

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado

Adriane Alexandre Machado de Melo

São Paulo  
2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e  
propriedades biológicas do pólen apícola desidratado

Adriane Alexandre Machado de Melo

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.  
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Assoc. Ligia Bicudo de  
Almeida Muradian

São Paulo

2015

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

M528p Melo, Adriane Alexandre Machado de  
Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e  
propriedades biológicas do pólen apícola desidratado / Adriane  
Alexandre Machado de Melo. - São Paulo, 2015.  
341p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição  
Experimental  
Orientador : Almeida-Muradian, Ligia Bicudo de

1. Ciência dos alimentos I. T. II. Almeida-Muradian, Ligia  
Bicudo de, orientador.

641 CDD

Adriane Alexandre Machado de Melo

Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Profa. Assoc. Ligia Bicudo de Almeida Muradian  
Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, 16 de novembro de 2015.

Dedico este trabalho à minha família, em  
especial aos meus pais e irmã:

**Joana Alexandre Machado**  
**Orozimbo Machado de Melo**  
**Admair Alexandre Machado**

*Por todo amor, confiança e apoio  
incondicional às minhas escolhas.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Assoc. Ligia Bicudo de Almeida Muradian por confiar em meu trabalho, pela disposição em auxiliar em todos os momentos e pelo conhecimento compartilhado durante estes anos de orientação.

À Profa. Dra. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho por me receber e supervisionar no desenvolvimento de parte das análises. À Profa. Dra. Cristina Maria Fernandes Delerue Alvim de Matos por me acolher em seu laboratório e me fazer parte de sua equipe.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança/Portugal, ao Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto, por permitirem o acesso aos laboratórios e uso de equipamentos.

À Profa. Dra. Ortrud Monika Barth Schatzmayr e Alex da Silva de Freitas pela parceria na realização das análises polínicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto (Processo 2011/51741-5), bolsa de doutorado (Proc. 2011/11746-8) e bolsa estágio de pesquisa no Exterior - BEPE (Proc. 2013/23179-6). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado (Proc. 143020/2011-0) concedida durante período anterior a aprovação da bolsa FAPESP.

Aos professores membros desta comissão julgadora pela disponibilidade e considerações a respeito deste estudo.

Aos professores que contribuíram como membros da banca de qualificação: Prof. Dr. Eduardo Purgatto, Profa. Assoc. Suzana Caetano da Silva Lannes, Profa. Dra Emilia Yasuko Ishimoto.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Análise de Alimentos, em especial aos companheiros de pós-graduação Bianca Rodrigues de Souza e José Augusto Gasparotto Sattler e também aos alunos de iniciação científica Davi Figueiredo Sampaio Meira, Juliana Chan, Larissa Andrade Ramos, Marianne Kaori Nagai e Tarik Klain por todo o trabalho que desenvolvemos juntos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Lípidos da FCF/USP, do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária e do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto/Portugal, em especial a Georgina Tolentino e a Manuela Moreira pela amizade, pela disponibilidade em ensinar e me auxiliar na execução das análises.

Aos técnicos Elias da Silva Araújo, Luciene Fagundes Lauer Macedo e Rosa Maria Cerdeira Barros que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Às amigas Fernanda Salamoni Becker, Karla Rubia Ananias e Yavanna Mariño pelo apoio, conselhos e carinho.

Aos professores e funcionários Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Aos apicultores que nos forneceram amostras e acreditaram na importância desta pesquisa para a cadeia apícola.

Aprendi que mais vale tentar do que recuar, antes acreditar que duvidar. O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.

**Cora Coralina**

## RESUMO

DE-MELO, A. A. M. **Perfil químico e microbiológico, cor, análise polínica e propriedades biológicas do pólen apícola desidratado**. 2015. 341f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O objetivo deste estudo foi levantar informações a respeito do processo de produção, determinar características físico-químicas, qualidade microbiológica, propriedades biológicas e origem botânica do pólen apícola desidratado, além de avaliar a influência de duas condições de desidratação sobre estes mesmos parâmetros. Para esta pesquisa foram adquiridas 69 amostras produzidas e beneficiadas em nove Estados brasileiros. Foram levantados dados referentes à coleta e processamento dos produtos e realizada a análise polínica para determinar a origem botânica das amostras. Foram determinados os teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, minerais, fenólicos totais e flavonoides totais por espectrofotometria, compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, capacidade antioxidante [método DPPH (a partir de três extratos) e método *ORAC*], capacidade antimicrobiana e parâmetros instrumentais de cor, além de um diagnóstico da qualidade microbiológica das amostras. A análise multivariada foi utilizada para estudar a estrutura de dados e procurar por padrões e, ainda, classificar as amostras em grupos. Foram observadas não conformidades em relação à temperatura de desidratação e em 91% das amostras o teor de umidade estava acima do limite de 4% estabelecido na legislação brasileira. Foram identificados 39 tipos polínicos. O teor de proteínas variou de 7,9 a 33,9 g/100 g, lipídeos de 3,1 a 13,5 g/100 g e cinzas de 1,9 a 3,8 g/100 g. A análise de minerais indicou que o potássio foi o composto em maior quantidade e que algumas amostras poderiam ser consideradas fontes ou com alto conteúdo de ferro, manganês, zinco e cobre. O teor de fenólicos totais variou de 5,6 a 29,7 mg EAG/g e flavonoides totais de 0,3 a 19,0 mg EQ/g. A capacidade antioxidante (CA), pelo método DPPH, variou de 9,4 a 199,3  $\mu\text{mol ET/g}$ , com influência do procedimento de extração sobre o resultado. Pelo método *ORAC*, a CA das amostras variou de 133,1 a 563,0  $\mu\text{mol ET/g}$ . Quanto à capacidade antimicrobiana, observou-se que todas as amostras apresentaram alguma ação,

estando a concentração mínima inibitória relacionada com o micro-organismo em teste. A qualidade microbiológica das amostras estava de acordo com dados encontrados na literatura e bactérias potencialmente patogênicas não foram observadas. A análise instrumental de cor indicou variação nos parâmetros L\* (42,75 a 72,35), a\* (1,03 a 12,98), b\* (31,51 a 63,18) e Chroma (31,53 a 64,26) e correlação entre estes parâmetros e a composição química e as propriedades biológicas. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos indicou predominância de flavonoides nas amostras, principalmente de compostos glicosilados. Por fim, as amostras desidratadas por liofilização apresentaram maior valor nutricional e potencial biológico em relação às amostras desidratadas em estufa com aquecimento e circulação forçada de ar. Em conclusão, torna-se necessário que os produtores façam ajustes no processo de beneficiamento do pólen apícola para que não haja empecilhos à sua comercialização. A composição do pólen das flores forrageadas pelas abelhas influenciou na composição do pólen apícola desidratado, portanto, pode-se pensar no direcionamento dos apiários para fontes botânicas que resultem em um produto com maior valor nutricional ou biológico.

**Palavras-chave:** pólen apícola; valor nutricional; compostos bioativos; qualidade microbiológica; condições de processamento.

## ABSTRACT

DE-MELO, A. A. M. **Chemical and microbiological profile, color, palynological analysis and biological properties of dehydrated bee-pollen.** 2015. 341f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The aim of this study was to obtain information about the production process, to determine physicochemical characteristics, microbiological quality, biological properties and botanical origin of dehydrated bee-pollen, and also to evaluate the influence of two dehydration conditions on these parameters. Sixty-nine samples were acquired from nine Brazilian states. Data were collected regarding the collection and processing of the products and the pollen analysis was performed to determine the botanical origin of the samples. Moisture, proteins, lipids, ashes, minerals, total phenolic compounds and flavonoids by spectrophotometry, phenolic compounds by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, antioxidant capacity [DPPH method (from three extracts) and ORAC method], antimicrobial capacity and instrumental color parameters were determined, in addition to a diagnosis of the microbiological quality of the samples. Multivariate analysis was used to study the structure of data and to look for patterns and also to classify the samples into groups. Non-conformities were observed in relation to dehydration temperature and in 91% of samples the moisture content was above the 4% limit established by Brazilian legislation. Thirty-nine pollen types were identified. The protein content varied from 7.9 to 33.9 g/100 g, the lipid content from 3.1 to 13.5 g/100 g and the ash content varied from 1.9 to 3.8 g/100 g. The mineral analysis indicated that potassium was the compound with a higher content in the samples, and that some samples could be considered “source” or “high content” of iron, manganese, zinc and copper. The total phenolic content varied from 5.6 to 29.7 mg GAE/ g and total flavonoids from 0.3 to 19.0 mg QE/g. The antioxidant capacity (AC) by DPPH method ranged from 9.4 to 199.3  $\mu\text{mol TE/g}$  and the extraction procedure influenced the results. The AC by ORAC method ranged from 133.1 to 563.0  $\mu\text{mol TE/g}$ . All samples showed some antimicrobial capacity; however, the minimal inhibitory concentration was related to the microorganism. The microbiological quality of the samples was consistent with results found in the literature and potentially

pathogenic bacteria were not detected. The instrumental color analysis indicated variation in the parameters L\* (42.75 to 72.35), a\* (1.03 to 12.98), b\* (31.51 to 63.18) and Chroma (31.53 to 64.26), and correlation between these parameters and the chemical and biological properties. The identification and quantification of the phenolic compounds showed flavonoids predominantly in samples, particularly glycosylated compounds. Finally, the samples dehydrated by lyophilization showed higher nutritional and biological value compared to samples dehydrated in an electric oven with forced air circulation. In conclusion, it is necessary that producers make adjustments to the dehydrated bee-pollen processing to prevent impediments to the marketing. The composition of the pollen collected by bees influenced the composition of dehydrated bee-pollen; therefore, it would be possible to direct the apiaries to botanical sources that result in a product with higher nutritional or biological value.

