As amostras foram preparadas, diluindo o extrato de pólen de cada amostra em metanol (MeOH-EMP). Misturou-se 500 µL de MeOH.EMP, 500 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 500 µL de Na₂CO₃ (10% (m/v)). A mistura foi guardada no escuro à temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente procedeu-se à medição das

absorvâncias a 700 nm num espectrofotómetro (Varian UV- Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan).

O branco foi preparado nas mesmas condições, sem adição de MeOH-EMP.

O ácido gálico (GA) foi utilizado como padrão (0,01 – 0,7 mM) para a determinação da curva de calibração ($y = 1.3464 x + 0,0155$, $R^2 = 0,9966$).

O conteúdo de fenóis totais foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato de pólen (GAEs).

2.5.2.2 Flavonóides Totais

O teor em flavonóides totais foi determinado segundo o método descrito por Feás *et al.* (2012).

Para a preparação da amostra, misturou-se 250 μ L de MeOH-EMP (preparado na secção 2.5.2.1), com 1,25 mL de água destilada e 75 μ L de NaNO_2 a 5% para tubos de ensaio. Após 5 minutos em repouso, adicionou-se 150 μ L de $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 10%. Passados 6 minutos, adicionou-se 500 μ L de NaOH (1M) e 275 μ L de água destilada.

A intensidade da cor da mistura foi quantificada por espectrofotometria (Varian UV- Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan) a 510 nm.

A quecetina (CA) foi utilizada como padrão (0,05 - 1 mM) para a determinação da curva de calibração ($y = 0,6292 x - 0,0264$, $R^2 = 0,9982$).

O teor de flavonóides totais foi expresso em mg de equivalentes de catequina/g de extrato de pólen (CAEs).

2.5.2.3 Atividade Antioxidante

Na determinação da atividade antioxidante do pólen foram utilizados dois métodos: avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e avaliação do poder redutor.

2.5.2.3.1 Método do DPPH

A avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ferreira *et al.* (2009).

Preparou-se uma solução mãe de pólen, pesando 10 mg/mL de extrato seco de pólen para um frasco, diluiu-se em 1 mL de metanol.

Foram preparadas várias concentrações a partir da solução mãe 4; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 e 0,25 mg/mL, que foram aferidas com metanol em balões de 25 mL. Em tubos de ensaio colocou-se 0,3 mL de cada uma das concentrações e 2,7 mL de solução metanólica contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/l). A mistura foi agitada vigorosamente e colocada a repousar no escuro durante 60 minutos, ficando com uma cor amarelada.

A redução do radical de DPPH foi determinada por medição da absorvância a 517 nm num espectrofotômetro (Varian UV- Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan).

A percentagem do efeito bloqueador do DPPH foi calculada pela seguinte equação:

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

A_{DPPH} - Absorvância da solução DPPH

A_S - Absorvância da solução quando o extrato da amostra foi adicionado a um nível específico.

A concentração do extrato que induziu uma inibição de 50% (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico do efeito da percentagem de eliminação de radicais em função da concentração de extrato na solução.

2.5.2.3.2 Método do Poder Redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Berker *et al.* (2007).

Num tubo de ensaio colocou-se 1 mL de amostra a diferentes concentrações, 2,5 mL de tampão fosfato 0,2M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1% (p/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C, durante 20 minutos. Posteriormente, os

tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente. Após arrefecimento, adicionou-se 2,5 mL TCA (ácido tricloroacético) a 10% (p/v) sendo a mistura agitada vigorosamente. Retirou-se 2,5 mL do sobrenadante para novos tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto de ferro a 0,1 % (p/v). A mistura foi deixada em repouso durante 2 minutos.

As absorvâncias foram medidas a 700 nm, num espectrofotómetro (Varian UV-Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan). O valor de EC₅₀ foi calculado a partir do gráfico das absorvâncias medidas em função das concentrações de extrato.

2.5.3.4 Atividade antimicrobiana

O efeito antimicrobiano dos extratos de pólen apícola foi avaliado em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.

Os microrganismos utilizados no presente estudo, foram isolados no centro Hospitalar do Nordeste e identificadas no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança. Utilizaram-se quatro bactérias, duas Gram-negativas (*Shigella dysenteriae* ESA38 e *Klebsiella pneumoniae* ESA36), duas Gram-positivas (*Staphylococcus xylosus* ESA5 e *Staphylococcus epidermidis* ESA77) e três leveduras (*Cândida parapsilosis* ESA70, *Pichia membranifaciens* ESA11 e *Zygosaccharomyces mellis* ESA133).

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi efetuada de acordo com o método de micro-diluição em placa, segundo Cordeiro (2004), com algumas modificações.

Preparou-se uma solução de extrato de pólen com uma concentração de 50 mg/mL, diluída em 1 mL DMSO (dimetil sulfóxido).

Em microplacas estéreis de 96 poços, foram colocadas 200 µL de amostra (extrato de pólen) nos poços da coluna 1. Nos poços 2 a 8, e de 11 a 12 colocaram-se 100 µL de meio (caldo nutritivo), sendo os poços 11 e 12 controlo positivo. Enquanto nos poços 9 e 10 (controlo negativo), 200 µL de meio.

Posteriormente foram efetuadas diluições sucessivas até ao poço 8. De seguida, adicionou-se 20 µL de cada microrganismo em estudo em todos os poços, há exceção das colunas 1, 9 e 10. Os poços 9 e 10 foram realizados como controlo. As microplacas foram fechadas com uma película respirável. As leveduras foram incubadas durante 48

horas a 25°C, e bactérias a 37°C durante 24 horas. Após esse período, a todos os poços à exceção da primeira coluna, adicionou-se 20 µL de TTC (cloreto de trifenil tetrazolium) a 1%. Estas foram re-incubadas novamente por mais 3 horas, a 37°C e 25°C para as bactérias e leveduras, respetivamente, visualizando-se no final a mudança de cor (vermelho/rosa), indicando a redução do TTC pelos microrganismos.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração de extrato de pólen, capaz de inibir o crescimento visível, tal como indicado pela coloração do TTC.

O procedimento foi efetuado em triplicado para cada microrganismo e os resultados foram expressos em mg/mL.

2.6 Extração dos compostos fenólicos por HPLC

- *Extração com Amberlite XAD-2*

A extração do pólen para avaliar os compostos fenólicos por HPLC foi efetuada de acordo com o método descrito por Yao *et al.* (2003) com algumas modificações.

Pesaram-se 25g de pólen, após maceração adicionaram-se 250 mL de HCl a pH 2,0. Após dissolução, procedeu-se à filtração da mistura, para remover as partículas sólidas do pólen. A esta solução adicionou-se 100 g de Amberlite XAD-2, agitou-se durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a homogeneização, a mistura foi colocada numa coluna de vidro (bureta). Essa coluna foi lavada com 225 mL de HCl e 225 mL de água desionizada para se retirar toda a sujidade presente na amostra, nomeadamente os açúcares.

Os compostos fenólicos retidos foram extraídos da Amberlite por eluição com 250 mL de metanol. O metanol foi posteriormente evaporado num evaporador rotativo (Rotavapor Buchi RE 111 com um Buchi 461 banho-maria, 2002), a uma temperatura de 65°C durante aproximadamente 1 hora. Posteriormente adicionou-se 25 mL de NaCl a 37% e três vezes 5 mL de éter dietílico. Após homogeneização, a mistura foi deixada em repouso para visualizar as duas fases. O sobrenadante foi retirado para um matraz em formato de pêra com ajuda de uma pipeta de Pasteur. O éter dietílico foi evaporado a 30°C aproximadamente 5 a 10 minutos, obtendo-se assim o extrato seco de pólen.

Por fim, foi adicionado 1 mL de metanol e filtrou-se a solução através de uma seringa estéril. O filtrado foi colocado num vial.

- *Extração metanólica (sem resina Amberlite XAD-2)*

Para um tubo de ensaio pesaram-se 0,06g de extrato seco de pólen obtido na secção 2.5.1 e adicionaram-se 0,5 mL de metanol. Após homogeneização, a solução foi filtrada por uma seringa estéril, para um vial devidamente identificado.

2.6.1 Análise por HPLC

O perfil fenólico foi analisado por HPLC, utilizando-se dois eluentes: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrilo (B).

O gradiente utilizado foi: 80% do eluente A e 20% do eluente B no início da corrida; aos 10 minutos: 70% A e 30% B; aos 40 minutos: 60% A e 40% B; aos 60 minutos: 40% A e 60% B; aos 80 minutos 10% A e 90% B, seguido pelo retorno às condições iniciais.

As análises foram realizadas num cromatógrafo constituído: por uma bomba ternária Varian, modelo 9010 (Fluxo de 1 mL por minuto); injector HTA, modelo HT800L e detetor de U.V Varian, modelo Prostart 330 - PDA (Photodiode Array detector), com um comprimento de onda de leitura de registo 280 nm. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna (250 mm × 4,6 mm) Nucleosil C18 (Macherey-Nagel), que se encontrava a uma temperatura de 30°C.

Foram utilizados 13 padrões, catequina, ácido trans-cinâmico, *p*-cumárico, quercetina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido elágico, crisina, trihidroxiflavonona, miricetina, campferol, ácido ferúlico e pinocembrina.

A aquisição e tratamento de dados foram efetuados através do software Star Chromatography Workstation, version 6.41 (Fig. 14).



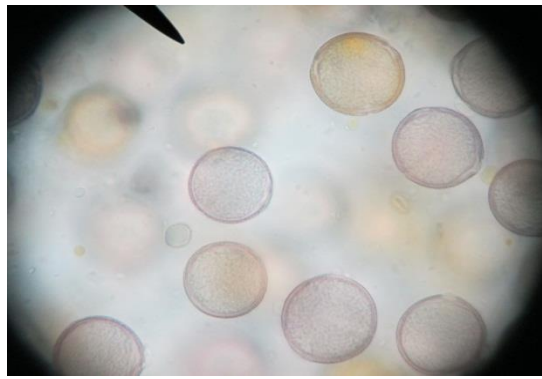
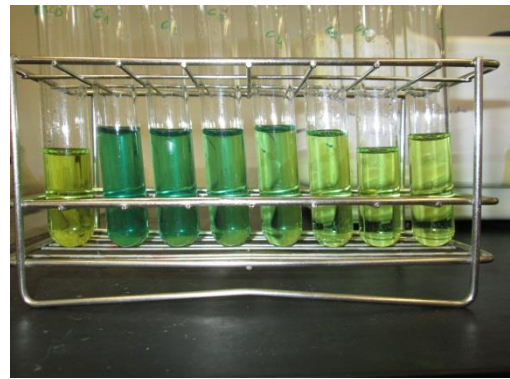
Figura 14. Cromatógrafo de alta eficiência com detetor de Diodo-Array.

2.7 Análise Estatística

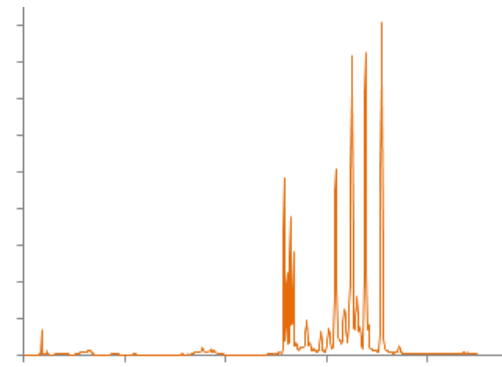
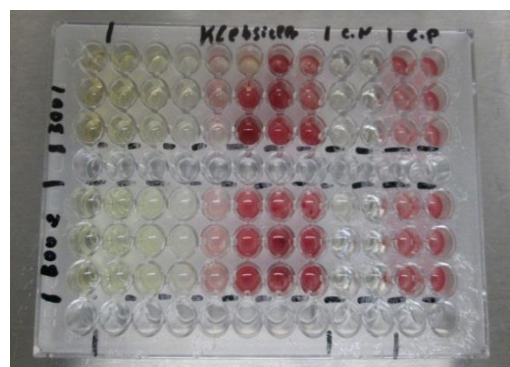
A análise estatística dos dados foi efetuada utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 21.0.

As diferenças entre as amostras foram avaliadas, através do teste one-way de variância (ANOVA), e pelo teste de Tukey para um nível de significância $p = 0,05$. Valores de p menor ou igual a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

Para avaliar as correlações entre os vários parâmetros utilizou-se o teste de Pearson.



Capítulo 3



3. Resultados e Discussão

3.1 Análise Polínica

Os resultados obtidos na análise polínica estão sumariados na figura 15. Da análise da figura verifica-se que todas as amostras de pólen analisadas à exceção da amostra B0 são heteroflorais, pois apresentaram uma grande variedade de cores, isto é diversos tipos de pólen e, conseqüentemente várias espécies botânicas.