**Keywords:** bee-pollen; nutritional value; bioactive compounds; microbiological quality; processing conditions.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Colmeia Langstroth vista de frente (1) e partes da estrutura: tampa (A), melgueira (B), ninho (C) e fundo (D) (2) .....31
- Figura 2.** Esquema simplificado de um grão de pólen .....33
- Figura 3.** Sistema reprodutivo de uma planta monóica (as flores possuem tanto o órgão reprodutor feminino quanto masculino) .....34
- Figura 4.** Abelha *Apis mellifera* realizando a coleta de pólen na flor (A); duas bolotas aderidas às corbículas de uma abelha (B); armazenamento das bolotas no alvéolo, dentro da colmeia (C) .....35
- Figura 5.** Coletor de pólen apícola instalado na colmeia (A); abelhas atravessando o coletor de pólen (B); as bolotas no recipiente coletor (C); apicultor recolhendo o produto ao final de um período (D) .....36
- Figura 6.** Exemplos de tipos polínicos encontrados em amostras de pólen apícola desidratado produzidas em diferentes Estados brasileiros .....43
- Figura 7.** Amostra com aparente homogeneidade de cor classificada como heterofloral (A); amostras com cargas de diversas cores, porém classificadas como monoflorais (B, C) .....50
- Figura 8.** Estruturas do ácido *p*-hidroxibenzoico (A), ácido *o*-hidroxibenzoico (B), ácido vanílico (C) e ácido sirínico (D) .....54
- Figura 9.** Estruturas do ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico .....55
- Figura 10.** Estrutura de algumas classes de flavonoides .....56

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Balança de precisão adaptada com secador infravermelho (A); Amostra de pólen apícola desidratado (previamente triturada) no interior da balança após análise (B); percentual de umidade no mostrador (C) .....115
- Figura 2.** Exemplos de coletores de pólen apícola do tipo frontal, utilizados no Rio Grande do Sul .....119

### CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Teor médio de carboidratos, proteínas, lipídeos e cinzas em amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Estados .....157
- Figura 2.** Teor médio de fenólicos totais e flavonoides totais em amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Estados .....163
- Figura 3.** Perfil cromatográfico de uma das replicatas da amostra de pólen apícola desidratado de código N1 .....165
- Figura 4.** Valor máximo e mínimo da capacidade antioxidante pelo método DPPH em amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Estados .....172

<b>Figura 5.</b> Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a Região brasileira de origem .....	183
<b>Figura 6.</b> Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a origem botânica .....	184
<b>Figura 7.</b> Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a origem botânica .....	185
<b>Figura 8.</b> Classificação das amostras de pólen apícola desidratado utilizando a análise de agrupamento hierárquico com base no teor de proteínas, ferro, quercetina, fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método <i>ORAC</i> e inibição de <i>S. aureus</i> ESA54 .....	186

## **CAPÍTULO 5**

<b>Figura 1.</b> Análise de agrupamento hierárquico baseada nos parâmetros de cor e capacidade antioxidante de todos os extratos analisados .....	239
<b>Figura 2.</b> Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a Região de origem .....	241
<b>Figura 3.</b> Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a origem botânica .....	242
<b>Figura 4.</b> Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com os tipos polínicos .....	243

## **CAPÍTULO 6**

<b>Figura 1.</b> Sistema de galerias API 20C AUX para identificação de leveduras .....	256
<b>Figura 2.</b> Ocorrência das leveduras isoladas e identificadas em 45 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros .....	262

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Países que dispõem de regulamentação para controle de qualidade de produtos apícolas .....40
- Tabela 2.** Teores de pró-vitamina A, vitaminas do complexo B, vitamina C e vitamina E descritos em estudos com amostras de pólen apícola .....48
- Tabela 3.** Classes de compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico .....54

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Código, origem e data de coleta das 69 amostras de pólen apícola desidratado adquiridas em nove Estados brasileiros .....88
- Tabela 2.** Família de vegetal a qual pertencem as espécies e os gêneros identificados em 69 amostras de pólen apícola desidratado adquiridas em nove Estados brasileiros .....91
- Tabela 3.** Percentagem dos tipos polínicos e origem botânica predominante em 69 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros 92
- Tabela 4.** Ocorrência dos táxons vegetais em 69 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros .....98

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Informações levantadas a respeito da produção, beneficiamento e teor de umidade de 69 amostras pólen apícola desidratado .....116
- Tabela 2.** Percepção dos produtores quanto a vegetação visitada pelas abelhas e táxons identificados pela análise polínica de 46 amostras de pólen apícola desidratado .....123

### CAPÍTULO 4

- Tabela 1.** Código, origem e data de coleta das 64 amostras de pólen apícola desidratado adquiridas para este estudo .....136
- Tabela 2.** Parâmetros analíticos das curvas de calibração utilizados para a quantificação dos extratos de pólen por *HPLC-DAD* .....142
- Tabela 3.** Composição centesimal de 56 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros e parâmetros estabelecidos pelas Legislações Brasileira, Argentina e Russa .....154
- Tabela 4.** Conteúdo de proteínas, lipídeos e cinzas (g/100 g) nas 56 amostras de pólen apícola desidratado e comparação com dados de literatura .....156
- Tabela 5.** Conteúdo de potássio, cálcio, magnésio, sódio, zinco, ferro, manganês e cobre em 56 amostras de pólen apícola desidratado .....158

<b>Tabela 6.</b> Percentual das 56 amostras de pólen apícola desidratado consideradas “fonte” ou “alto conteúdo”, para adultos, de magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e cobre (Cu), em uma porção de 25 g .....	160
<b>Tabela 7.</b> Teor de fenólicos totais e flavonoides totais de 56 amostras de pólen apícola desidratado produzidas em nove Estados brasileiros .....	161
<b>Tabela 8.</b> Teor de fenólicos totais (mg EAG/g) e de flavonoides totais (mg EQ/g) em amostras de pólen apícola desidratado produzidas em diferentes Estados brasileiros e comparação com a literatura .....	163
<b>Tabela 9.</b> Flavonóides identificados e quantificados (mg/100 g de amostra) por <i>HPLC-DAD</i> , com base nos padrões .....	165
<b>Tabela 10.</b> Compostos fenólicos derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico identificados e quantificados (mg/100 g) por <i>HPLC-DAD</i> , com base nos padrões.	167
<b>Tabela 11.</b> Capacidade antioxidante pelo método DPPH e pelo método <i>ORAC</i> de 56 amostras de pólen apícola desidratado .....	170
<b>Tabela 12.</b> Concentração mínima inibitória (mg/mL) de amostra capaz de inibir o crescimento visível de <i>Streptococcus pyogenes</i> (Sp), <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa), <i>Escherichia coli</i> (Ec), <i>Klebsiella</i> (K) e <i>Candida albicans</i> (Ca) .....	175
<b>Tabela 13.</b> Concentração mínima inibitória (CIM) das 56 amostras de pólen apícola desidratado em estudo e os resultados publicados por Arruda (2013) <sup>1</sup> .....	177
<b>Tabela 14.</b> Valores de correlação entre os parâmetros instrumentais de cor e a composição centesimal e de minerais de 56 amostras de pólen apícola desidratado .....	179
<b>Tabela 15.</b> Valores de correlação os parâmetros instrumentais de cor e o teor de fenólicos totais, DPPH, <i>ORAC</i> , ácido protocatéquico, ácido clorogênico e rutina de 56 amostras de pólen apícola desidratado .....	180
<b>Tabela 16.</b> Fatores de carregamento obtidos pela análise de componentes principais .....	182
<b>Tabela 17.</b> Comparação entre os grupos classificados de acordo com o teor de proteínas, ferro, quercetina, fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método <i>ORAC</i> e inibição de <i>S. aureus</i> ESA54 .....	186
<b>Tabela 18.</b> Percentagem dos tipos polínicos identificados em oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado .....	189
<b>Tabela 19.</b> Parâmetros instrumentais de cor ( <i>L*</i> , <i>a*</i> , <i>b*</i> e Chroma) de oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado .....	189
<b>Tabela 20.</b> Indicadores de bioatividade de oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado .....	190
<b>Tabela 21.</b> Composição química de oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado .....	191
<b>Tabela 22.</b> Tempo de retenção ( <i>t<sub>R</sub></i> ) e principais fragmentos dos padrões de ácidos fenólicos e flavonóides analisados .....	193
<b>Tabela 23.</b> Tempo de retenção ( <i>t<sub>R</sub></i> ), comprimento de onda de máxima absorção e principais fragmentos dos polifenóis detectados no extrato etanólico do pólen apícola desidratado, propostas de identificação e referências utilizadas .....	194