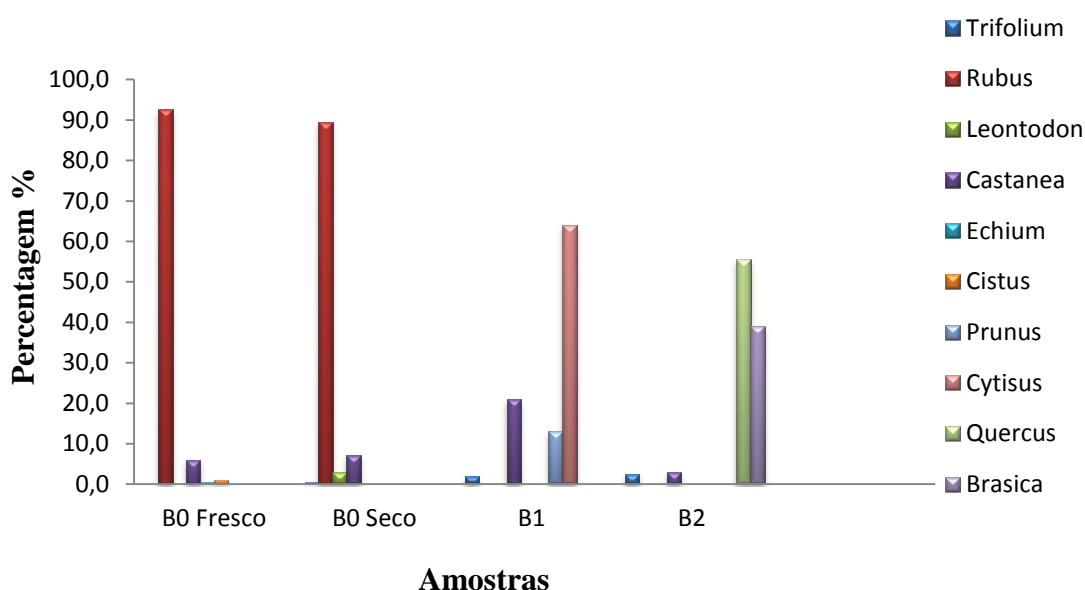


Figura 15. Representação dos pólen obtidos nas diferentes amostras de pólen.

D = pólen dominante (> 45%), A = pólen acessório (16-46%), I= pólen isolado (3%-15%)

Nas amostras analisadas foram identificadas 10 espécies de pólen pertencentes a 8 famílias botânicas, *Trifolium sp* (*Fabaceae*), *Rubus sp* (*Rosáceae*), *Leontodon sp* (*Asteraceae*), *Castanea sativa* (*Fagaceae*), *Echium sp* (*Boraginaceae*), *Cistus sp* (*Cistaceae*), *Prunus sp* (*Prunaceae*), *Cytisus sp* (*Fabaceae*), *Quercus sp* (*Fagaceae*) e *Brasica sp* (*Brassicaceae*).

As espécies dominantes (> 45%) foram: *Rubus sp* na amostra B0 fresco (92,5%) e B0 seco (89,5%). *Cytisus sp* na amostra B1 (64%) e *Quercus sp* na amostra B2 (55,5%).

Como pólen acessório (16 – 45%), foram identificadas espécies como, *Castanea sativa* nas amostras B0 seco (17%) e na B1 (21%), e *Brasica sp* na amostra B2 (39%). Como espécies isoladas salienta-se a presença de *Leontodon sp* na amostra B0 seco (3%), *Castanea sativa* na amostra B0 fresco (6%) e B2 (3%) e a *Prunus sp* com 13% na amostra B1.

Castanea sativa estava presente em todas as amostras de pólen, o que já era esperado, uma vez que esta espécie é muito abundante na região de Trás-os-Montes. *Trifolium sp* foi encontrada em todas as amostras analisadas, há exceção do pólen B0 fresco.

Estes resultados são corroborados pelas observações de Pires *et al.* (2005), pois segundo estes autores as famílias botânicas dominantes em Trás-os-Montes são *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Fagaceae*, *Boraginaceae*, *Labiatae* e *Ericaceae*.

Morais *et al.* (2009), Nogueira *et al.* (2012) e Forcone *et al.* (2011) verificaram que, as famílias mais abundantes em amostras de pólen de Portugal e da Argentina foram a *Cistaceae* e *Asteraceae*, respetivamente. Estas diferenças podem estar relacionadas com a genética das espécies florais, a região, as condições climáticas, o solo e a idade da planta (Luz *et al.*, 2010; Carpes *et al.*, 2013).

3.2 Contaminação microbiana

Durante a colheita, limpeza, secagem, armazenamento e comercialização do pólen apícola, se não existirem boas práticas, este produto pode ser contaminado por uma grande variedade de microrganismos.

Portugal carece de legislação, pois não existem parâmetros microbiológicos para o pólen apícola. No entanto a Suíça, Argentina, Brasil, Bulgária, Espanha (Féas *et al.*, 2012) e a Polónia (Arruda *et al.*, 2013) já estabeleceram padrões oficiais de qualidade para este produto apícola.

Na tabela 2 e 3 apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros microbiológicos do pólen apícola sujeito a diferentes processos de conservação.

Da análise da tabela 2, verifica-se que os aeróbios mesófilos, variaram entre $1,39 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10$ UFC/g para a amostra B0 e $6,83 \times 10 \pm 6,71 \times 10$ UFC/g na amostra B1. As amostras B0 e B1, diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), enquanto que as amostras B1 e B2 não diferiram no que diz respeito à quantidade de aeróbios mesófilos.

Apesar destes microrganismos estarem presentes em todas as amostras analisadas (100%) os valores obtidos situaram-se dentro dos limites estabelecidos pelo Código Alimentario Argentina (1998), que estabelece o valor máximo de $1,5 \times 10^3$ UFC/g para aeróbios mesófilos a 30°C. Isto sugere, que as condições de higiene durante a colheita, limpeza, secagem e armazenamento foram adequadas.

Os bolores e leveduras variaram entre $2 \times 10 \pm 1 \times 10$ e $7,3 \times 10 \pm 2,5 \times 10$ UFC/g na amostra B1, B2 respetivamente, verificando-se que as amostras não diferiram estatisticamente entre si. Estes valores estão em concordância com o Código Alimentario Argentino (1998) que considera limites máximos de 10^2 UFC/g. Neste estudo os bolores e leveduras foram encontrados em 100% das amostras analisadas, tal qual o observado por Coronel *et al.* (2004) em amostras de pólen da Argentina. No entanto, Estevinho *et al.* (2012) e Nogueira *et al.* (2012) em pólen Português verificaram a presença deste indicador de qualidade comercial em apenas 60 e 50% das amostras estudadas.

Os coliformes totais oscilarem entre $2,67 \times 10^2 \pm 2,57 \times 10^2$ UFC/g (B0) e <10 UFC/g (B1 e B2). Não se verificaram diferenças significativas entre as amostras. Sugerindo que o pólen apícola foi bem processado e manipulado. Os nossos resultados são corroborados pelas observações de Nogueira *et al.* (2012) e Féas *et al.* (2012).

Os indicadores de qualidade sanitária *S. aureus* e *E. coli* e os indicadores de segurança (Clostrídios sulfito redutores) estavam ausentes em todas as amostras analisadas, sugerindo que a manipulação foi adequada.

Tabela 2. Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos nas amostras de pólen desidratado.

	Amostras		
	B0	B1	B2
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	$1,39 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^3$ c	$6,83 \times 10 \pm 6,71$ a	$1,85 \times 10^2 \pm 3,16 \times 10$ ab
Bolores e leveduras (UFC/g)	$7,3 \times 10 \pm 2,5 \times 10$ a	$2 \times 10 \pm 10,00$ a	$2 \times 10 \pm 1 \times 10$ a
<i>S.aureus</i> (UFC/g)	<10 a	<10 a	<10 a
Coliformes totais (UFC/g)	$2,67 \times 10^2 \pm 2,57 \times 10^2$ a	<10 a	<10 a
<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	ausente	Ausente	Ausente
Clostrídios sulfito redutores (em 0,01g)	ausente	Ausente	Ausente

Letras (a,b,c) dos pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$.

Relativamente à amostra que sofreu dois processos de conservação verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dois processos, para os aeróbios mesófilos e para os bolores e leveduras sendo os valores obtidos para os bolores e leveduras mais elevados, no pólen congelado. Este facto pode estar relacionado com o processo de congelação. Os coliformes totais oscilaram entre $2,67 \times 10^2 \pm 2,57 \times 10^2$ UFC/g (B0 seco) e <10 UFC/g (B0 fresco).

Relativamente aos indicadores de qualidade sanitária, *S.aureus* e *E.coli*, e os esporos de Clostrídios sulfito redutores, encontravam-se também ausentes na amostra de pólen congelado. Não se verificaram diferenças significativas entre as amostras.

Tabela 3. Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos na amostra de pólen desidratado e congelado.

	Amostras	
	B0 seco	B0 fresco
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	$1,39 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10$ a	$3,09 \times 10^2 \pm 1,14 \times 10^2$ b
Bolores e leveduras (UFC/g)	$7,3 \times 10 \pm 2,5 \times 10$ a	$7,67 \times 10^3 \pm 6,45 \times 10^2$ b
<i>S.aureus</i> (UFC/g)	<10 a	<10 a
Coliformes totais (UFC/g)	$2,67 \times 10^2 \pm 2,57 \times 10^2$ a	<10 a
<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	ausente	Ausente
Clostrídios sulfito redutores (em 0,01g)	ausente	Ausente

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$.

3.3 Composição físico-química do pólen

Para avaliar as características físico-químicas do pólen apícola foram determinados, o teor em humidade, atividade da água (a_w), pH, cinzas, açúcares redutores, proteínas, lípidos, teor em hidratos de carbono, o valor energético e o perfil de ácidos gordos. A composição físico-química das amostras de pólen desidratado e congelado apresentam-se na tabela 4 e 5.

As amostras analisadas apresentaram variações, que podem estar relacionadas com a origem geográfica, tempo de recolha, espécies vegetais, solo, meio ambiente e nutrientes presentes na planta (Manning, 2006; Carpes *et al.*, 2008; Estevinho *et al.*, 2012).

O pH das amostras de pólen desidratadas oscilou entre $5,86 \pm 0,03$ (B2) e $4,68 \pm 0,20$ (B0). Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as várias amostras analisadas. Os valores obtidos para o pH estão de acordo com a legislação brasileira e o Código Alimentário Argentino (1998) (4 a 6), e com os resultados publicados por

Herbet *et al.* (1978), Coronel *et al.* (2004), Marchini *et al.* (2006), em amostras de pólen desidratado da América, Argentina e Brasil, respetivamente.

Relativamente à a_w , a amostra B1 ($0,34 \pm 0,02$) apresentou o valor mais elevado, e a amostra B2 o mais reduzido ($0,28 \pm 0,01$). A amostra B1 diferia estatisticamente ($p < 0,05$) das amostras B0 e B2. Todos os valores obtidos foram similares aos obtidos por Morais *et al.* (2009), Feás *et al.* (2012) e Nogueira *et al.* (2012) para amostras de pólen desidratadas de Portugal.

O teor em cinzas variou entre $1,98 \pm 0,08\%$ (B0) e $2,59 \pm 0,02\%$ (B2). Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a amostra B2 e as restantes amostras analisadas. Todos os valores obtidos estão de acordo com o Código Alimentario Argentino (1998), isto é, compreendidos entre 2% a 5%. Foram também idênticos aos determinados por Almeida-Muradian *et al.* (2005) ($2,1 \pm 0,8\%$) e Bonvehi *et al.* (1997) (4,8%) em amostras de pólen desidratado do Brasil e da Espanha, respetivamente.

A humidade desempenha um papel muito importante nas características organoléticas do pólen (Coronel *et al.*, 2004). O conteúdo de humidade nas amostras desidratadas analisadas variou entre $15,13 \pm 0,21\%$ (B2) e $17,30 \pm 0,14\%$ (B1). A amostra B2 foi significativamente diferente ($p < 0,05$) das amostras B0 e B1 que não diferiram significativamente entre si. Todas as amostras apresentaram um teor de humidade elevado, ultrapassando os limites máximos estabelecidos pela legislação do Brasil (4%), Argentina (8%), Bulgária (10%), Polónia e Suíça (6%) (Melo *et al.*, 2011). Os nossos resultados sugerem que as amostras de pólen desidratado não podiam ser comercializadas, uma vez que ultrapassaram os valores estabelecidos pela legislação. Convém no entanto salientar que Portugal carece de especificações para este produto apícola. Segundo Marchini *et al.* (2006) esta situação pode estar relacionada com o facto, do pólen ser um produto higroscópico, sendo afetado facilmente pelas condições ambientais. Teores de água elevados favorecem a multiplicação de microrganismos, no entanto, teores abaixo de 3% podem afetar negativamente a cor e estimular processos químicos, tais como reações de Maillard, perda de compostos voláteis e promover o aparecimento de odores indesejáveis (Estevinho *et al.*, 2012).

O conteúdo em proteína no pólen variou entre $24,53 \pm 0,36\%$ (B2) e $17,81 \pm 0,09\%$ (B1). A amostra B2 foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das amostras B0 e B1. Os nossos resultados foram similares aos obtidos por Almeida-Muradian *et al.* (2005), González-Martín *et al.* (2007) e Carpes *et al.* (2008) em amostras de pólen do

Brasil e Espanha. O teor de proteína do pólen Português obtido por Estevinho *et al.* (2013) variou entre 34,18% a 24,23%.

O teor em gordura total variou entre $8,60 \pm 0,09\%$ (B0) e $4,38 \pm 0,09\%$ (B1). Estatisticamente a amostra B0 diferiu significativamente ($p < 0,05$) das restantes. Os resultados obtidos neste trabalho foram idênticos aos de Herbert *et al.* (1978), Almeida-Muradian *et al.* (2005) e Marchini *et al.* (2006), em amostras de pólen dos Estados Unidos da América e do Brasil, respetivamente, e ligeiramente superiores aos determinados por Nogueira *et al.* (2012), em amostras de pólen de Portugal.