## CAPÍTULO 5

**Tabela 1.** Capacidade antioxidante de amostras monoflorais e heteroflorais de pólen apícola desidratado após extração com diferentes solventes .....231

**Tabela 2.** Comparação entre capacidade antioxidante e parâmetros instrumentais de cor entre amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Regiões brasileiras onde foram produzidas .....236

**Tabela 3.** Parâmetros instrumentais de cor de amostras monoflorais e heteroflorais de pólen apícola desidratado .....237

**Tabela 4.** Valores de correlação entre a capacidade antioxidante de extratos etanólicos, metanólicos e extração sequencial e parâmetros instrumentais de cor de pólen apícola desidratado .....239

**Tabela 5.** Principais tipos polínicos e classificação em monofloral ou heterofloral de 64 amostras de pólen apícola desidratado, coletadas em quatro Regiões Brasileiras .....244

**Tabela 6.** Modelo de discriminação para amostras de pólen apícola desidratado coletadas em diferentes Regiões e com diferente origem botânica usando *PSL-DA* .....245

## CAPÍTULO 6

**Tabela 1.** Percentagem de amostras de pólen apícola desidratado em cada faixa de determinação .....258

**Tabela 2.** Faixa de contagem de micro-organismos em amostras de pólen apícola desidratado de acordo com o Estado onde foram produzidas .....259

## CAPÍTULO 7

**Tabela 1.** Parâmetros instrumentais de cor e valor nutricional de pólen apícola desidratado em liofilizador ou estufa com aquecimento e circulação forçada de ar .....280

**Tabela 2.** Teor de fenólicos totais e potencial biológico de pólen apícola desidratado em liofilizador ou estufa com aquecimento e circulação forçada de ar .....283

**Tabela 3.** Coeficientes de correlação de Speaman (P-valor) entre parâmetros instrumentais de cor, fenólicos totais e potencial farmacológico das amostras de pólen apícola desidratado .....285

**Tabela 4.** População de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e bolores e leveduras em pólen apícola desidratado em liofilizador ou estufa com aquecimento e circulação forçada de ar .....286

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	26
<b>CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES SOBRE APICULTURA E PÓLEN APÍCOLA: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	27
<b>RESUMO</b> .....	28
<b>ABSTRACT</b> .....	28
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>2 APICULTURA NO BRASIL</b> .....	30
<b>3 PÓLEN APÍCOLA</b> .....	32
3.1 COLETA .....	35
3.2 BENEFICIAMENTO .....	36
3.3 MERCADO .....	38
3.4 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL E NACIONAL .....	39
3.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE POLÍNICA DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO .....	42
<b>3.5.1 Análise polínica</b> .....	42
<b>3.5.2 Características químicas</b> .....	45
<b>3.5.3 Características físicas</b> .....	49
<b>3.5.4 Características microbiológicas</b> .....	50
<b>3.5.5 Propriedades biológicas</b> .....	51
3.5.5.1 Compostos fenólicos .....	52
3.5.5.2 Capacidade antioxidante .....	57
3.5.5.3 Capacidade antimicrobiana .....	61
3.5.5.4 Capacidade anti-inflamatória .....	63
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO PALINOLÓGICA DE PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO PRODUZIDO EM NOVE ESTADOS BRASILEIROS</b> .....	84
<b>RESUMO</b> .....	85
<b>ABSTRACT</b> .....	85
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	86
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	87

2.1	AMOSTRAS .....	87
2.2	ANÁLISE POLÍNICA .....	89
2.2.1	Preparo das amostras .....	89
2.2.2	Preparo das lâminas para microscopia .....	90
2.2.3	Identificação e contagem dos tipos polínicos e classificação das amostras .....	90
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
4	CONCLUSÃO .....	103
5	REFERÊNCIAS .....	104
 <b>CAPÍTULO 3 - TEOR DE UMIDADE, PRODUÇÃO E PROCESSAMENTO DE PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO .....</b>		110
<b>RESUMO .....</b>		111
<b>ABSTRACT .....</b>		111
1	INTRODUÇÃO .....	112
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	113
2.1	AMOSTRAS .....	113
2.2	OBTENÇÃO DOS DADOS .....	114
2.3	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE .....	114
2.4	ANÁLISE POLÍNICA .....	115
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	115
4	CONCLUSÃO .....	126
5	REFERÊNCIAS .....	127
 <b>CAPÍTULO 4 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO PÓLEN APÍCOLA MONOFLORAL E HETEROFLORAL PRODUZIDO NO BRASIL .....</b>		131
<b>RESUMO .....</b>		132
<b>ABSTRACT .....</b>		133
1	INTRODUÇÃO .....	133
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	135
2.1	AMOSTRAS .....	135
2.2	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	138
2.3	PREPARO DOS EXTRATOS .....	138
2.4	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS .....	139
2.5	TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS .....	139
2.6	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	140
2.6.1	Cromatografia líquida de alta eficiência .....	140
2.6.2	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas .....	142

2.7	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	143
2.7.1	<b>Método DPPH</b> .....	143
2.7.2	<b>Método ORAC</b> .....	144
2.8	CAPACIDADE ANTIMICROBIANA .....	145
2.8.1	<b>Micro-organismos</b> .....	145
2.8.2	<b>Determinação da capacidade antimicrobiana</b> .....	146
2.9	EXTRATO ETÉREO – TEOR DE LIPÍDEOS .....	147
2.10	NITROGÊNIO TOTAL – TEOR DE PROTEÍNAS .....	148
2.11	RESÍDUO MINERAL FIXO – TEOR DE CINZAS .....	149
2.12	TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS .....	150
2.13	VALOR ENERGÉTICO .....	150
2.14	DETERMINAÇÃO DE MINERAIS .....	150
2.15	PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR .....	151
2.16	ANÁLISE POLÍNICA .....	151
2.17	TRATAMENTO DOS DADOS .....	151
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>152</b>
3.1	PARTE 1 .....	152
3.1.1	<b>Composição centesimal e conteúdo de minerais</b> .....	<b>153</b>
3.1.2	<b>Indicadores de potencial biológico</b> .....	<b>161</b>
3.1.2.1	Capacidade antioxidante do extrato etanólico de PAD .....	170
3.1.2.2	Capacidade antimicrobiana do extrato metanólico de PAD .....	174
3.1.3	<b>Parâmetros instrumentais de cor</b> .....	<b>178</b>
3.1.4	<b>Análise multivariada</b> .....	<b>180</b>
3.2	PARTE 2 .....	188
3.2.1	<b>Identificação dos compostos por espectrometria de massas</b> .....	<b>193</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>208</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>209</b>
<b>CAPÍTULO 5 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES EXTRATOS E PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO E COMPARAÇÕES POR ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA</b> .....		<b>222</b>
<b>RESUMO</b> .....		<b>223</b>
<b>ABSTRACT</b> .....		<b>223</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>224</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>226</b>
2.1	AMOSTRAS .....	226
2.2	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	226

2.3	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	227
<b>2.3.1</b>	<b>Métodos de extração</b> .....	227
2.3.1.1	Etanol a 70% .....	227
2.3.1.2	Metanol a 50% e acetona a 70% .....	227
2.3.1.3	Éter etílico, etanol e água .....	227
<b>2.3.2</b>	<b>Capacidade de redução do radical DPPH – Capacidade antioxidante</b> .....	228
2.4	PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR .....	228
2.5	ANÁLISE POLÍNICA .....	229
2.6	TRATAMENTO DOS DADOS .....	229
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	230
3.1	ANÁLISE MULTIVARIADA .....	240
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	246
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	246
<b>CAPÍTULO 6 - DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO PRODUZIDO NO BRASIL</b> .....		251
<b>RESUMO</b> .....		252
<b>ABSTRACT</b> .....		252
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	253
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	254
2.1	AMOSTRAS .....	254
2.2	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	254
2.3	AERÓBIOS MESÓFILOS .....	255
2.4	PSICOTRÓFICOS .....	255
2.5	BOLORES E LEVEDURAS .....	255
<b>2.5.1</b>	<b>Isolamento e identificação de leveduras</b> .....	256
2.6	COLIFORMES TOTAIS E <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	256
2.7	<i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE POSITIVA .....	257
2.8	ESPOROS DE CLOSTRÍDEOS SULFITO-REDUTORES .....	257
2.9	PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> .....	258
2.10	TRATAMENTO DOS DADOS .....	258
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	258
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	264
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	264
<b>CAPÍTULO 7 - EFEITO DAS CONDIÇÕES DE DESIDRATAÇÃO SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO PÓLEN APÍCOLA</b> .....		269
<b>RESUMO</b> .....		270
<b>ABSTRACT</b> .....		270

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	271
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	272
2.1	AMOSTRAS	272
2.2	NITROGÊNIO TOTAL - TEOR DE PROTEÍNAS	273
2.3	EXTRATO ETÉREO – TEOR DE LIPÍDEOS	273
2.4	DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE	273
2.5	DETERMINAÇÃO DE MINERAIS	274
2.6	DETERMINAÇÃO DE VITAMINA E	274
2.7	DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS DO COMPLEXO B	275
2.8	EXTRATOS ETANÓLICOS (ETE)	275
2.9	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	275
2.10	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	276
	<b>2.10.1 Método DPPH</b>	276
	<b>2.10.2 Método ORAC</b>	276
2.11	DCAPACIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	277
2.12	CAPACIDADE ANTIMICROBIANA	277
2.13	QUALIDADE MICROBIOLÓGICA	278
2.14	PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR	278
2.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	278
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	279
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	287
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	287
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	293
<b>ANEXO I</b>	Informações para os Membros da Banca Julgadora de Doutorado	295
<b>ANEXO II</b>	Currículo Lattes	296
<b>ANEXO III</b>	Ficha do aluno	316
<b>ANEXO IV</b>	Dados do equipamento Ciro Vision EOP	319
<b>ANEXO V</b>	Parâmetros das curvas de calibração para análise de minerais	320
<b>ANEXO VI</b>	Artigo publicado no periódico <i>Letters in Applied Microbiology</i>	321
<b>ANEXO VII</b>	Artigo publicado no periodico <i>LWT - Food Science and Technology</i>	328
<b>APÊNDICE I</b>	Parâmetros instrumentais de cor de 56 amostras de pólen apícola desidratado	337
<b>APÊNDICE II</b>	Comparação entre diferentes Regiões de origem do pólen apícola desidratado	339
<b>APÊNDICE III</b>	Comparação entre pólen apícola desidratado monofloral e heterofloral	340
<b>APÊNDICE IV</b>	Comparação entre pólen apícola desidratado monofloral e heterofloral	341

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A apicultura caracteriza-se pela criação econômica e racional de abelhas da espécie *Apis mellifera*, sendo uma das poucas atividades agropecuárias que atendem ao tripé da sustentabilidade (ALMEIDA; CARVALHO, 2009). Entre os produtos da apicultura está o pólen apícola, um alimento elaborado pelas abelhas a partir do pólen das flores e que contém aminoácidos essenciais, quantidades variáveis de proteínas, vitaminas, minerais, ácidos graxos, fibras e compostos bioativos. A composição do pólen apícola tem despertado o interesse da população para o consumo como suplemento alimentar e em razão de possíveis benefícios a saúde (CAMPOS *et al.* 2008).

A qualidade do pólen apícola está relacionada às suas características físico-químicas, microbiológicas e biológicas que, por sua vez, variam de acordo com a origem botânica, condições climáticas e de solo da região onde é produzido, e das práticas empregadas durante a coleta e beneficiamento do produto (CAMPOS *et al.*, 2008; BARTH *et al.*, 2010; SILVEIRA, 2012). Legislações nacionais e internacionais estabelecem padrões de identidade e qualidade do pólen apícola, porém, não determinam os métodos de análises. Além disso, não há parâmetros para compostos bioativos, principais responsáveis pelo interesse da população por este produto (CAMPOS *et al.*, 2008; ALMEIDA-MURADIAN, 2009).

O Brasil tem um grande potencial produtivo para dominar uma parcela significativa do mercado mundial de pólen apícola. A extensão territorial, vegetação diversificada e variabilidade climática são favoráveis à atividade apícola no país, possibilitando a exploração de produtos durante todo o ano e com as mais variadas composições (MARCHINI; SOUZA, 2006; SILVA, 2007; BARTH *et al.*, 2010).

Embora estudos tenham sido conduzidos, por se tratar de um alimento de composição tão variável, há amostras cujo perfil e potencial biológico são desconhecidos. Ao mesmo tempo, certas questões estão pendentes, como a relação entre compostos fenólicos e ação antioxidante e antimicrobiana neste alimento. Até o momento, não há informações que indiquem as regiões brasileiras de maior potencial para produção de pólen apícola de elevado valor nutricional e biológico. Também é preciso assegurar a qualidade do produto para o consumo, certificando que não há perigos biológicos para o consumidor. Por fim, é importante para o setor apícola que dados sejam gerados no sentido de despertar o interesse de um número

maior de consumidores, tanto no mercado interno quanto externo. Conhecendo o produto e as particularidades de cada região seria possível aos produtores pleitear certificações como a Indicação Geográfica, o que agregaria valor ao pólen apícola, aumentando a renda nas propriedades rurais (SEBRAE, 2009; INPI, 2011).

Diante da variedade de compostos presentes no pólen apícola e do fato da concentração destes compostos estar relacionada à origem botânica e geográfica dos grãos, torna-se importante caracterizar o maior número de amostras possível, identificando as variantes nutricionais e biológicas e correlacionando-as com a região onde foram coletadas.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA-MURADIAN, L.B. **Qualidade dos produtos apícolas e otimização quimiométrica dos métodos de análise do mel por espectroscopia no infravermelho (FT-IR ATR)**. São Paulo, 2009, 120p. Tese de Livre Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, M.A.D.; CARVALHO, C.M.S. **Apicultura: uma oportunidade de negócio sustentável**. Salvador: SEBRAE-BA, 2009, 52p.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

INPI. INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Indicação geográfica**, 2011. Disponível em: <[www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)>. Acesso em: 20 mai. 2011.

MARCHINI, L.C.; SOUZA, B.A. Composição físico-química, qualidade e diversidade dos méis brasileiros de abelhas africanizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 16, Aracajú, 2006. **Anais eletrônicos**. Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura, 2006. 1 CR-ROM.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequena Empresa. **Indicação geográfica como diferencial competitivo**, 2009. Disponível em: <[www.tecpar.br/appi](http://www.tecpar.br/appi)>. Acesso em: 20 mai. 2011.

SILVA, M.B.L. **Diagnóstico do sistema de produção e qualidade do mel de Apis Mellifera**. Viçosa, 2007. 97p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa.

SILVEIRA, T.A. **Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental**. Piracicaba, 2012. 67p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil químico e microbiológico, parâmetros instrumentais de cor, propriedades biológicas e origem botânica do pólen apícola desidratado, produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* no Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantar informações a respeito do processo de produção e verificar se houve adequação, com base na Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 do MAPA, das práticas adotadas durante o beneficiamento das amostras;
- Realizar a análise polínica e determinar a origem botânica;
- Determinar a composição centesimal e o valor energético;
- Determinar o conteúdo dos minerais: sódio, potássio, ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco e manganês;
- Determinar o teor de fenólicos totais e flavonóides totais por espectrofotometria;
- Identificar e quantificar compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas;
- Avaliar três metodologias para extração de compostos antioxidantes;
- Determinar e comparar a capacidade antioxidante por dois métodos;
- Determinar a capacidade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas e leveduras;
- Determinar parâmetros instrumentais de cor;
- Realizar a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, aeróbios mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras, determinar o número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli* e realizar a pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito redutores e de *Salmonella* sp.;
- Identificar espécies de leveduras;
- Avaliar a influência de duas condições de desidratação sobre os parâmetros instrumentais de cor, teor de proteínas, lipídeos, minerais, glicose, frutose,

vitaminas do complexo B e vitamina E, teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante, capacidade antimicrobiana, capacidade anti-inflamatória e qualidade microbiológica;

- Verificar a adequação dos resultados quanto aos parâmetros estabelecidos na Legislação Brasileira;
- Disponibilizar os resultados para serem inseridos na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (TBCA-FCF-USP);
- Apresentar resultados em eventos científicos e publicar em periódicos indexados da área.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo propôs uma análise ampla de um número significativo de amostras. Além da caracterização físico-química, de propriedades biológicas e qualidade microbiológica, também foram realizados estudos de comparação de métodos de extração de compostos antioxidantes e de condições de processamento. Assim, optou-se pela apresentação da tese em capítulos para uma melhor discussão dos resultados e publicação em revistas indexadas. Os capítulos foram assim organizados:

**Capítulo 1:** Considerações sobre apicultura e pólen apícola: revisão de literatura.

**Capítulo 2:** Avaliação palinológica de pólen apícola desidratado produzido em nove estados brasileiros.

**Capítulo 3:** Teor de umidade, produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado.

**Capítulo 4:** Características físico-químicas e propriedades biológicas de pólen apícola desidratado monofloral e heterofloral, produzido no Brasil.