A amostra de pólen desidratado que apresentou maior teor em hidratos de carbono foi a amostra B1 ($75,79 \pm 0,08\%$). O valor mais reduzido observou-se na amostra B2 ($68,37 \pm 0,77\%$). Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras B0 e B2. Os nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por Nogueira *et al.* (2012) (84,25% - 69,68%), Feás *et al.* (2012) (70,5% - 61,2%) e Estevinho *et al.* (2013) (70,6% - 60,82%), em amostras de pólen de Portugal.

O conteúdo em açúcares redutores foi maior na amostra B0 ($53,55 \pm 0,60\%$) e menor na amostra B2 ($42,46 \pm 0,32\%$). Pelo teste de Tukey observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as três amostras. Os nossos resultados são similares aos obtidos por Carpes (2008) em amostras de pólen do Brasil que variaram entre os $48,79 \pm 4,16\%$, e ligeiramente superiores aos de González-Martín *et al.* (2007) em amostra de pólen da Espanha (23,2 a 40,8%). Segundo Silva *et al.* (2006) e Carpes *et al.* (2009), o teor de açúcares redutores elevado no pólen está associado à quantidade de mel ou néctar presentes neste produto.

O valor energético dos pólenes analisados oscilou entre $411,90 \pm 1,63$ Kcal/100g (B2) e $435,28 \pm 0,48$ Kcal/100g (B0), verificou-se que a amostra B0 diferiu significativamente ($p < 0,05$) das amostras B1 e B2. Nogueira *et al.* (2012) e Féas *et al.* (2012) obtiveram valores idênticos em amostras de pólen Português. Estes valores sugerem que o pólen apícola é uma boa fonte de energia.

Tabela 4. Composição química das amostras de pólen apícola desidratado.

	Amostras		
	B0	B1	B2
pH	4,68±0,20 a	5,28±0,09 b	5,86±0,03 c
Atividade da água (a _w)	0,29±0,00 a	0,34±0,02 b	0,28±0,01 a
Cinzas (%)	1,98±0,08 a	2,18±0,30 a	2,59±0,02 b
Humidade (%)	17,12±0,15 b	17,30±0,14 b	15,13±0,21 a
Proteínas (%)	18,94±1,94 a	17,81±0,09 a	24,53±0,36 b
Lípidos (%)	8,60±0,09 b	4,38±0,09 a	4,45±0,31 a
Hidratos de Carbono (%)	71,55±0,96 a	75,79±0,08 b	68,37±0,77 a
Açúcares redutores (%)	53,55±0,60 c	48,86±1,32 b	42,46±0,32 a
Valor energético (Kcal/100g)	435,28±0,48 b	413,87±0,14 a	411,90±1,63 a

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$

Os valores obtidos para a amostra de pólen que sofreu os dois processos de conservação apresentam-se na tabela 5.

Verificou-se que os valores obtidos para o pH ($5,60 \pm 0,11$) e para a a_w ($0,59 \pm 0,01$) do pólen congelado foram superiores ao do pólen desidratado. Para ambos os parâmetros analisados verificaram-se diferenças significativas entre as amostras desidratadas e congeladas ($p < 0,05$). O pH da amostra congelada situou-se dentro dos valores legislados. Convém salientar que a a_w elevada favorece o crescimento de bactérias e fungos, principalmente de fungos produtores de micotoxinas (Morgano *et al.*, 2011).

Não se verificaram diferenças significativas no teor de cinzas da amostra desidratada e congelada. Os resultados obtidos para a amostra congelada foram idênticos aos observados por Almeida-Muradian *et al.* (2005) e por Vit. *et al.* (2008) em amostras de pólen congelado do Brasil e da Venezuela.

O conteúdo de humidade da amostra congelada ($25,22 \pm 0,06\%$) foi superior ao da amostra desidratada ($17,12 \pm 0,15\%$). As amostras apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si. Almeida-Muradian *et al.* (2005), Human *et al.* (2006) e Vit. *et al.* (2008) obtiveram valores mais reduzidos para este parâmetro em pólen do Brasil, África do Sul e Venezuela, respetivamente.

No que diz respeito ao teor em proteína, não se verificaram diferenças significativas entre as amostras. Vit. *et al.* (2008), obtiveram valores superiores para este parâmetro em amostras de pólen congelado da Venezuela, porém os resultados obtidos por Almeida-Muradian *et al.* (2005) em pólen congelado do Brasil foi idêntico aos observados neste estudo.

No que diz respeito ao teor em gordura a amostra congelada e desidratada diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si. O valor obtido para o pólen congelado, foi similar ao valor determinado por Human *et al.* (2006) em amostras de pólen da África do Sul.

Os nossos resultados são corroborados pelas observações de Human *et al.* (2006). Este autor verificou que o teor em hidratos de carbono do pólen congelado era mais elevado do que os do pólen desidratado. O teor em hidratos de carbono da amostra congelada foi superior ao da amostra desidratada. As diferenças entre as amostras foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Relativamente ao conteúdo em açúcares redutores, este foi superior na amostra desidratada. Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas amostras.

Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o valor energético da amostra de pólen congelada e desidratada. O pólen desidratado obteve maior valor energético quando comparado com o congelado. Este facto sugere que o pólen desidratado (B0 seco) é mais concentrado do que o pólen congelado (B0 fresco), afetando deste modo a composição percentual da amostra.

Tabela 5. Composição química da amostra de pólen apícola desidratado e congelado.

	Amostras	
	B0 seco	B0 fresco
pH	4,68±0,20 a	5,60±0,11 b
Atividade da água (a_w)	0,29±0,00 a	0,59±0,01 b
Cinzas (%)	1,98±0,08 a	1,80±0,02 a
Humidade (%)	17,12±0,15 a	25,22±0,06 b
Proteínas (%)	18,94±1,94 a	17,60±0,53 a
Lípidos (%)	8,60±0,09 a	4,80±0,74 b
Hidratos de Carbono (%)	71,55±0,96 a	75,79±1,25 b
Açúcares redutores (%)	53,55±0,60 a	44,02±0,48 b
Valor energético (Kcal/100g)	435,28±0,48 a	416,83±3,82 b

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$

3.4 Perfil de ácidos gordos

A composição e análise do perfil dos ácidos gordos das amostras de pólen apícola apresentam-se na tabela 6 e 7.

Da análise às tabelas verifica-se que no total foram encontrados 17 ácidos gordos, 10 pertencem à família dos ácidos gordos saturados (SAT), 4 à família dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e 3 pertencem à família dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA).

Relativamente às amostras desidratadas (B0, B1 e B2), constatou-se que a amostra B0 foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das amostras B1 e B2 no que diz respeito ao conteúdo de gordura saturada (SAT), tendo variado entre os $1,21 \pm 0,00$ % (B1) e $2,80 \pm 0,09$ % (B0). Em relação aos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as três amostras desidratadas. O teor destes compostos oscilou entre $1,33 \pm 0,02$ % (B0) e $0,21 \pm 0,03$ % (B2). Relativamente aos ácidos polinsaturados (PUFA), observou-se que a amostra B0 diferencia-se significativamente ($p < 0,05$) das amostras B1 e B2.

No que diz respeito à amostra que sofreu os dois processos de conservação, verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor em gordura saturada (SAT), MUFA e PUFA. O conteúdo dos SAT variou entre $2,80 \pm 0,09\%$ (B0 seco) e $1,50 \pm 0,16\%$ (B0 fresco). No que respeita aos MUFA estes oscilaram entre $1,33 \pm 0,01\%$ (B0 seco) e $0,45 \pm 0,03\%$ (B0 fresco). Os valores obtidos para os PUFA variaram entre $3,91 \pm 0,04\%$ e $2,36 \pm 0,16\%$, para o pólen desidratado e congelado, respetivamente.

Relativamente aos teores de ácido butírico (C4), ácido capróico (C6), ácido caprílico (C8), ácido cáprico (C10), ácido palmitoléico (C16:1), ácido araquídico (C20), ácido gadoléico (C20:1), ácido eicosapentaenóico (C20:5), ácido beênico (C22) e ácido erúico (C22:1) não se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as várias amostras analisadas.

Os resultados da tabela 6, referente às amostras desidratadas demonstram que os ácidos láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16), esteárico (C18), variam entre $0,00 \pm 0,00\%$ (B1 e B2) a $0,12 \pm 0,00\%$ (B0), $0,00 \pm 0,00\%$ (B1) a $0,36 \pm 0,05\%$ (B0), $0,91 \pm 0,02\%$ (B2) a $1,94 \pm 0,06\%$ (B0) e $0,04 \pm 0,05\%$ (B1) a $0,26 \pm 0,01\%$ (B0), respetivamente. Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a amostra B0 com as amostras B1 e B2, para todos estes ácidos gordos analisados.

Os valores obtidos para o ácido oleico (C18:1) oscilaram entre $1,33 \pm 0,01\%$ (B0) e $0,21 \pm 0,03\%$ (B2), sendo de notar a existência de diferenças significativas ($p = 0,05$) entre as três amostras em estudo. O conteúdo mais elevado de ácido linoleico (C18:2) foi de $2,94 \pm 0,02\%$ na amostra B0, enquanto a amostra B2 apresentou o nível mais baixo $0,95 \pm 0,07\%$. Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a amostra B0 em relação à B1 e B2, não ocorrendo o mesmo entre as amostras B1 e B2 desidratadas. Relativamente ao ácido linolénico (C18:3), os valores obtidos variaram entre $0,96 \pm 0,00\%$ na amostra B1 e $1,20 \pm 0,09\%$ na B2. Não se observaram diferenças significativas entre as amostras.

Na tabela 7 apresentam-se os resultados obtidos na amostra que foi desidratada e conservada no congelador. O processo de conservação influenciou significativamente ($p < 0,05$) o teor de ácidos gordos, nomeadamente o ácido láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16), esteárico (C18), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3). Constatou-se que o teor destes ácidos na amostra desidratada foi superior ao da amostra congelada.

Em todas as amostras de pólen analisadas quer sejam desidratadas, quer congeladas, os PUFA foram os que se encontram em maior quantidade em todas as amostras analisadas, seguido pelos SAT e MUFA. Os nossos resultados são corroborados pelas observações de Estevinho *et al.* (2012) em amostras de pólen Português desidratadas. O ácido gordo mais abundante em todas as amostras estudadas foi o ácido linoleico (C18:2), seguido dos ácidos linolênico (C18:3) e oleico (C18:1). Os valores obtidos são inferiores aos descritos por Bonvehí *et al.* (1997) em amostra de pólen desidratado de Espanha. Os valores obtidos para estes ácidos gordos por estes investigadores foram 31,3%, 12,4% e 19,1%, respetivamente. Estes ácidos gordos, ricos em ómega 3, 6 e 9 devem fazer parte da alimentação humana, pois o nosso organismo é incapaz de os sintetizar (Čeksterytè *et al.*, 2008).

Os perfis de ácidos gordos obtidos no nosso trabalho foram semelhantes aos descritos por Szczęsna (2006b), Estevinho *et al.* (2012) e Féas *et al.* (2012) em amostras de pólen desidratado da Coreia e China, Polónia e Portugal.

Tabela 6. Perfil dos ácidos gordos das amostras de pólen desidratado.

Amostras	Gordura total	SAT	MUFA	PUFA	N.I	C4	C6	C8	C10
B0	8,61±0,09 b	2,80±0,09 b	1,33±0,01 c	3,91±0,04 b	0,57±0,13 a	0,02±0,02 a	0,04±0,02 a	0,10±0,00 a	0,01±0,00 a
B1	4,39±0,09 a	1,21±0,00 a	0,43±0,01 b	2,00±0,00 a	0,75±0,08 a	0,03±0,04 a	0,05±0,01 a	0,11±0,01 a	0,02±0,00 a
B2	4,45±0,31 a	1,24±0,07 a	0,21±0,03 a	2,25±0,31 a	0,75±0,04 a	0,03±0,01 a	0,05±0,01 a	0,11±0,01 a	0,00±0,00 a

Amostras	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C20
B0	0,12±0,00 b	0,36±0,05 b	1,94±0,06 b	0,00±0,00 a	0,26±0,01 b	1,33±0,01 c	2,94±0,02 c	0,98±0,02 b	0,00±0,00 a
B1	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,98±0,01 a	0,00±0,00 a	0,04±0,05 a	0,40±0,06 b	1,04±0,00 a	0,96±0,00 ab	0,00±0,00 a
B2	0,00±0,00 a	0,91±0,02 a	0,91±0,02 a	0,00±0,00 a	0,11±0,02 a	0,21±0,03 a	0,95±0,07 a	1,20±0,09 b	0,00±0,00 a

Amostras	C20:1	C20:5	C22	C22:1
B0	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
B1	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,04±0,05 a
B2	0,00±0,00 a	0,11±0,15 a	0,06±0,08 a	0,00±0,00 a

N.I – Não identificados
SAT – Saturados
MUFA – Monoinsaturados
PUFA – Polinsaturados

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 7. Perfil dos ácidos gordos da amostra de pólen desidratado e congelado.

Amostras	Gordura total	SAT	MUFA	PUFA	N.I	C4	C6	C8	C10
B0 seco	8,60±0,09 a	2,80±0,09 a	1,33±0,01 a	3,91±0,04 a	0,57±0,13 a	0,02±0,02 a	0,04±0,02 a	0,10±0,00 a	0,01±0,00 a
B0 fresco	4,80±0,74 b	1,50±0,16 b	0,45±0,03 b	2,36±0,16 b	0,50±0,40 a	0,04±0,01 a	0,04±0,00 a	0,09±0,01 a	0,00±0,00 a

Amostras	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C20
B0 seco	0,12±0,00 a	0,36±0,05 a	1,94±0,06 a	0,00±0,00 a	0,26±0,01 a	1,33±0,01 a	2,94±0,02 a	0,98±0,02 a	0,00±0,00 a
B0 fresco	0,01±0,00 b	0,13±0,16 b	1,06±0,07 b	0,00±0,00 a	0,08±0,02 b	0,45±0,03 b	1,68±0,05 b	0,69±0,11 b	0,00±0,00 a

Amostras	C20:1	C20:5	C22	C22:1
B0 seco	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
B0 fresco	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$.

N.I – Não identificados

SAT – Saturados

MUFA – Monoinsaturados

PUFA - Polinsaturado

3.4 Correlação entre a composição físico-química e a microbiota do pólen apícola

As correlações entre a composição físico-química e os parâmetros microbiológicos para o pólen desidratado e congelado, apresentam-se nas tabelas 8 e 9.

No que diz respeito ao pH verificou-se uma correlação positiva com as proteínas. Esta correlação pode ser explicada pelo facto da solubilidade das proteínas depender do pH, isto é, a desnaturação das proteínas pode provocar variações de pH. A correlação entre a a_w , a humidade e os bolores e leveduras foi altamente significativa ($p < 0,01$). De facto, valores de a_w e humidade elevada facilitam o crescimento microbiano.

Constatou-se uma correlação positiva altamente significativa ($p < 0,01$) entre os açúcares redutores, os lípidos, valor energético e aeróbios mesófilos. A correlação entre os açúcares redutores e os coliformes totais foi significativa ($p < 0,05$). Os lípidos apresentaram uma correlação positiva altamente significativa ($p < 0,01$) com o valor energético e com os aeróbios mesófilos e, uma correlação positiva significativa ($p < 0,05$) com os coliformes totais. A correlação entre os hidratos de carbono e os bolores e leveduras é significativa. Esta correlação pode ser explicada, pelo facto dos hidratos de carbono serem a principal fonte de carbono e energia utilizada por estes microrganismos.

Observou-se uma correlação positiva altamente significativa ($p < 0,01$) entre o valor energético e os aeróbios mesófilos, sendo a correlação entre o valor energético e coliformes totais positiva e significativa ($p < 0,05$). Esta correlação sugere que, quanto maior for o valor energético do produto maior é a disponibilidade de nutrientes para o crescimento microbiano.

Os aeróbios mesófilos apresentaram uma correlação positiva significativa ($p < 0,05$) com os coliformes totais.

Tabela 8. Matriz de correlação de Pearson entre a composição físico-química e os parâmetros microbiológicos para as amostras de pólen desidratado.

	pH	a _w	Cinzas	Humidade	Açúcares redutores	Proteína	Lípidos	Hidratos de carbono	Valor energético	Aeróbios Mesófilos	Bolores e Leveduras	Coliformes totais
pH	1											
a_w	0,271	1										
Cinzas	0,449	-0,658	1									
Humidade	0,14	0,984**	-0,737	1								
Açúcares redutores	-0,954	-0,377	-0,328	-0,237	1							
Proteínas	0,559	-0,536	0,951**	-0,606	-0,543	1						
Lípidos	-0,847	-0,325	-0,334	-0,161	0,841**	-0,321	1					
Hidratos de carbono	-0,094	0,685	-0,803	0,669	0,116	-0,848	-0,228	1				
Valor energético	-0,864	-0,23	-0,446	-0,062	0,862**	-0,428	0,993**	-0,114	1			
Aeróbios Mesófilos	-0,811	-0,261	-0,353	-0,114	0,753**	-0,283	0,967**	-0,199	0,963**	1		
Bolores e Leveduras	0,304	0,979**	-0,611	0,973**	-0,413	-0,419	-0,25	0,539	-0,168	-0,184	1	
Coliformes totais	-0,590	-0,278	-0,235	-0,181	0,591*	-0,317	0,745*	-0,108	0,735*	0,707*	-0,238	1

** Correlação é significativa ao nível de 0,01

*Correlação é significativa ao nível de 0,05

Da análise da tabela 9 verifica-se uma correlação positiva entre o pH e os açúcares redutores. A correlação entre o pH, proteínas, lípidos e valor energético foi positiva e altamente significativa ($p < 0,01$). Relativamente à a_w , a correlação com os hidratos de carbono foi altamente significativa ($p < 0,01$), enquanto que, com as cinzas, humidade e bolores e leveduras foi significativa. Este resultado sugere que quanto maior for a a_w maior é a quantidade de água disponível no alimento, o que o torna mais propício ao desenvolvimento de bolores e leveduras.

A correlação entre as cinzas e os hidratos de carbono foi altamente significativa ($p < 0,01$). Verificou-se uma correlação positiva altamente significativa ($p < 0,01$) entre a humidade, os hidratos de carbono e os bolores e leveduras. A correlação entre a humidade e os aeróbios mesófilos foi significativa.

No caso, dos açúcares redutores observou-se uma correlação positiva altamente significativa ($p < 0,01$) com os hidratos carbono, e uma correlação positiva com os aeróbios mesófilos. A correlação das proteínas com os hidratos de carbono e o valor energético foi positiva e altamente significativa ($p < 0,01$).

No que diz respeito aos lípidos, verificou-se uma correlação positiva altamente significativa ($p < 0,01$) com o valor energético. Isto já era esperado uma vez que o valor energético depende dos lípidos.

Os aeróbios mesófilos apresentaram uma correlação positiva significativa com os bolores e leveduras, de facto, a maioria das condições que favorecem o crescimento de ambos os grupos de microrganismos são idênticas.

Tabela 9. Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros físico-químicos e os microbiológicos para a amostra de pólen congelado.

	pH	a _w	Cinzas	Humidade	Açúcares redutores	Proteína	Lípidos	Hidratos de carbono	Valor energético	Aeróbios Mesófilos	Bolores e Leveduras
pH	1										
a_w	-0,966	1									
Cinzas	-0,59	0,78	1								
Humidade	-0,443	0,661	0,985	1							
Açúcares redutores	0,566	-0,332	0,332	0,489	1						
Proteínas	1,000**	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	1					
Lípidos	1,000**	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	1,000**	1				
Hidratos de carbono	-1,000	1,000**	1,000**	1,000**	1,000**	-1,000	-1,000	1			
Valor energético	1,000**	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	1,000**	1,000**	-1,000	1		
Aeróbios Mesófilos	0,343	-0,088	0,556	0,69	0,969	-1,000	-1,000	1,000**	-1,000	1	
Bolores e Leveduras	-0,448	0,665	0,986	1,000**	0,484	-1,000	-1,000	1,000**	-1,000	0,686	1

** Correlação é significativa ao nível de 0,01

3.6 Identificação de leveduras

Na tabela 10 apresentam-se as leveduras que foram isoladas e identificadas a partir de amostras de pólen.

Foram identificadas duas espécies de leveduras nas quatro amostras em estudo, sendo que, *Rhodotorula mucilaginosa spp* foi encontrada no pólen desidratado e *Cryptococcus laurentii spp* no pólen congelado.

Rhodotorula mucilaginosa spp é uma levedura ambiental que pode ser encontrada no ar, solo e água quente e salgada. Tem sido reconhecida como agente patogénico para os seres humanos, podendo ser também usada como um indicador de falta de higiene (Nogueira *et al.*, 2012).

Cryptococcus laurentii spp pode provocar doenças em indivíduos imunodeprimidos.

Tabela 10. Leveduras isoladas nas amostras de pólen apícola desidratado e congelado.

Amostras		
Leveduras identificadas	Congelado (fresco)	Desidratado (seco)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-

3.7 Propriedades Bioativas do pólen

Alguns estudos demonstram que as propriedades terapêuticas do pólen apícola estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos, tais como os flavonóides e ácidos fenólicos.

3.7.1 Análise dos compostos fenólicos e flavonóides totais

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos e flavonóides totais das diferentes amostras, apresentam-se nas tabelas 11 e 12.

Da análise da tabela 11, verifica-se que no pólen desidratado o conteúdo em compostos fenólicos, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu oscilou entre 47,47 e 32,64 mg GAE/g na amostra B2 e B0, respetivamente. Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a amostra B2 e as restantes amostras em estudo. Este facto, pode estar relacionado com a origem botânica e geográfica do pólen (Carpes *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos determinados por Carpes *et al.* (2007), Morais *et al.* (2009), Mărghitas *et al.* (2009) e Feás *et al.* (2012) em pólen do Brasil, Roménia e Portugal, respetivamente. No entanto, são corroborados pelas observações de Carpes (2008), LeBlanc *et al.* (2009) e Nogueira *et al.* (2012) em pólen do Brasil, América do Norte e Portugal. Segundo Leja *et al.* (2007) teores elevados de compostos fenólicos correspondem geralmente a uma elevada capacidade antioxidante do pólen.

Em relação ao teor de flavonóides totais determinados pelo método cloreto de alumínio, os resultados variaram entre 11,34 e 6,99 mg CAE/g na amostra B1 e B0. As amostras referidas anteriormente apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si. Os valores obtidos estão em concordância com os de LeBlanc *et al.* (2009), Mărghitas *et al.* (2009) e Feás *et al.* (2012) em amostras de pólen da América do Norte, Roménia e Portugal, respetivamente. Contudo, os valores obtidos por Carpes (2008) em amostras de pólen do Brasil foram mais elevados (2,10 a 28,33 mg CAE/g).

Relativamente à amostra congelada, o teor de compostos fenólicos foi de 48,40 mg GAE/g. Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras sujeitas aos dois processos de conservação. Convém salientar, que o teor de compostos fenólicos da amostra congelada foi superior ao da desidratada.

O teor de flavonóides totais apesar de ser superior na amostra de pólen desidratado 6,99 mg CAE/g, não se verificaram diferenças entre as amostras em estudo.

Tabela 11. Teor de fenóis e flavonóides totais e valores de EC₅₀ obtidos para a atividade antioxidante nas amostras de pólen desidratado.

Amostras	Fenóis totais (mg GAE/g)	Flavonóides totais (mg CAE/g)	EC₅₀ DPPH (mg/mL)	EC₅₀ Poder redutor (mg/mL)
B0	32,64±2,10 a	6,99±0,33 a	1,16±0,01 c	2,04±0,02 ab
B1	32,95±5,82 a	11,34±0,03 b	1,13±0,06 c	1,80±0,02 a
B2	47,47±4,22 b	8,64±1,93 ab	0,90±0,02 b	2,05±0,05 ab

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de p <0,05.

Tabela 12. Teor de fenóis e flavonóides totais e valores de EC₅₀ obtidos para a atividade antioxidante na amostra de pólen desidratado e congelado.

Amostras	Fenóis totais (mg GAE/g)	Flavonóides totais (mg CAE/g)	EC₅₀ DPPH (mg/mL)	EC₅₀ Poder redutor (mg/mL)
B0 seco	32,64±2,10 a	6,99±0,33 a	1,16±0,01 a	2,04±0,02 a
B0 fresco	48,40±0,39 b	6,58±0,29 a	0,74±0,01 b	2,11±0,15 b

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de p <0,05.

3.7.2 Atividade Antioxidante

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante expressos em EC₅₀ das diferentes amostras de pólen, apresentam-se nas tabelas 11 e 12.

3.7.2.1 Atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH

O radical DPPH tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres em produtos apícolas, nomeadamente no pólen apícola (Carpes *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006; Leja *et al.*, 2007).

Os radicais livres DPPH, que inicialmente apresentavam uma cor roxa por terem um elétron livre, perdem essa cor quando um radical de hidrogénico doado por uma molécula antioxidante entra em contacto com a molécula do DPPH (Menezes *et al.* 2009). O parâmetro utilizado para expressar a atividade antioxidante foi EC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH. Por isso, quanto menor o seu valor, maior será a capacidade antioxidante do extrato de pólen (Carpes, 2008).

Os valores de EC₅₀ para os extratos metanólicos de pólen desidratado oscilaram entre 1,16 ± 0,01 (B0) e 0,90 ± 0,02 (B2) mg/mL. A amostra B2 diferiu significativamente (p <0,05) das amostras B0 e B1, enquanto as amostras B0 e B1 não apresentam diferenças entre si.

Os resultados obtidos vão ao encontro das observações de Campos *et al.* (2003) em que atividade antioxidante depende do teor em compostos fenólicos totais, pois a amostra B2 foi a que apresentou maior conteúdo em fenóis totais e menor valor de EC₅₀ do DPPH, conseqüentemente maior atividade antioxidante.

Os resultados obtidos para o EC₅₀ foram ligeiramente inferiores aos determinados por LeBlanc *et al.* (2009), Morais *et al.* (2011) e Feás *et al.* (2012) em amostra de pólen da América do Norte e de Portugal, e similares aos de Nogueira (2012) em amostras de pólen Português.

O EC₅₀ obtido para o pólen congelado foi de 0,74 ± 0,01 mg/mL. Verificaram-se diferenças significativas (p <0,05) entre a amostra congelada e a desidratada. Constatou-se que a amostra de pólen que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi a que evidenciou maior atividade antioxidante, no entanto, não se verificou uma correlação significativa entre estes dois parâmetros.