**Capítulo 5:** Capacidade antioxidante de diferentes extratos e parâmetros instrumentais de cor do pólen apícola desidratado e comparações por análise estatística multivariada.

**Capítulo 6:** Diagnóstico da qualidade microbiológica do pólen apícola desidratado produzido no Brasil (resultados submetidos, artigo publicado no periódico *Letters in Applied Microbiology* - DOI: 10.1111/lam.12480).

**Capítulo 7:** Efeito das condições de desidratação sobre características físico-químicas, propriedades biológicas e qualidade microbiológica do pólen apícola (resultados submetidos, artigo publicado no periódico *LWT - Food Science and Technology* - DOI: 10.1016/j.lwt.2015.09.014).

# CAPÍTULO 1

## CONSIDERAÇÕES SOBRE APICULTURA E PÓLEN APÍCOLA: REVISÃO DE LITERATURA

### RESUMO

A apicultura é uma das poucas atividades agropecuárias que se enquadram no tripé da sustentabilidade. Mel, própolis e pólen apícola são alguns dos produtos da apicultura. O pólen apícola é produzido pelas abelhas, a partir do pólen das flores, para ser a principal fonte de proteínas na colmeia. Sua composição varia de acordo com a região onde é produzido e sua qualidade influenciada pelas condições de coleta e processamento. É considerado por muitos pesquisadores como um alimento de elevado valor nutricional e biológico.

**Palavras-chave:** apicultura, pólen apícola; propriedades biológicas; características físico-químicas; qualidade microbiológica.

### ABSTRACT

Beekeeping is one of the few agricultural activities serving the triple-bottom-line of sustainability. Honey, propolis and bee-pollen are some of the beekeeping products. The bee pollen is produced by bees from the flower pollen to be the main source of protein in the hive. Its composition varies according to the region where it is produced and its quality is influenced by the collection and processing conditions. It is considered by many researchers as a nutritional and biological high value food.

**Keywords:** beekeeping; bee-pollen; biological properties, physicochemical characteristics, microbiological quality.

## 1 INTRODUÇÃO

O setor agropecuário tem contribuído para o crescimento econômico global nos últimos anos, não tanto como gerador de riqueza, mas como fornecedor de matéria-prima para a indústria de transformação. Em 2014, o setor foi responsável

por 5,6% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (IBGE, 2015) e, em 2013, o país ocupou o primeiro lugar no mundo em produção de café, cana-de-açúcar e laranja, segundo lugar na produção de soja e terceiro lugar na produção de carne de aves (FAOSTAT, 2015a).

Apesar das atividades agropecuárias impactarem positivamente na economia do país e no desenvolvimento regional, há impactos negativos decorrentes que comprometem a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas a médio e longo prazo, como o desmatamento, perda da biodiversidade, contaminação de aquíferos e reservatórios de água por defensivos agrícolas e a degradação dos solos, este último considerado um dos mais importantes problemas ambientais causados pelas atividades agropecuárias (IBGE, 2010; ADMIN, 2011).

O desafio é manter o crescimento do setor primário, mas de forma sustentável. Para tal, estratégias de planejamento rural consciente, assim como o estímulo a atividades lucrativas e ambientalmente responsáveis, devem ser propostos. Neste contexto, a apicultura ganha destaque por ser uma das poucas atividades agropecuárias que atende ao *triple bottom line*, ou tripé da sustentabilidade, por ser economicamente viável, ambientalmente favorável e socialmente justa (ALMEIDA; CARVALHO, 2009).

O mel é o produto apícola mais conhecido e com boas possibilidades de comercialização (ARRUDA; BOTELHO; CARVALHO, 2011), porém, é grande o interesse dos apicultores por outros produtos da colmeia, como o pólen apícola, cuja coleta tem aumentado a rentabilidade das unidades de produção. Produtores de Canavieiras/Bahia conseguiram elevar a renda de R\$ 400,00 por colmeia/ano para R\$ 1,8 mil por colmeia/ano ao deixarem de coletar mel e iniciarem a coleta de pólen apícola (SEAGRI, 2010).

O pólen apícola é composto por, aproximadamente, 250 substâncias (KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015). O teor de proteínas varia entre amostras, mas pode chegar a 45% (MODRO *et al.*, 2009), o que faz deste produto uma alternativa para complementar a dieta, inclusive de vegetarianos. Vitaminas e minerais também estão presentes. Além disso, há relatos de bons resultados no tratamento, e auxílio na prevenção, de algumas doenças. O pólen apícola enquadra-se no grupo dos apiterapêuticos, ou seja, é um produto da apicultura que contém compostos de comprovada atividade terapêutica (ABDELLA; TOHAMY; AHMAD, 2009; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015).

O objetivo desta revisão foi levantar informações a respeito do que é e como teve início a apicultura no Brasil, como é regulamentada e como é feita a produção, beneficiamento e comercialização do pólen apícola, bem como o que se sabe quanto às características físico-químicas e microbiológicas deste produto, com foco em compostos que podem estar relacionados às suas propriedades biológicas.

## 2 APICULTURA NO BRASIL

A apicultura caracteriza-se pela criação econômica e racional de abelhas da espécie *Apis mellifera*. No Brasil, a atividade desenvolveu-se a partir de 1839 com a introdução da espécie por imigrantes europeus. As primeiras subespécies criadas no país foram *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera caucasica* e *A. mellifera ligustica*. As abelhas europeias, embora dóceis e de fácil manejo, apresentavam baixa produtividade e menor resistência a doenças e pragas quando comparadas a outras subespécies, como a *A. mellifera scutellata*, uma abelha africana bastante produtiva, rústica e de comportamento agressivo.

Em 1956, abelhas africanas foram trazidas para cruzamento com as abelhas europeias. Algumas destas abelhas africanas escaparam do apiário experimental e rapidamente disseminaram-se pelo país, o que promoveu o processo chamado de “africanização”, caracterizado pelo cruzamento entre as subespécies e que resultou em abelhas com maior produtividade e resistência, porém mais agressivas. Em razão desse episódio, é possível dizer que no Brasil já não há linhagens puras das subespécies europeias de *A. mellifera*, predominando híbridos africanizados (BARRETO *et al.*, 2006; PEREIRA; LOPES, 2011).

Para o desenvolvimento da apicultura é essencial oferta de água e alimento em quantidade suficiente para a sobrevivência das abelhas e suas crias (PEREIRA *et al.*, 2003). Estes insetos utilizam mel, melato, pólen apícola e geleia real para a manutenção da colônia. O mel, produzido a partir do néctar das flores; e o melato, produzido a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas; são as fontes principais de energia das abelhas. O pólen apícola é produzido a partir do pólen das flores e é a principal fonte de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais (MORETI, 2006; ARRUDA, 2009). A geleia real é produzida para a alimentação dos ovos, das larvas (até o terceiro dia de vida,

após este período recebem mel e pólen apícola), e da rainha (por toda vida) (ALVES, 2013a; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015).

O Brasil tem grande potencial para a apicultura, pois a extensão territorial, vegetação diversificada e variabilidade climática são favoráveis à atividade no país, possibilitando a exploração durante todo o ano em diversas regiões. As áreas de preservação permanente e/ou de reserva legal são ideais para a apicultura em razão da diversidade e quantidade de flores, resultando em maior produtividade (FRANZESE, 2005; MARCHINI; SOUZA, 2006; SILVA, 2007; ARRUDA, 2009).

As abelhas são criadas em apiários e cada apiário é um conjunto de colmeias. Cada colmeia abriga uma colônia (família, enxame) e cada colônia é formada por uma rainha, cinco mil a 100 mil operárias, até 400 zangões e pelos favos utilizados para postura e armazenamento do alimento (SEBRAE, 2009b). As colmeias possuem compartimentos específicos para a postura e desenvolvimento das crias e para o armazenamento de mel ou pólen apícola. Recomenda-se o uso de colmeias do tipo Langstroth (Figura 1), cuja estrutura em madeira é padronizada e adotada em todo mundo, facilitando a comercialização de colmeias, suportes e favos (PEREIRA *et al.*, 2003). A norma NBR 15713:2009, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), trata exclusivamente deste modelo de colmeia, especificando requisitos para sua fabricação (ABNT, 2009).



**Figura 1.** Colmeia Langstroth vista de frente (1) e partes da estrutura: tampa (A), melgueira (B), ninho (C) e fundo (D) (2).

Fonte: Pereira *et al.*, 2003

De acordo com o último Censo Agropecuário, 104.937 estabelecimentos rurais desenvolvem alguma atividade apícola (IBGE, 2007). Segundo a Confederação Brasileira de Apicultura (CBA), entidade sem fins lucrativos criada

para representar e orientar as federações de cada Estado, a cadeia produtiva no país gera cerca de 450 mil ocupações no campo e 16 mil empregos diretos no setor industrial (CBA, 2013). Apicultores com até 150 colmeias são considerados pequenos produtores, de 150 a 1500 colmeias são considerados médios, enquanto grandes produtores são aqueles que manejam acima de 1500 colmeias em suas propriedades (FBB, 2010).