3.7.2.2 Atividade antioxidante determinada pelo método do Poder redutor

Os valores de EC₅₀ nas amostras desidratadas variaram entre 1,80 ± 0,02 mg/mL (B1) e 2,05 ± 0,05 mg/mL (B2). Entre as amostras B0 e B2 não se verificam diferenças significativas, no entanto, estas diferenciam significativamente (p <0,05) da amostra B1 (Tabela 11).

Os resultados obtidos neste trabalho são corroborados pelas observações de LeBlanc *et al.* (2009) e de Nogueira *et al.* (2012), em amostras de pólen do Brasil e de

Portugal, respetivamente. Morais *et al.* (2011) em pólen Português obteve, para este parâmetro, valores ligeiramente superiores.

Relativamente ao extrato metanólico do pólen congelado, o valor obtido para o EC_{50} foi de $2,11 \pm 0,15$ mg/mL (Tabela 12). Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a amostra desidratada e congelada. A amostra que apresentou a quantidade de flavonóides mais elevada foi a mais eficaz na redução do ião ferrocianeto.

3.7.3 Correlação entre o teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade antioxidante do pólen apícola

Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação entre os métodos de avaliação da atividade antioxidante e a quantidade de fenóis e flavonóides totais nas amostras de pólen analisadas, estão sumariadas na tabela 13 e 14.

Da análise da tabela 13 verifica-se que a correlação entre os fenóis e os flavonóides foi positiva e significativa. De facto, os flavonóides fazem parte dos fenóis totais. No entanto, tal como referido anteriormente, para as várias amostras estudadas, não se verificou uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e a quantidade de fenóis totais.

Convém salientar que, na literatura consultada não há consenso no que diz respeito à correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. Meda *et al.* (2005), Leja *et al.* (2007) e Carpes (2008) referem que esta propriedade biológica está correlacionada positivamente com o teor de compostos fenólicos. Enquanto Carpes *et al.* (2007) obtiveram uma correlação fraca entre estes dois parâmetros. Carpes (2008) refere que esta diferença está relacionada com o método utilizado, ou então, pelo facto de, em ambos os métodos ocorrer a transferência de eletrões de um composto antioxidante, através da perda de um hidrogénio. Porém, Morais *et al.* (2011) e Nogueira *et al.* (2012) não observaram qualquer tipo de correlação.

Tabela 13. Matriz de correlação de Pearson, entre o teor de fenóis e flavonóides totais e atividade antioxidante (DPPH e Poder redutor) nas amostras de pólen desidratado.

	Fenóis totais	Flavonóides totais	DPPH	Poder redutor
Fenóis totais	1			
Flavonóides totais	0,777	1		
DPPH	-0,947	-0,02	1	
Poder redutor	0,466	-0,624	-0,464	1

Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação na amostra de pólen congelada (Tabela 14) foram idênticas aos das amostras desidratadas, isto é, apenas se verificou correlação entre os fenóis e flavonóides.

Tabela 14. Matriz de correlação de Pearson, entre o teor de fenóis e flavonóides totais e atividade antioxidante (DPPH e Poder redutor) na amostra de pólen congelado.

	Fenóis totais	Flavonóides totais	DPPH	Poder redutor
Fenóis totais	1			
Flavonóides totais	0,794	1		
DPPH	-1,000	-1,000	1	
Poder redutor	-1,000	-1,000	-1,000	1

3.7.4 Atividade Antimicrobiana

O pólen apícola é um produto apícola, que para além de possuir compostos fenólicos com atividade antioxidante (Bonvehí *et al.*, 2001), possui também atividade antimicrobiana.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi utilizada como parâmetro para avaliar os efeitos negativos induzidos pelo pólen no crescimento de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras. Os valores obtidos para as concentrações mínimas inibitórias (CMI) induzidas pelos extratos de pólen apresentam-se na tabela 15 e 16.

Verificou-se que os extratos metanólicos de pólen evidenciaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos em estudo (*Staphylococcus xylosus* ESA5, *Staphylococcus epidermidis* ESA77, *Shigella dysenteriae* ESA38, *Klebsiella pneumoniae* ESA36, *Cândida parapsilosis* ESA79, *Pichia membranifaciens* ESA11, *Zygosaccharomyces mellis* ESA133) sendo o efeito dependente do tipo de pólen utilizado e do microrganismo testado (Fig. 16).

Da análise da tabela 15, verifica-se que os extratos B0 e B1 foram os que evidenciaram maior ação inibidora contra *S. dysenteriae* ESA 38 com valores de CMI $5.21 \pm 1,47$ mg/mL, sendo o extrato B2 o menos eficaz (CMI = $6.25 \pm 0,00$ mg/mL). A atividade antimicrobiana do extrato B2 diferiu significativamente ($p < 0,05$) da atividade dos restantes extratos. Em relação à *K. pneumoniae* ESA36, o extrato B0, foi o que induziu uma inibição mais acentuada (CMI = $4,17 \pm 1,47$ mg/mL). De todas as bactérias em estudo *K. pneumoniae* ESA36 foi a mais resistente a todos os extratos de pólen. O extrato de pólen com maior ação inibidora contra *S. xylosus* ESA5 foi o extrato B0, com valores de CMI $4,17 \pm 1,47$ mg/mL, enquanto para *S. epidermidis* ESA77 o extrato B0 e B1 foram os mais eficazes com valores de CMI $2,61 \pm 0,74$ mg/mL, respetivamente. A atividade antimicrobiana do extrato B2 foi significativamente diferente ($p < 0,05$) da atividade dos restantes extratos. Convém salientar, que esta amostra foi a que apresentou maior atividade antioxidante e maior teor em compostos fenólicos. Estes resultados sugerem que a atividade antimicrobiana pode não estar relacionada com o teor de compostos fenólicos, tal como reportado por Barros *et al.* (2006), Pereira *et al.* (2007) e Estevinho *et al.* (2008).

Conforme descrito na literatura, constatou-se que as bactérias Gram-negativas (*S. dysenteriae* ESA38 e *K. pneumoniae* ESA36) foram mais resistentes à ação inibidora do pólen do que as bactérias Gram-positivas (*S. xylosus* ESA5 e *S. epidermidis* ESA77). De facto, segundo Morais *et al.* (2011) as bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que as Gram-positivas, devido à parede celular ter uma estrutura química mais complexa. Estas bactérias além de apresentarem uma maior quantidade de lípidos na parede, em relação às bactérias Gram-positivas, possuem polissacarídeos que determinam a sua toxicidade e patogenicidade.

No que diz respeito às leveduras testadas, todos os extratos de pólen demonstraram atividade antifúngica. Os extratos de pólen com maior efeito inibidor contra *C. parapsilosis* ESA70 foram B0 e B1, apresentando valores de CMI de $10,42 \pm 2,94$ mg/mL, enquanto contra *Z. mellis* ESA133, o extrato B0 foi o mais eficaz, com valores de CMI de $16,67 \pm 5,89$ mg/mL. Relativamente à levedura *P. membranifaciens* ESA11, a atividade antimicrobiana induzida pelo extrato B0 foi a mais acentuada, com valores de CMI $10,42 \pm 2,94$ mg/mL. A atividade antimicrobiana do extrato B2 foi significativamente diferente ($p < 0,05$) da atividade dos restantes extratos. *P. membranifaciens* ESA11 foi a estirpe mais resistente a todos os extratos de pólen estudados.

Carpes *et al.* (2009) referem que o efeito antimicrobiano do pólen apícola é específico para cada espécie microbiana, dependendo da sua composição química a qual está diretamente relacionada com a origem floral e geográfica.

Relativamente à amostra que sofreu dois processos de conservação (Tabela 16), verificou-se que a atividade antimicrobiana induzida pelo extrato B0 (congelado) contra as bactérias Gram-negativas (*S. dysenteriae* ESA38, *K. pneumoniae* ESA36) e Gram-positivas (*S. xylosus* ESA5 e *S. epidermidis* ESA77) foi mais elevada do que a do extrato B0 (desidratado).

No que diz respeito, às leveduras, *C. parapsilosis* ESA70 e *Z. mellis* ESA133 não se verificaram diferenças na atividade antimicrobiana induzida pelas amostras de pólen seco e congelado (CMI = $10,42 \pm 2,94$ mg/mL). Enquanto que, para *P. membranifaciens* ESA11, o extrato congelado foi mais eficaz, com valores de CMI de $10,42 \pm 2,94$ mg/mL.

Tal como referido anteriormente, na generalidade o extrato de pólen congelado apresentou maior atividade antimicrobiana do que o extrato desidratado contra todos os microrganismos testados. De facto, segundo Abouda *et al.* (2011) a variação da atividade antimicrobiana do pólen com as condições de armazenamento, pode estar relacionada com a temperatura, luz e oxigénio.

Tabela 15. Atividade antimicrobiana das amostras de pólen desidratado contra bactérias e leveduras.

Microorganismos							
Bactérias					Leveduras		
Amostras	Gram-negativas		Gram-positiva			<i>P. membranifaciens</i> ESA11 (mg/mL)	<i>Z. mellis</i> ESA133 (mg/mL)
	<i>S. dysenteriae</i> ESA38 (mg/mL)	<i>K. pneumoniae</i> ESA36 (mg/mL)	<i>S. xylosum</i> ESA5 (mg/mL)	<i>S. epidermidis</i> ESA77 (mg/mL)	<i>C. parapsilosis</i> ESA70 (mg/mL)		
B0	5.21±1.47 ab	4.17±1.47 a	4.17±1.47 a	2.61±0.74 a	10.42±2.94 a	16.67±5.89 ab	10.42±2.94 a
B1	5.21±1.47 ab	6.25±0.00 a	5.21±1.47 a	2.61±0.74 a	10.42±1.47 a	20.83±5.84 ab	12.50±0.00 a
B2	6.25±0.00 b	8.33±2.95 a	5.21±1.47 a	4.17±1.47 b	12.50±0.00 a	25.00±0.00 b	16.67±5.89 a

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 16. Atividade antimicrobiana da amostra de pólen desidratado e congelado contra bactérias e leveduras.

Microorganismos							
Bactérias					Leveduras		
Amostras	Gram-negativas		Gram-positivas			<i>P. membranifaciens</i> ESA11 (mg/mL)	<i>Z. mellis</i> ESA133 (mg/mL)
	<i>S. dysenteriae</i> ESA38 (mg/mL)	<i>K. pneumoniae</i> ESA36 (mg/mL)	<i>S. xylosum</i> ESA5 (mg/mL)	<i>S. epidermidis</i> ESA77 (mg/mL)	<i>C. parapsilosis</i> ESA70 (mg/mL)		
B0 seco	5.21±1.47 ab	4.17±1.47 a	4.17±1.47 a	2.61±0.74 a	10.42±2.94 a	16.67±5.89 ab	10.42±2.94 a
B0 fresco	2.61±0.74 a	3.13±0.00 a	2.61±0.74 a	2.08±0.74 a	10.42±2.94 a	10.42±2.94 a	10.42±2.94 a

Letras (a,b,c) os pólenes são diferentes pelo teste de Tukey, para um nível de significância de $p < 0,05$.

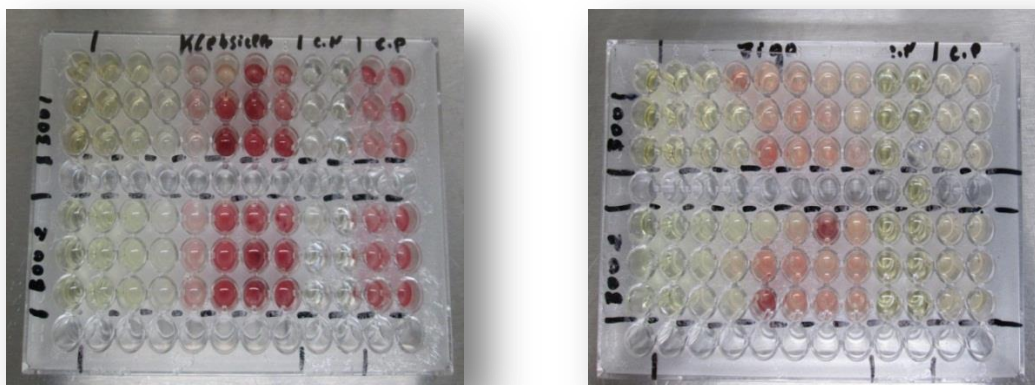


Figura 16. Microplacas com os resultados referentes às leveduras e bactérias.

3.7.5 Correlação entre o teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade antimicrobiana do pólen apícola.

Os coeficientes de correlação de Pearson entre os compostos fenólicos, flavonóides e atividade antimicrobiana, estão apresentados na tabela 17.

Da análise da tabela, verifica-se uma correlação positiva altamente significativa ($p < 0,05$) entre os flavonóides totais e a atividade antimicrobiana para *S.epidermidis* ESA77 e a *S.dysenteriae* ESA38, sugerindo que a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com o conteúdo de flavonóides totais. No entanto, convém salientar que, na literatura consultada não existe um consenso no que diz respeito à correlação entre atividade antimicrobiana e o teor de flavonóides totais. Pereira *et al.* (2007) referem que esta propriedade biológica está relacionada com o teor de flavonóides totais. No entanto, Carpes (2008) não observou qualquer tipo de correlação.

Tabela 17. Matriz de correlação de Pearson, entre os compostos fenólicos, flavonóides e atividade antimicrobiana (microrganismos em estudo).

	Fenóis	Flavonóides
<i>S. xylosum</i> ESA5	-0,288	0,542
<i>S. epidermidis</i> ESA77	0,122	0,664*
<i>S. dysenteriae</i> ESA38	-0,262	0,646*
<i>K. pneumoniae</i> ESA36	0,152	0,505
<i>C. parapsilosis</i> ESA70	0,338	-0,039
<i>P. membranifaciens</i> ESA11	-0,014	0,367
<i>Z. mellis</i> ESA133	0,198	0,485

* Correlação significativa ao nível de 0,05.

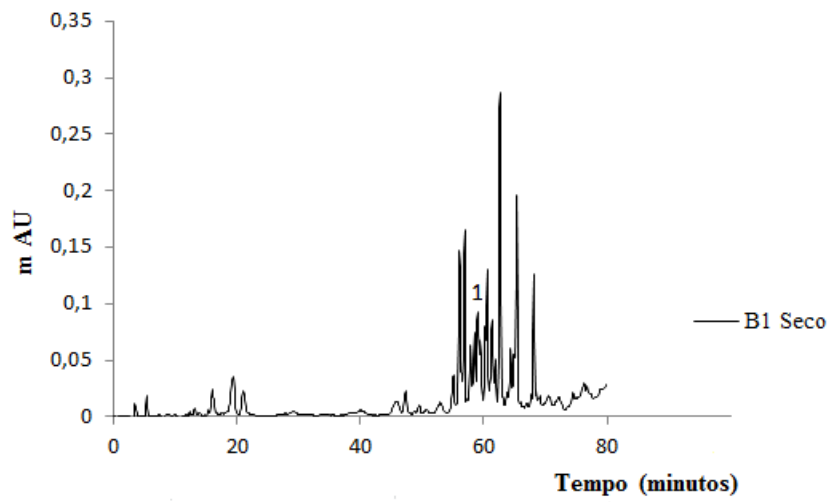
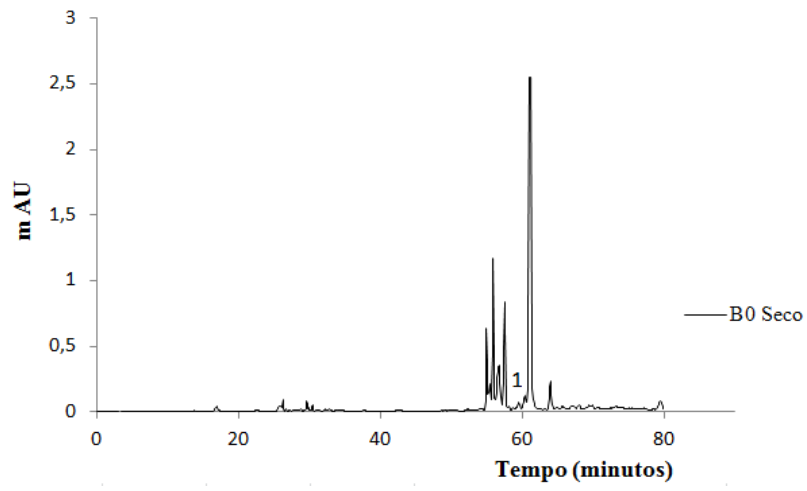
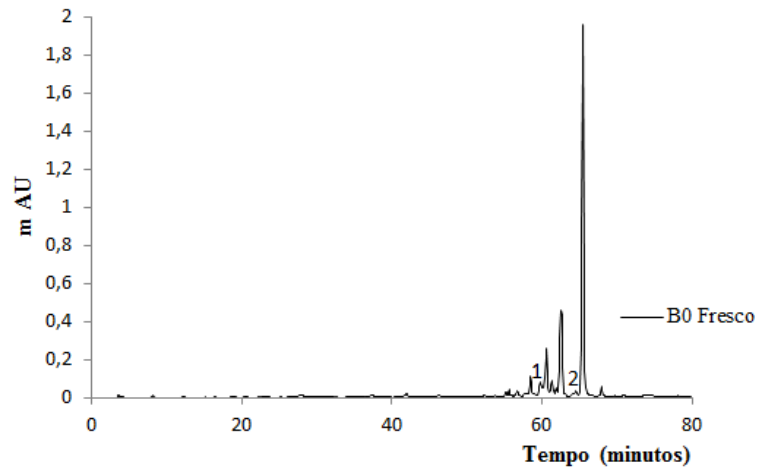
3.8 HPLC

O pólen apícola é muito rico em compostos fenólicos, os quais são os principais responsáveis pelas suas atividades bioativas (Silva *et al.*, 2006, Leja *et al.*, 2007; Mărghitas *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos foram identificados por HPLC/DAD. Os cromatogramas obtidos apresentam-se nas figuras 17 e 18. Os picos foram identificados por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção dos padrões utilizados. A identidade do pico foi confirmada através da sobreposição do espectro de cada pico com os padrões correspondentes. A numeração indica o composto fenólico ou a possível família identificada no pólen apícola.

Como foi referido no capítulo 2 secção 2.6.1, efetuaram-se dois métodos de extração dos compostos fenólicos; 1) utilização de Amberlite XAD-2 e; 2) extração metanólica.

Os resultados obtidos apresentam-se nas figuras 17 e 18 e nas tabelas 18 e 19 após extração com Amberlite XAD-2 e metanol, respetivamente.



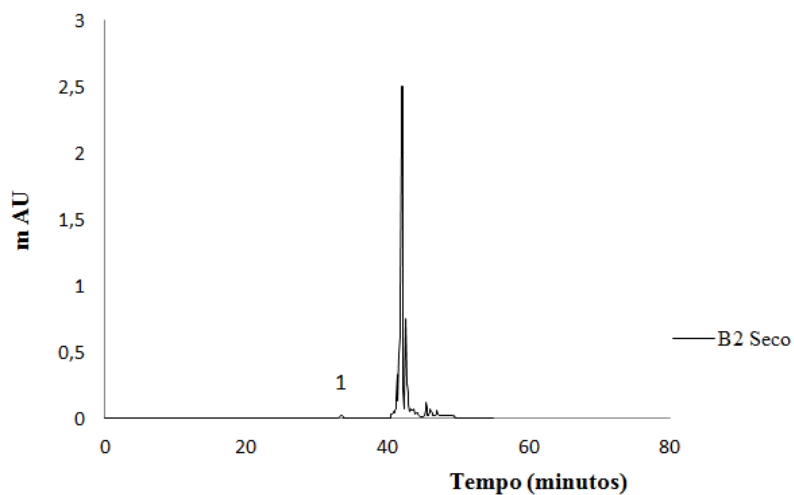
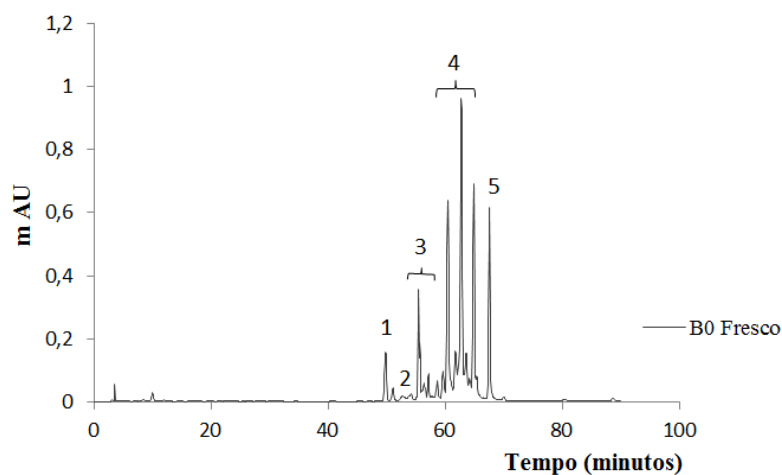


Figura 17. Compostos fenólicos identificados no pólen apícola desidratado e congelado após extração com amberlite.

Tabela 18. Tempo de retenção (T.r) e compostos fenólicos identificados por HPLC nas amostras de pólen apícola desidratado e congelado após extração com amberlite.

Amostras	Pico	T.r (min.)	Compostos Fenólicos
B0 fresco	1	59,938	Quercetina
	2	64,552	Campferol
B0 seco	1	60,345	Quercetina
B1	1	59,209	Quercetina
B2	1	36,108	Ácido ferúlico



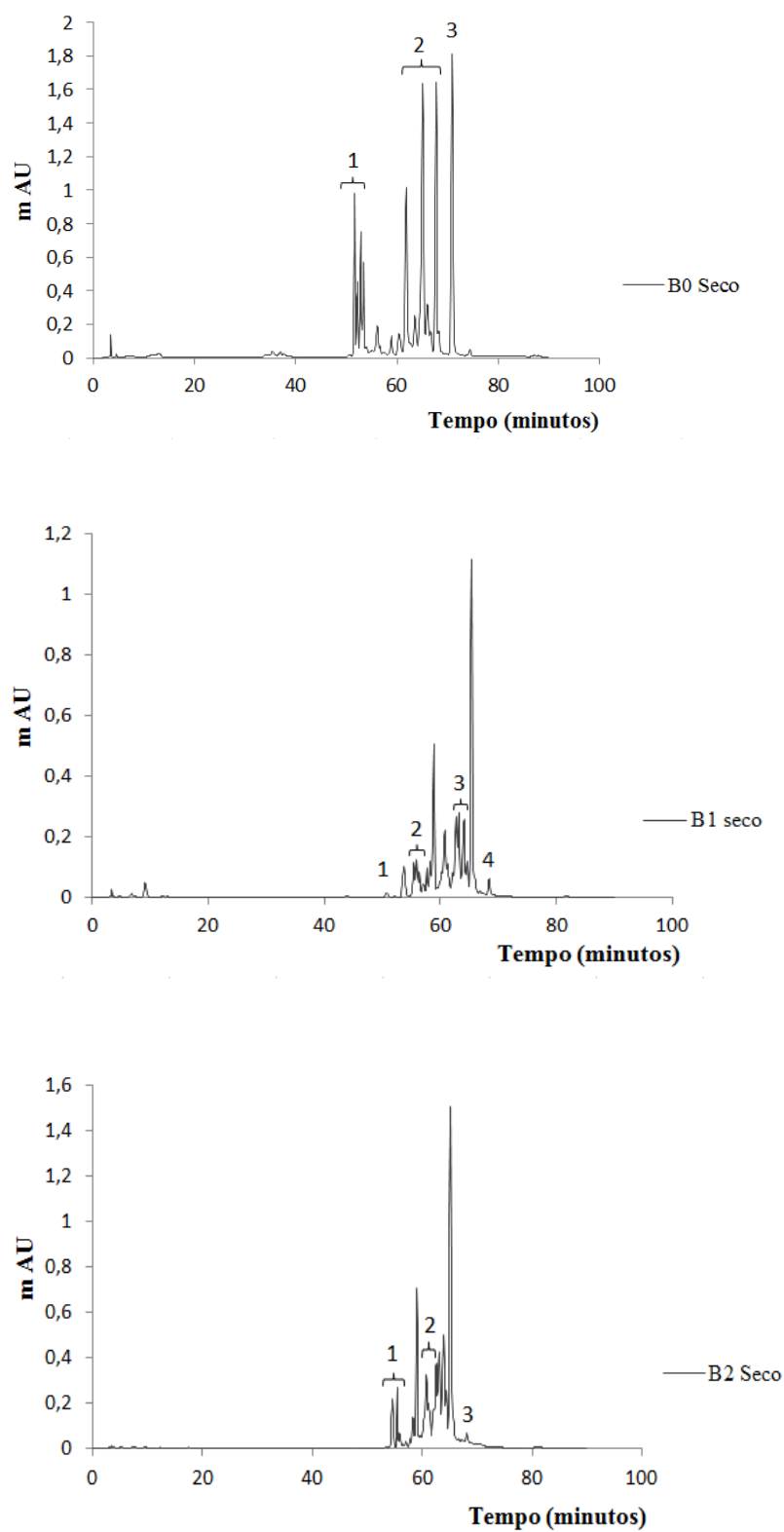


Figura 18. Compostos fenólicos identificados no pólen apícola desidratado e congelado após extração metanólica.

Tabela 19. Tempo de retenção (T.r) e possíveis famílias de compostos identificados por HPLC nas amostras de pólen apícola após extração com metanol.

Amostras	Pico	T.r (min.)	Possível Família
B0 fresco	1	52,7 ± 4,08	Miricetina
	2	54,4 ± 2,29	Quercetina
	3	56,1 ± 0,89	Flavonas
		56,4 ± 0,98	
		56,8 ± 1,10	
		57,6 ± 1,39	
4	61,8 ± 1,95	Desconhecida	
5	64,3 ± 2,13	Crisina	
B0 seco	1	50,5 ± 1,60	Flavonas
		51,0 ± 1,81	
		51,4 ± 2,10	
		51,9 ± 2,19	
	2	61,0 ± 1,13	Desconhecido
		63,4 ± 2,32	
3	66,5 ± 1,74		
3	69,9 ± 1,52	Crisina	
B1	1	49,5 ± 1,85	Miricetina
	2	55,5 ± 0,03	Flavonas
		55,9 ± 0,06	
		56,3 ± 0,13	
		56,7 ± 0,43	
	3	57,3 ± 0,56	Desconhecida
		62,0 ± 0,97	
	62,4 ± 1,04		
63,3 ± 1,16			
4	67,5 ± 1,27	Crisina	
B2	1	52,3 ± 3,26	Flavonas
		53,1 ± 3,31	
		54,1 ± 2,39	
		55,0 ± 1,88	
	2	55,9 ± 1,72	Desconhecida
		58,8 ± 2,69	
	60,9 ± 0,32		
	61,9 ± 0,92		
3	68,8 ± 0,98	Crisina	

Relativamente à extração metanólica, constatou-se que os compostos fenólicos presentes nas várias amostras desidratadas foram idênticas, à exceção da miricetina que apenas foi encontrada na amostra B1.