O mel é o produto mais fácil de ser explorado e com maiores possibilidades de comercialização, embora não seja o mais rentável ao apicultor. A criação comercial visa, também, a produção de pólen apícola, própolis, cera de abelha, geleia real, apitoxina, rainhas, enxames e crias, além de serviços de polinização (PEREIRA *et al.*, 2003). O manejo de colmeias em áreas de plantios agrícolas resulta em “melhoria da qualidade dos frutos e promove amadurecimento mais uniforme, maior vigor das plantas que germinam, aumento no número de sementes produzidas e no teor de óleos e outras substâncias extraídas de algumas espécies vegetais” (DRUMOND, 2013, p.25). O manejo de colônias teve resultados positivos em culturas como acerola, maracujá (DRUMOND, 2013) e girassol (TOLEDO *et al.*, 2011).

A apicultura tem especial importância na agricultura familiar, mas é comum a atividade ter um caráter secundário nos estabelecimentos rurais. Muitos apicultores usam a atividade como complemento à agricultura ou pecuária e fonte alternativa de renda, sem prejuízos ao desenvolvimento das atividades principais (ARRUDA; BOTELHO; CARVALHO, 2011). Embora a apicultura seja desenvolvida em milhares de estabelecimentos rurais, estima-se que apenas um terço (1/3) destes estabelecimentos pratique uma produção racional e tecnicada, de modo que há potencial para aumento de produtividade e, conseqüentemente, de renda para o apicultor (SILVA; PEIXE, 2008).

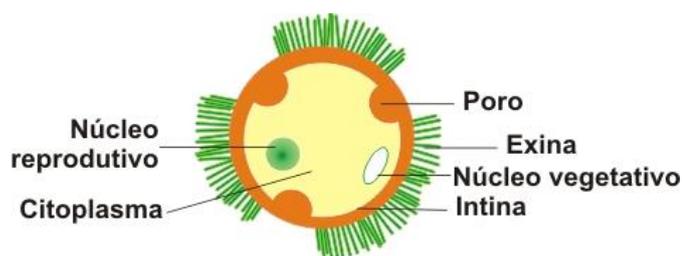
### **3 PÓLEN APÍCOLA**

Há indícios de que o pólen apícola seja consumido há séculos. No Egito Antigo era chamado de “o pó que dá a vida”. Hipócrates e Pitágoras indicavam o consumo deste alimento para seus pacientes porque acreditavam em seu potencial terapêutico (CAMPOS *et al.*, 2008). Na América do Norte, há registros de consumo

intencional entre os anos de 1.400 e 200 a.C. por indígenas (REINHARD; HAMILTON; HEVLY, 1991; LINSKENS; JORDE, 1997). Nos últimos anos, o consumo foi impulsionado pela demanda dos consumidores por produtos naturais, complementares à dieta ou com efeitos terapêuticos (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005a).

O pólen apícola é o resultado da aglutinação de diferentes grãos de pólen colhidos das flores pelas abelhas, que adicionam secreções salivares e pequenas proporções de néctar e/ou mel (BRASIL, 2001a; CAMPOS *et al.*, 2008). Os grãos de pólen das flores, por sua vez, são estruturas microscópicas (2,5 a 250  $\mu\text{m}$ ) cuja forma, tamanho, peso e cor variam entre as espécies de plantas (KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015).

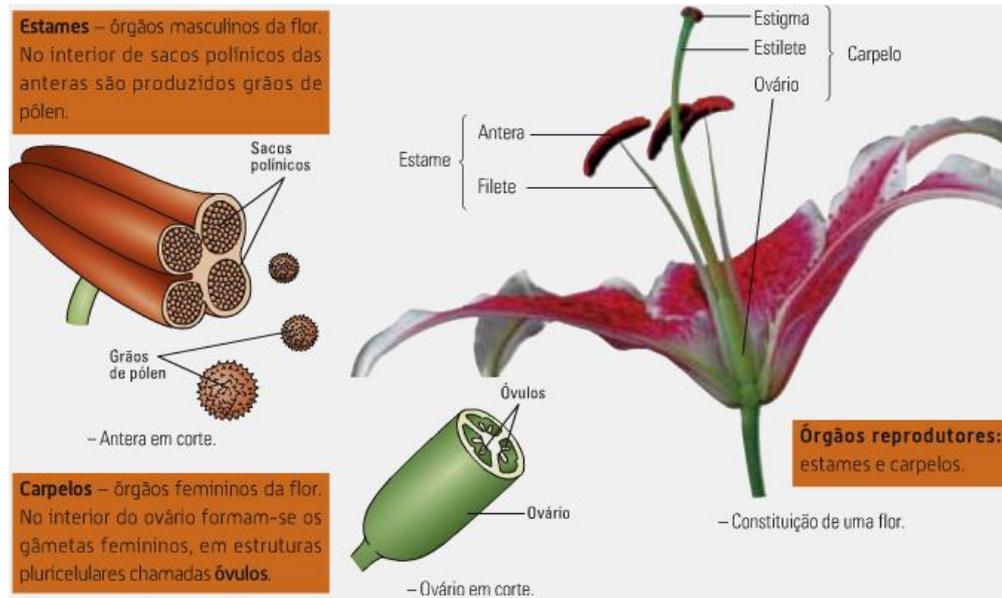
O grão de pólen contém o gametófito masculino das plantas superiores. Cada grão é protegido por uma parede interna (chamada intina), formada por celulose, pectina e calose, e uma parede externa (de nome exina), composta em grande parte por esporopolenina, composto de forte resistência a fatores físico-químicos (BOGDANOV, 2012b; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015). O grão é produzido e armazenado no interior das anteras das flores que, por sua vez, estão localizadas na parte terminal dos estames. É uma estrutura rica em nutrientes que são essenciais para a germinação (BOGDANOV, 2012a). Na Figura 2 é apresentado um esquema simples de um grão de pólen.



**Figura 2.** Esquema simplificado de um grão de pólen.

Fonte: Biologados, 2015

Ao realizar a coleta do pólen, as abelhas atuam como importantes agentes polinizadores, pois transferem os grãos das anteras para o estigma das flores (parte receptiva do órgão feminino), ocorrendo, então, a fecundação (Figura 3). A coleta do pólen pelas abelhas tem, portanto, grande importância para a sobrevivência de uma variedade de espécies vegetais (BOGDANOV, 2012a).

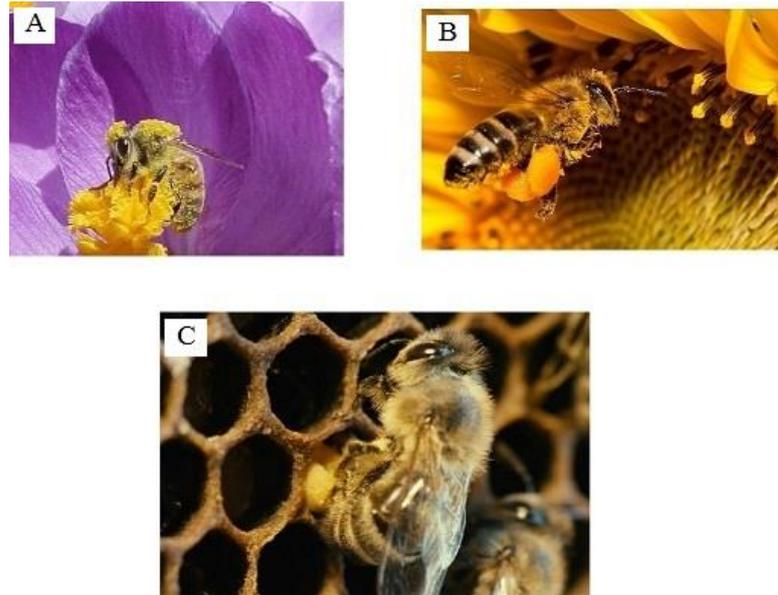


**Figura 3.** Sistema reprodutivo de uma planta monóica (as flores possuem tanto o órgão reprodutor feminino quanto masculino).

Fonte: Oliveira, 2008.

Para produzir uma única bolota (também chamada de grânulo ou carga) de pólen apícola, as abelhas visitam cerca de 200 flores. De maneira geral, cada bolota contém grãos de uma única espécie vegetal (BOGDANOV, 2012a; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015), mas, se necessário, as abelhas visitam mais de uma espécie, a fim de obter um produto que atenda suas exigências nutricionais. Embora exista uma variedade de plantas floríferas, nem todas são consideradas fonte polinífera para as abelhas. Certos grãos parecem ser mais atrativos e estes insetos são capazes de identificar fontes de pólen com maior valor nutritivo (BARTH, 2004; ARRUDA, 2009; MODRO *et al.*, 2011). Fatores como a quantidade de recurso disponível, presença de competidores e a distância entre a fonte vegetal e o ninho, também, influenciam na coleta pelas abelhas (LUZ *et al.*, 2010; SILVEIRA, 2012).

Assim que formadas as bolotas, as abelhas transportam-nas até a colmeia. Cada inseto transporta duas cargas aderidas ao corpo, mais especificamente em cavidades na superfície externa das patas posteriores, denominadas corbículas (PEREIRA *et al.*, 2003). Quando não há coleta pelo apicultor, as abelhas entram, armazenam as bolotas em alvéolos e o produto é mantido para posterior consumo pela colônia (Figura 4). Durante o armazenamento, ocorre um processo de fermentação láctica e, conseqüentemente, redução no pH, o que confere maior tempo de conservação ao produto. As abelhas consomem o pólen apícola fermentado, que é chamado de “pão das abelhas” (PEREIRA *et al.*, 2003; BARTH, 2004).



**Figura 4.** Abelha *Apis mellifera* realizando a coleta de pólen na flor (A); duas bolotas aderidas às corbículas de uma abelha (B); armazenamento das bolotas no alvéolo, dentro da colmeia (C).

Fonte: Beekeeping Photography (2012).

### 3.1 COLETA

O apicultor realiza a coleta do pólen apícola fixando, na colmeia, estruturas nas quais as cargas ficam retidas no momento em que as abelhas as atravessam. Estas estruturas são chamadas de “coletor de pólen”, “armadilhas de pólen” ou “caça-pólen”. Há mais de um tipo de coletor disponível no mercado e não há um consenso sobre qual estrutura é a mais adequada (ALVES, 2013b). De maneira geral, os coletores têm perfurações de, aproximadamente, 4,5 mm de diâmetro para permitir a passagem das abelhas, mas não de todas as bolotas de pólen apícola, que caem em recipientes coletores e, posteriormente, são recolhidas pelos apicultores (Figura 5) (CAMARGO, 2002; MAGALHÃES, 2005).

O manejo do caça-pólen varia entre as unidades de produção, porém, é comum que sejam fixados pela manhã e recolhidos no final da tarde. Recomendam-se períodos com e sem a estrutura para que as abelhas não se adaptem ao coletor e a produtividade das colmeias seja mantida (ALVES, 2013b). Pereira *et al.* (2006) citam que o consumo diário de pólen apícola da colônia varia de 1,5 a 10,7 g, sendo a média de 3,6 g/dia. As abelhas não conseguem manter a criação saudável sem esse alimento e Alves (2013b) recomenda que, durante a fase de coleta, as colmeias

recebam suplementação energética e proteica. Camargo *et al.* (2013) recomendam que nos períodos de pouca disponibilidade de floradas não haja coleta. Em dias chuvosos ou com umidade relativa do ar muito elevada, a coleta também deve ser evitada, pois estes são fatores que favorecem o crescimento microbiano durante o período em que o produto permanece nos recipientes coletores (CAMARGO *et al.*, 2003; GONZÁLES *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Coletor de pólen apícola instalado na colmeia (A); abelhas atravessando o coletor de pólen (B); as bolotas no recipiente coletor (C); apicultor recolhendo o produto ao final de um período (D).

Fonte: A: Camargo *et al.* (2003); Demais imagens: Rede... (2010).

### 3.2 BENEFICIAMENTO

Nas unidades de processamento, o pólen apícola passa por etapas de pré-limpeza, congelamento, descongelamento, desidratação, aeração, limpeza final, envase e armazenamento. Durante a pré-limpeza são retiradas abelhas mortas, folhas ou qualquer outra sujidade visível. A etapa de congelamento é útil para destruir ácaros e, também, ovos e larvas de traça ou de outros insetos, além de controlar o crescimento de fungos e bactérias. Além disso, em uma produção em escala industrial, é necessário congelar o produto porque o apicultor não tem

condições de desidratar grandes volumes de maneira imediata. Geralmente, o produto é mantido congelado por, pelo menos, dois dias. O descongelamento deve ser feito sob refrigeração para evitar dano celular e consequente perda de água e nutrientes (CAMARGO *et al.*, 2003; BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005b; LOPES *et al.*, 2011; BOGDANOV, 2012a).

Uma vez descongelado, o produto é desidratado. Barreto, Funari e Orsi (2005b) observaram que o processo de desidratação era realizado em todas as unidades de produção pesquisadas. Esta etapa, além de aumentar a vida de prateleira do produto, também permite que seja armazenado e comercializado à temperatura ambiente, ou seja, sem a necessidade de gastos com estrutura e manutenção de resfriamento ou congelamento. As condições de desidratação variam entre as unidades de produção, mas é comum o uso de estufas com aquecimento das mais simples e improvisadas, às que são fabricadas especificamente para esta atividade. De acordo com a legislação brasileira, deve-se respeitar uma temperatura máxima de 42°C e tempo suficiente para um teor de umidade final inferior a 4% (BRASIL, 2001a; BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005b). Uma vez submetido à desidratação, o produto passa a ser designado pólen apícola desidratado (BRASIL, 2001a).

É importante que o produto desidratado seja envasado o mais rápido possível. O pólen apícola desidratado é um alimento altamente higroscópico, de modo que, se o beneficiamento não ocorrer em ambiente com umidade relativa do ar controlada, pode haver reabsorção de água, principalmente em períodos chuvosos (MARCHINI, REIS, MORETI, 2006). Recomenda-se o uso de desumidificador nas salas onde há contato do produto desidratado com o ambiente (ALMEIDA-MURADIAN; ARRUDA; BARRETO, 2012).

Após a desidratação, o produto é novamente submetido a etapas de limpeza. Para retirar pequenas sujidades, algumas unidades realizam a aeração, processo que consiste em aplicar jatos de ar seco para que contaminantes, como poeira e fragmentos de abelhas, sejam removidos. Durante a limpeza final são retiradas impurezas maiores, como grãos de própolis e cera, por meio de catação manual com auxílio de pinças. Por fim, faz-se o envase em embalagens fracionadas, armazenamento e comercialização (CAMARGO *et al.*, 2003). Segundo Barreto *et al.* (2006), sob temperatura ambiente, a vida de prateleira do pólen apícola desidratado pode ser de até 8 meses, chegando a 12 meses se mantido à -12°C.

### 3.3 MERCADO

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAOSTAT), em 2013, o Brasil foi o décimo maior produtor mundial de cera de abelha e décimo primeiro maior produtor de mel com, respectivamente, 1,6 mil e 35,4 mil toneladas (FAOSTAT, 2015b). Para os demais produtos da colmeia, como o pólen apícola, a FAOSTAT não dispõe de informações. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) também não dispõe de dados a respeito da produção de pólen apícola no país, sendo que o último Censo Agropecuário é sucinto e contempla, apenas, informações gerais. Ao que consta, em 2006, 5.700 estabelecimentos rurais estavam envolvidos na produção de pólen apícola, geleia real, própolis ou demais produtos da apicultura (exceto mel e cera) e o total dessa produção foi de 5,7 mil toneladas (IBGE, 2007).

Há, também, poucos estudos científicos sobre a produção de pólen apícola no Brasil. O mais completo foi publicado por Barreto, Funari e Orsi (2005b) e, por esta razão, ainda é bastante citado. Os pesquisadores enviaram questionários aos apicultores e aos representantes de entidades apícolas de todos os Estados Brasileiros e da CBA. Ao final, reuniram informações como: número de colmeias em produção, período de ano em que a coleta era realizada, vegetação utilizada pelas abelhas, produção mensal, tipo de coletor utilizado, condições de processamento e comercialização. Alvarelli *et al.* (2011) observaram que a produção de pólen apícola no Brasil concentra-se nos Estados de Santa Catarina, Bahia e Sergipe, mas não informam a quantidade produzida em cada um destes ou as condições de produção. Alves (2013a) estimou que a produção brasileira seja em torno de 200 toneladas/ano.

A produção por colmeia é variável e está relacionada à disponibilidade de água e vegetação para as abelhas, condições climáticas, estado sanitário e nutricional da colônia, qualidade da rainha (idade, saúde, postura) e ao nível de tecnificação dos produtores. Barreto, Funari e Orsi (2005b) relataram produção mensal variando de 900 g a 48 kg, mas, segundo Alves (2013a), a média é de 5 a 7 kg. Em alguns Estados, o período de produção é restrito a determinados meses, como no Rio Grande do Sul onde a safra, normalmente, ocorre de setembro a abril. Na Bahia, há apiários que permanecem produtivos durante todo o ano, embora com variações na quantidade produzida (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005b). O preço

médio pago ao produtor é de R\$ 50,00/kg (ALVES, 2013a), chegando até R\$ 200,00/kg (SEAGRI, 2010).

Segundo o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), a produção nacional pode ser insuficiente para atender a demanda potencial de mercado (SEBRAE, 2007). Embora este estudo tenha sido realizado em 2007, profissionais que atuam na área acreditam que este panorama ainda permanece em razão do crescente interesse da população por produtos naturais e/ou com efeitos benéficos à saúde.