No que diz respeito à amostra que sofreu dois processos de conservação, verificou-se que a miricetina e a quercetina foram detetadas na amostra congelada e não na desidratada, ou seja, verifica-se que amostra de pólen congelado apresentou mais compostos, quando comparada com a amostra de pólen desidratado, sugerindo que a secagem pode influenciar a qualidade e a quantidade dos compostos fenólicos presentes no pólen apícola.

Da análise dos resultados após extração com Amberlite XAD-2, verificam-se diferenças nos compostos fenólicos nas várias amostras de pólen estudado, sendo que, apenas a quercetina foi encontrada em todos os extratos, à exceção da amostra B2. Verificou-se também, que a extração com metanol foi mais eficaz na extração dos compostos fenólicos do que a extração com Amberlite.

Os nossos resultados são corroborados pelas observações de Carpes *et al.* (2012). Este autor constatou que a quantidade de compostos fenólicos do pólen quando extraídos com etanol foi superior à obtida nas extrações utilizando com resina.

Da análise das tabelas 18 e 19, verifica-se na extração de compostos fenólicos com Amberlite, a quercetina foi o composto dominante. Enquanto que, na extração metanólica foram identificadas possíveis famílias de compostos fenólicos, sendo as flavonas e a crisina as predominantes.



Capítulo 4



Considerações finais

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar o efeito de diferentes condições de armazenamento nas características nutricionais e microbiológicas, bem como, nas propriedades bioativas de pólen apícola biológico de diferentes origens botânicas.

Os resultados obtidos sugerem as seguintes considerações finais:

- *Rosaceae* seguida da *Fagaceae* foram as famílias botânicas predominantes nas amostras de pólen analisadas.
- Os vários parâmetros microbiológicos encontravam-se dentro dos limites estipulados nas especificações consultadas, indicando que o pólen apícola é seguro do ponto de vista microbiológico.
- Os parâmetros físico-químicos apresentavam valores dentro do estipulado por lei, à exceção do teor de humidade, em todas as amostras de pólen desidratado, sendo necessário melhorar o processo de secagem e o armazenamento do pólen.
- Em todas as amostras de pólen analisadas quer sejam desidratadas ou congeladas, o ácido gordo mais abundante foi o ácido linoleico (C18:2), seguido dos ácidos linolênico (C18:3) e oleico (C18:1).
- Foram isoladas duas espécies de leveduras, *Rhodotorula mucilaginosa* no pólen desidratado e *Cryptococcus laurentii* no pólen congelado.
- O teor de compostos fenólicos totais foi superior no pólen congelado, enquanto os flavonóides totais foram mais elevados no pólen desidratado.
- O pólen congelado apresentou uma atividade antioxidante mais elevada e maior quantidade de compostos fenólicos, determinados por HPLC.
- Todos os extratos de pólen apresentaram atividade antimicrobiana, a inibição dependeu do extrato e do microrganismo em estudo
- O extrato de pólen congelado induziu uma inibição mais acentuada do que o desidratado, contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.
- A congelação foi o processo que preservou melhor as características nutricionais do pólen apícola. Contudo, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o pólen apícola, independentemente do processo de conservação, constitui uma boa fonte de compostos fenólicos, sugerindo que este produto possa ser útil na prevenção de doenças. De facto, o pólen poderia ser usado em combinação com os antibióticos, uma vez que até ao momento não

foram encontrados microrganismos resistentes a este produto, tendo sempre em atenção as reações alérgicas em pessoas sensíveis.

Referências Bibliográficas

- Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M., Ahami, M.T. (2011). The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Research Journal of Microbiology*, **6**, 376-384.
- Akond, A.S.M.G.M., Pounders, C.T., Blythe, E.K., Wang, X. (2012). Longevity of crapemyrtle pollen stored at different temperatures. *Scientia Horticulturae*, **139**, 53-57.
- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 105-111.
- Ângelo, P.M., Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Instituto Adolfo Lutz*, **66**, 1-9.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**, 183-198.
- Araújo, P.W.B., Junior, L.J.Q., Vasconcelos, H.D., Almeida, J.R.G.S. (2005). Flavonóides e hipertensão. *Revista Brasileira de Hipertensão*, **12** (3), 188-189.
- Arruda, V.A.S. (2009). Estabilidade de vitaminas do complexo B em pólen apícola. Dissertação para obtenção do grau de Mestre na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade São Paulo.
- Arruda, V.A.S. (2013). Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonóides, atividade antioxidante e origem botânica. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutorado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- Arruda, V.A.S., Pereira, A.A.S., Estevinho, L.M., Almeida-Muradian, L.B. (2013). Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using diferente storage conditions. *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 143-148.

- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**, 27-36.
- Barreto, L.M.R.C. (2004). Pólen apícola brasileiro: perfil da produção, qualidade e caracterização organoléptica. Dissertação apresentada para obtenção do grau de doutorado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista.
- Barreto, L.M.R.C., Funari, S.R.C., Orsi, R.O., Dib, A.P.S. (2006). Produção de pólen no Brasil. Cabral Editora e Livraria Universitária, Taubaté.
- Barros, L., Calhella, R.C., Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Estevinho, L.M. (2011). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur Food Res Technol*, **225**, 151-156.
- Basim, E., Basin, H., Özcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, **77**, 992-996.
- Bastos, D.H.M., Rocha, C.I., Cunha, I.B.S. (2003). Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, **62**, 239-244.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, **72**, 1157-1165.
- Bonvehí, J.S., Jordà, R.E. (1997). Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 725-732.
- Bonvehí, J.S., Torrentó, M.S., Lorente, E.C. (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1848-1853.

- Campos, M., Markham, K.R., Mitchell, K.A., Cunha, P. (1997). An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochemical Analysis*, **8**, 181-185.
- Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R., Mitchell, K.A., Cunha, K.R. (2003). Age-Induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal Agriculture Food Chemical*, **51**, 742-745.
- Campos, M.G.R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L.B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Friferio, C., Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, **47**, 156-163.
- Carpes, S.T. (2008). Estudo das características Físico-Químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Sector de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.
- Carpes, S.T., Alencar, S.M., Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Mourão, G.B., Haminiuk, C.W.I., Luz, C.F.P., Masson, M.L. (2013). Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *Journal of Food*, **11** (2), 150-161.
- Carpes, S.T., Begnini, R., Alencar, M. Masson, M.L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia*, **31**, 1818-1825.
- Carpes, S.T., Cabral, I.S.R., Rosalen, P.L., Alencar, S.M., Masson, M.L. (2009). Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. *Alimentação e Nutrição*, **20**, 271-277.
- Carpes, S.T., P, A., Moreno, I.A.M., Mourão, G.B., Alencar, S.M., Masson, M.L. (2008). Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. *Química Nova*, **31**, 1660-1664.
- Čeksterytė, V., Račys, J., Kaškonienė, V., Venskutonis, P.R. (2008). Fatty acid composition in bready bread. *Biologija*, **54**, 253-257.

- Codigo Alimentario Argentino. (1998). De la Canal y Asociados. Buenos Aires: De la Canal y Asociados.
- Cook, S.M., Awmack, C., Murray, D.A., Williams, I.H., (2003). Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition?. *Ecological Entomology*, **28**, 622-627.
- Cordeiro, P.C.S. (2004). Efeito da variação sazonal na produção de compostos ativos e na actividade antimicrobiana de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray utilizando ensaio com microrganismos. Dissertação apresentada na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo.
- Coronel, B.B., Grasso, D., Pereira, S.C., Fernández, G. Caracterización bromatológica del pólen apícola Argentino. *Ciência, Docencia y Tecnologia*, **29**, 145-181.
- Correia-Oliveira, M.E., Ferreira, A.F., Poderoso, J.C.M., Araújo, E.D., Carnelossi, M.A.G., Ribeiro, G.T. (2008). Actividade de água (aw) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do estado de Sergipe. *Revista da Fapese*, **4**, 27-36.
- Cuchiara, C.C., Souza, S.A.M., Silva, S.D.A., Bobrowski, V.L. (2012). Efeito do tempo de descongelamento de grãos de pólen demamoneira armazenados em diferentes temperaturas. *Biotemas*, **25**, 65-73.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**, 343-356.
- Devi, K.A., Sukrasno & Fidrianny, I. (2010). Characterization of bee pollen from ranca bungur, bogor. *Proceedings of the Third International Conference on Mathematics and Natural Sciences*.
- Dias, M.I.M.F. (2011). Caracterização química e molecular de amostras de *Coriandrum sativum* L. obtidas *in vivo e in vitro*. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança.
- Dornas, W.C., Oliveira, T.T., Rodrigues-das-dores, R.G., Santos, A.F., Nagem, T.J. (2007). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **28**, 241-249.
- Doyle, M. P. (1989). Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker.

- Eifert, J.; Arritt III, F.; Kang, D. (2006). Microbiology of food systems. In: Hui, Y. – Handbook of food science technology and engineering. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 1-57444-552-9. 50.1-50.12.
- Esin, B., Hoseyin, B.M, Musa, Ö. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, **77**, 992-996.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3774-3779.
- Estevinho, L.M., Rodrigues, S., Pereira, A.P., Feás, X. (2012). Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, **47**, 429-435.
- Falcão, S.I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L.M., Barros, C., Domingues, M.R.M., Cardoso, S.M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Anal Bioanal Chem*, **396**, 887-897.
- Fatrocová-Šramková, K., Nůžkova, J., Kačániiová, M., Máriássyová, M., Rovná, K., Stričík, M. (2003). Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **48**, 133-138.
- Feás, X., Vázquez-Tato, M.P., Estevinho, L., Seijas, J.A., Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: Bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, **17**, 8359-8377.
- Fellows, P.J. (2006). Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas. São Paulo: Artmed.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L.M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, **114**, 1438-1443.
- FNAP-Federação Nacional dos Apicultores de Portugal. Manual de produção de pólen e própolis, 2010.

- Forcone, A., Aloisi, P.V., Ruppel, S., Muñoz. (2011). Botanical composition and protein content of pollen collected by *Apis mellifera* L. in the north-west of Santa Cruz (Argentinean Patagonia). *Gran*, **50**, 30-39.
- Franco, B.D.G.M., Landgraf, M. (1996). *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu., 181.
- Freire, K.R.L., Lins, A.C.S., Dórea, M.C., Santos, F.A.R., Camara, C.A., Silva, T.M.S. (2012). Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Molecules*, **17**, 1652-1664.
- Freitas, A.C., Figueiredo, P. (2000). Conservação por utilização de Baixas temperaturas. In: *Conservação de Alimentos*. Lisboa, 629-136.
- Frigerio, C. (2009). *Optimização e influência na bioactividade do processo de secagem por radiação infravermelha de amostras de pólen apícola*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre na Universidade de Farmácia do Porto.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, **10**, 43-53.
- Gilliam, M., Roubik, D.W., Lorenz, B.J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, **21**, 89-97.
- Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1220-1234.
- González, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A. Jiménez, M. (2005). Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 1-9.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J.M., Barros-Ferreiro, N., Marcos, C.C., García-Villanova, R.J. (2007). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. *Talanta*, **72**, 998-1003.

- Hani, B., Dalila, B., Saliha, D., Daound, H., Moulound, G., Seddik, K. (2012). Microbiological Sanitary aspects of pollen. *Advances in Environmental Biology*, **6**, 1415-1420.
- Hassam, H.M.M. (2011). Chemical composition and nutritional value of palm pollen grains. *Global Journal of Biotechnology Biochemistry*, **6**, 01-07.
- Herbert, E.W., Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, **9**, 33-40.
- Hervatin, H.L. (2009). Avaliação microbiológica e físico-química de pólen apícola *in natura* e desidratado sob diferentes temperaturas. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, para obtenção do grau de Mestre em ciências dos alimentos.
- Human, H., Nicolson, S.W. (2006). Nutritional content of fresh. Bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, **67**, 1486-1492.
- Isidorov, V.A., Isidorova, A.G., Szczepaniak, L., Czyżyewska, U. (2009). Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chemistry*, **115**, 1056-1063.
- Ismail, A.H.M., Owayss, A.A., Mohanny, K.M., Salem, R.A. (2012). Evaluation of pollen collected by honey bee, *Apis mellifera* L. colonies at Fayoum Governorate, Egypt. Part 1. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- ISO 21527-2 (2006) - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds — Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95. *International Standards Organization: Winterthur, Switzerland*.
- Kacániová, M., Vuković, N., Chilebo, R., Haščík, P., Rovná, K., Cubon, J., Džugan, M., Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, **64**, 927-934.
- Keller, I., Fluri, P., Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees: part I. *Bee World*, **86**, 3-10.

- Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. Rome: FAO. *FAO Agricultural Services Bulletin*, **124**, 87-113.
- Kroyer, G., Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Inovative Food & Emerging Technologies*, **2**, 171-174.
- LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, **115**, 1299-1305.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekoń, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, **100**, 237-240.
- Lima, A. (2008). Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos in vitro e in vivo presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) Dissertação apresentada para obtenção do grau de doutorado na Universidade de ciências farmacêuticas em São Paulo.
- Loper, G.M., Standifer, L.N., Thompson, M.J., Gilliam, M. (1980). Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus Dulcis*) pollen and bee bread. *Apidologie*, **11**, 63-73.
- Luz, C.F.P., Junior, G.L.B., Fonseca, R.L.S., Sousa, P.R. (2010). Comparative pollen preferences by africanized honeybees *Apis mellifera* L. of two colonies in Pará de Minas, Minas Gerais, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **82**, 293-304.
- Mamede, M.E.O., Miranda, M.P.S., Ritzinger, R., Godoy, R.C.B., Velozo, E.S. (2009). Physico-chemical and sensorial evaluation of new varieties of acerola. *British Food Journal*, **111**, 387-395.
- Manning, R. (2006). Fatty acid composition of pollen and the effect of two dominant fatty acids (linoleic and oleic) in pollen and flour diets on longevity and nutritional composition of honey bees (*Apis mellifera*). Tese apresentada para obtenção do grau de doutorado em filosofia na Universidade de Ciências Biológicas e Biotecnologia na Austrália Ocidental

- Marchini, L.C., Reis, V.D.A., Moreti, A.C.C.C. (2006). Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Afrecanizadas *Apis mellífera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Ciência Rural, Santa Maria*, **36**, 949-953.
- Mărghitas, L.A., Stanciu, O.G., Dezmirean, D.S., Bobiș, O., Popescu, O., Bogdanov, S., Campos, M.G. (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, **115**, 878-883.
- Martins, M.T., Pellizari, V.H., Pacheco, A., Myaki, D.M., Adams, C., Bossolan, J.M.B., Hassuda, S. (1991). Qualidade bacteriológica de águas subterrâneas em cemitérios. *Revista Saúde pública*, São Paulo, **25**, 47-52.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, **91**, 571-577.
- Melo, I.L.P., Almeida-Muradian, L.B. (2010). Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. *Química Nova*, **33**, 514-518.
- Melo, I.L.P., Almeida-Muradian, L.B. (2011). Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **31**, 194-197.
- Menezes, J.D.S. (2009). Compostos Bioativos do pólen apícola. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos na Faculdade de Farmácia da Bahia, Brasil.
- Menon, A.S. e Mujumdar, A.S. (1997). Drying of solids: principles, classification, and selection of dryers. *Handbook of Industrial Drying*. New York: Marcel Dekker Inc., **9**, 295-326.
- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. (2007). Programa Apícola Nacional Triênio de 2008-2010.
- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. (2010). Programa Apícola Nacional Triênio de 2011-2013.

- Modro, A.F.H., Message, D., Luz, C.F.P., Neto, J.A.M. (2007). Nutritional composition and quality of bee pollen collected in Minas Gerais Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasília*, **8**, 1057-1065.
- Montenegro, G. Avila, G., Rougier, D., Timmermann, B. (1997) . Pollen loads: source of carotenoids originating from the mediterranean plant communities of the central zone of Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **70**, 91-99.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., Estevinho, L.M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidante properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 1096-1101.
- Morais, M.B.C. (2009). Caracterização e avaliação biológica do pólen português. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do grau de mestre em Qualidade e Segurança Alimentar.
- Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis sample from Portugal. *Food Chemical Toxicology*, **46**, 3482-3485.
- Morgano, M.A., Milani, R.F., Martins, C.T., Rodriguez-Amaya, D.B. (2011). Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration. *Food Control*, **22**, 1604-1608.
- Mossel, D., Corry, J., Struijk, C.; Baird, R. (1995). Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies. England: John Wiley and Sons Ltd..ISBN 0-471-93036-9. 699.
- Mossel, D., Garcia, B. (1985). Microbiologia de los alimentos. Fundamentos ecologicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. 1ª ed. Espanhola. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. ISBN 84-200-0561-4. 375.
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L.M. (2012). Commercial Bee Pollen With Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 11173-11187.

- Nogueira, C.M.P. (2012). Estudo do pólen apícola comercial. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar.
- Norma Portuguesa (NP) 1829, (1982) – Microbiologia Alimentar – Preparação da amostra para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade (IPQ), Portugal.
- Norma Portuguesa (NP) 2262, (1986) – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- Norma Portuguesa (NP) 3788, (2002) – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30°C. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- Norma Portuguesa (NP) 4400-1, (2002) – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte 1:Técnica com confirmação de colónias (método corrente). Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- Ordóñez, J.A. (2005). Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed.
- Packer, J.F., Luz, M.M.S. (2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **17**, 102-107.
- Panizzi, A.R., Parra, J.R.P. (2009). Bioecologia e nutrição de insetos: base para manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Paramás, A.M.G., Bárez, J.A.G., Marcos, C.C., García-Villanova, R.J., Sánchez, J.S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, **95**, 148-156.
- Parkhill, J.M. (1996). O pólen coletado pelas abelhas, *Apicultura no Brasil*, **12**, 26-37.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.A., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. (2007). Walnut (*Juglans regia*

L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 2287-2295.

Pires, S.M.A., Rodrigues, T., Rocha, A., Pajuelo, A., Pereira, O. (2005). Pollen spectra of honeys from Trás-os-Montes e Alto Douro. *Revista Portuguesa Zootecnia XII*, **1**, 87-99.

Ribeiro, J.G., Silva, R.A. (2007). Estudo comparativo da qualidade de pólen apícola fresco, recém processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas. *Tecnologia & Desenvolvimento Sustentável*, 33-47.

Rodrigues, M.A.A., Keller, K.M., Keller, L.A.M., Oliveira, A.A., Almeida, T.X., Marassi, A.C., Krüger, C.D., Barbosa, T.S., Lorenzon, M.C.A., Rosa, C.A.R. (2008). Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de ilha Grande, Angra dos Reis, RJ*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, **30**, 249-253.

Schulte, F., Lingott, J., Panne, U., Kneipp, J. (2008). Chemical characterization and classification of pollen. *Analytical Chemistry*, **80**, 9551-9556.

Sert, P.P. (2009). Les pollens apicoles. *Phytothérapie*, **7**, 75-82.

Silva, R.N., Monteiro, V.N., Alcanfor, J.A.X., Assis, E.M., Asquiere, E.R. (2003). Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores a totais em mel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **23**, 337-341.

Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Barbosa-Filho, J.M., Silva, E.M.S., Freitas, B.M., Santos, F.A.R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 507-511.

Sinell, H. (1980). Factores que influyen en las poblaciones mixtas. In: Silliker, J.; Elliot, R.; Baird-Parker, A.; Bryan, J.; Christian, J.; Clark, D; Olson, J. & Roberts, T.. Ecología microbiana de los alimentos. Volumen 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Internacional Comision on Microbiological Specifications for Foods. 2ª Edicion.

- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.H., Simonič, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **89**, 191-198.
- Sousa, C.M.M., Silva, H.R.,Vieira-Jr., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, **30**, 351-355.
- Sousa, J.B.A.S.P. (2008). Atividade biológica de derivados do ácido cafeico: Efeito antioxidante e anti-inflamatório. Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para obtenção de grau de mestre.
- Souza, R.C.S., Yuyama, L.K.O., Aguiar, J.P.L., Oliveira, F.P.M. (2004). Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazonica*, **34**, 333-336.
- Szczęśna, T. (2006). Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins. *Journal of Apicultural Science*, **50** (2).
- Szczęśna, T. (2006b). Long-Chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, **50** (2).
- Szczęśna, T. (2007). Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science* **51** (1).
- Tajkarimi, MM., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, **21**, 1199-1218.
- Travaglini, D.A., Neto, M.P., Bleinroth, E.W. (1993). Banana-Passa: Princípios de secagem, conservação e produção industrial. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, **73**.
- Vicenzi, V.M. (2004). O pólen apícola como elemento potencializador dos efeitos advindos da actividade física orientada em idosas. Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em Agroecossistemas na Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Agrárias.

- Vit, P. (2009). Orígen botánico y propiedades medicinales del pólén apícola. *Departamento Ciência de los Alimentos*, **3**.
- Vit, P., Santiago, B. (2008). Composición química de pólén apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, **58**.
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I., Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, **81**, 159-168.
- Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5165-5170.
- Özcan, M., Ünver, A., Ceylan, D.A., Yetişir, R. (2004). Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. *Nahrung/Food*, **48**, 188-194.

ANEXO I

Meios de cultura utilizados na análise microbiológica do pólen apícola

☞ **Plate Count Agar (PCA) – Meio para pesquisa de microrganismos aeróbios**

Triptona – 5g

Extrato de levedura- 2.50g/L

Dextrose – 1.00g/L

Agar – 15.00g/L

Água -1000 mL

pH final (25°C) – 7.0 ± 0.2

Dissolveram-se 23,9g de meio em 1000 mL de água destilada. Esterilizou-se no autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Após arrefecer e agitar verteu-se nas placas de Petri.

☞ **Potato Dextrose Agar (PDA) – Meio para pesquisa de bolores e leveduras**

Infusão de batata – 200.00g/L

Dextrose – 20.00g/L

Agar – 15.00g/L

pH final (25°C) – 5.6 ± 0.2

Dissolveram-se 39g em 1000 mL de água destilada. Procedeu-se à esterilização no autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Deixou-se arrefecer e adicionou-se 10 mL de ácido tartárico. Distribuiu-se o meio por cada placa de Petri.

✎ **Baird-Parker (BP) – Meio para pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positiva**

Triptona – 10.00g/L

Extrato de carne – 5.00g/L

Extrato de leveduras – 1.00g/L

Glicina – 12.00 g/L

Piruvato de Sódio – 10.00g/L

Cloreto de Lítio – 5.00g/L

Agar – 20.00g/L

pH final (25°C) – 7,0 ± 0.2

Suspenderam-se 63.0g de meio em 950 mL de água destilada. Esterilizou-se no autoclave a uma pressão de 15lbs durante 15 minutos. Deixou-se arrefecer, e assepticamente foram adicionados 50 mL de emulsão de gema de ovo (FD045).

✎ **Meio para pesquisa de esporos de Clostídios sulfito redutores**

Agar – 30g

Solução de sulfito de ferro a 8% - 10 mL

Solução de glicose sulfito – 150 mL

Solução de sulfato de sódio a 8% - 20 mL

Alúmen de ferro – 20 gotas

Água destilada – 1000 mL

pH final (25°C) – 7.6 ± 0.1

Dissolveram-se 30g de Agar em 10 mL de solução de sulfato de ferro em 1000 mL de água destilada e ferver. Após ebulição, adicionaram-se 150 mL de solução de glicose sulfito, previamente preparada. Ao meio fundido, juntaram-se 20 mL da solução de sulfato de sódio e 20 gotas de alúmen de ferro.

✎ Meios para a atividade antimicrobiana

Meio YPD líquido

Peptona – 10g

Extrato de leveduras – 5g

Glucose – 20g

Água destilada – 1000 mL

Dissolveram-se todos os componentes em 1000 mL de água e procedeu-se à esterilização no autoclave a uma pressão de 15lbs durante 15 minutos.

Meio YPD sólido

Agar – 20g

Peptona – 10g

Extrato de leveduras – 5g

Glucose – 20g

Água destilada – 1000 mL

Dissolveram-se todos os componentes em 1000 mL de água e procedeu-se à esterilização no autoclave a uma pressão de de 15lbs durante 15 minutos

ANEXO II

Reagentes utilizados para a caracterização físico-química do pólen apícola

☞ Preparação da solução DNS (3,5 – dinitrossalícilico)

Dissolveram-se 2g de DNS em 40 mL de NaOH (2M) a 80°C. Simultaneamente diluíram-se 60g de tártaro duplo de sódio e de potássio (Sal de Rochelle) em 100 mL de água destilada. Após dissolução completa, misturaram-se as duas soluções e fez-se o volume de 200 mL de água destilada. A solução foi conservada num frasco e local escuro.

Reagentes utilizados na avaliação da atividade antioxidante do pólen

Método do DPPH

☞ Solução DPPH

Dissolveram-se 2,4mg de DPPH em um pouco de água destilada e fazer o volume de 100 mL.

Método do Poder Redutor

☞ Solução tampão fosfato (0,2M) pH = 6,6

Dissolveram-se 6,95g de dihidrogenofosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (2M) de sódio em água destilada, num balão volumétrico de 250 mL e 14,2g de hidrogenofosfato dissódico (Na_2PO_4) (4M) em água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Prepararam-se 250 mL de solução tampão, adicionando-se 156,26 mL da solução de dihidrogenofosfato e 93,75 mL de solução hidrogenofosfato dissódico, ajustando o pH.

✎ **Ácido tricloroacético (10%)**

Dissolveram-se 10g de ácido tricloroacético (TCA) em 100 mL de água destilada.

✎ **Solução de ferrocianeto de potássio (1%) (solução diária)**

Dissolveu-se 1g de ferrocianeto de potássio em um pouco de água destilada, adicionando-se 1 mL de HCl (1M), num balão volumétrico de 100 mL.

✎ **Solução de cloreto de ferro (0,1%) (solução diária)**

Dissolveram-se 0,06g de cloreto de ferro em um pouco de água, adicionando-se 1 mL de HCl (1M), num balão volumétrico de 100 mL.