### 3.4 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL E NACIONAL

Poucos países contam com legislação específica para produtos apícolas e, destes, há os que estabelecem parâmetros de identidade e qualidade apenas para mel e/ou própolis, conforme consta em levantamento realizado por Almeida-Muradian (2009) (Tabela 1). No Brasil, a fiscalização das etapas de produção e beneficiamento do pólen apícola é de responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a fiscalização das etapas de armazenamento e distribuição, bem como de comercialização e do produto exposto à venda, ficam a cargo do Ministério da Saúde (MS).

O Decreto 30.691, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), importante conjunto de normas que vigoram em todo território brasileiro, trata apenas de mel e cera de abelhas e, ainda assim, são apenas 14 artigos relacionados a estes produtos (BRASIL, 1952). O Regulamento está em processo de revisão e espera-se a inclusão dos demais produtos apícolas e respectivos critérios de inspeção, bem como ajustes na denominação, tipo e obrigações dos estabelecimentos envolvidos em toda a cadeia apícola (MAPA, 2015). Quanto as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação, nas etapas de produção e beneficiamento dos produtos apícolas, deve-se seguir a Portaria nº 368 do MAPA, que estabelece requisitos para estabelecimentos elaboradores e/ou industrializadores de alimentos de origem animal (BRASIL, 1997).

Em 2001, foi aprovada a Instrução Normativa (IN) nº 3 do MAPA, legislação específica para fixação de identidade e qualidade de produtos das abelhas. O anexo

V trata exclusivamente do pólen apícola e contempla limites de umidade para o produto *in natura* (máximo 30%) e desidratado (máximo 4%), além de teores mínimos de 8% de proteínas, 1,8% de lipídeos e 2% de fibra bruta, teor máximo de 4% de cinzas e açúcares totais entre 14,5% e 55%, todos na base seca. Também foram estabelecidos valores de acidez livre de, no máximo, 300 mEq.kg<sup>-1</sup> e pH de 4 a 6. Com relação às características sensoriais, é dito apenas que aroma e cor devem ser característicos de acordo com a origem botânica (BRASIL, 2001a).

**Tabela 1.** Países que dispõem de regulamentação para controle de qualidade de produtos apícolas.

País	Mel	Própolis	Geleia Real	Pólen apícola
Alemanha	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
Argentina	Sim	Não	Sim	Sim
Armênia	Sim	Sim	Sim	Sim
Bélgica	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
Bulgária	Sim	Sim	Sim	Sim
Brasil	Sim	Sim	Sim	Sim
Canadá	Não	Não	Não	Não
China	Sim	Sim	Sim	Sim
Colômbia	EA	Não	Não	Não
Cuba	Sim	Sim	Não	Sim
El Salvador	Sim	Não	Não	Não
Eslováquia	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
EUA	Não	Não	Não	Não
Finlândia	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
França	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
Grécia	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
Guatemala	EA	Não	Não	Não
Holanda	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
Inglaterra	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
Itália	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
Japão	Sim	Sim	Sim	Sim
México	Sim	NI	NI	NI
Nepal	Sim	Não	Não	Não
Nicarágua	Sim	NI	NI	NI
Polônia	Sim	Sim	Sim	Sim
Portugal	Sim <sup>1</sup>	Não	Não	Não
República Tcheca	Sim	Não	Não	Não
România	Sim	Não	Não	Não
Rússia	Sim	Sim	Sim	Sim
Suíça	Sim	Não	Sim	Sim
Turquia	Sim	Sim	Sim	Sim
Uruguai	Sim	Não	Sim	Sim
Venezuela	Sim	Não	Não	Não

NI = não informado; EA = em aprovação; <sup>1</sup> Adota a legislação da União Europeia.

Fonte: Almeida-Muradian (2009).

Quanto a critérios microbiológicos, consta na IN nº 3 que “aplica-se o Regulamento Específico” (BRASIL, 2001a), mas em nenhuma outra legislação brasileira, seja ela do MAPA ou do MS, é estabelecido qualquer padrão microbiológico específico para o pólen apícola, seja ele *in natura* ou desidratado. No

Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cujo objetivo é estabelecer padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano, consta que “no caso de análise de produtos não caracterizados nas tabelas especificadas constantes no anexo da resolução, considera-se a similaridade da natureza e do processamento do produto, como base para seu enquadramento nos padrões estabelecidos para um produto similar” (BRASIL, 2001b). Barreto, Funari e Orsi (2005a) enquadraram o pólen apícola desidratado no grupo “produtos a base de amidos, farinhas, féculas e fubá, semielaborados, estáveis à temperatura ambiente”, no qual há limite para coliformes termotolerantes (até  $5,0 \times 10^2$  UFC/g) e para *Salmonella* sp. (ausência em 25g).

Embora estabeleça limites para os parâmetros físico-químicos, a IN nº 3 não estipula quais protocolos devem ser adotados para estas determinações, de modo que é possível chegar a diferentes resultados de acordo com o método de análise. Melo e Almeida-Muradian (2011) compararam seis condições para determinar o teor de umidade em amostras de pólen apícola desidratado, baseadas no seguinte: estufa convencional a 100°C, estufa a vácuo a 70°C, dessecador com ácido sulfúrico, secagem por radiação infravermelha, liofilização e titulação Karl Fisher. As pesquisadoras observaram variações de acordo com o protocolo empregado e concluíram que o uso de secagem por radiação infravermelha e de liofilização mostraram-se as melhores condições para determinar o teor de umidade neste produto.

A não indicação de procedimentos e a busca por um padrão internacional para os produtos apícolas despertou o interesse de pesquisadores e motivou a manutenção da *International Honey Commission (IHC)*. A *IHC* é uma comissão internacional que tem como objetivo a pesquisa em relação à qualidade dos produtos apícolas, aprimorando seus métodos de análise e propondo novos critérios de qualidade. Os membros da comissão, também, buscam propor um padrão internacional de identidade e qualidade para cada produto das abelhas (ALMEIDA-MURADIAN, 2009). A proposta vai de encontro à necessidade de regulamentação e normatização das atividades apícolas, de modo a garantir a qualidade e agregando valor aos produtos.

Os estudos realizados por membros da *IHC* e seus parceiros e colaboradores serão utilizados pela comissão para aprimorar e sugerir métodos de

análise, propor critérios de qualidade e, espera-se, criar um padrão internacional de identidade e qualidade de pólen apícola que englobe, inclusive, parâmetros para atividade biológica (IHC, 2013). Em 2008, membros da IHC publicaram o estudo “*Pollen composition and standardisation of analytical methods*”, uma revisão que contempla os atuais critérios de qualidade para comercialização do pólen apícola em alguns países e os diferentes protocolos utilizados para a análise deste produto. Neste estudo, os pesquisadores propõem métodos e critérios de qualidade e mencionam a necessidade de validar estes métodos e aplica-los em amostras coletadas em diferentes países para que seja possível estabelecer uma legislação internacional (CAMPOS *et al.*, 2008).

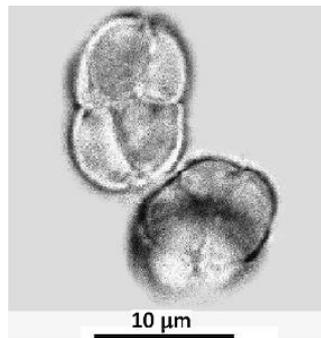
A ABNT criou a Comissão de Estudo Especial da Cadeia Apícola (ABNT/CEE-87) com objetivo de elaborar normativas para o setor apícola nacional. Para a cadeia produtiva de mel, há normas específicas para as etapas de produção e beneficiamento, rastreabilidade, preparo de amostras para análises físico-químicas e determinação de umidade, cinzas e sólidos insolúveis, além de requisitos de boas práticas higiênico-sanitárias e controles operacionais essenciais. Para a cadeia produtiva de própolis, existe uma norma que especifica requisitos para instalação do apiário, manejo das colmeias, coleta, acondicionamento, transporte e armazenamento do produto. Em maio de 2013, teve início o estudo que deve resultar em normas para a cadeia produtiva de pólen apícola, sugerindo requisitos técnicos, métodos de ensaios (botânicos, físico-químicos e microbiológicos), sistema de rastreabilidade e terminologia (ABNT, 2015).

### 3.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE POLÍNICA DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO

#### 3.5.1 Análise polínica

A análise morfológica e estrutural dos grãos de pólen é o método mais utilizado para determinar a origem botânica do pólen apícola, sendo possível identificar, até mesmo, a origem geográfica dos grãos (BARTH, 1989; MARTIN, 2002; BASTOS; SILVEIRA; SOARES, 2003; SODRÉ *et al.*, 2007). Os grãos de pólen

são visualizados em microscópio fotônico (Figura 6). Características como tamanho e forma dos grãos de pólen, número de aberturas e ornamentação da superfície são observadas e os táxons determinados por comparação com dados de literatura e de palinotecas.



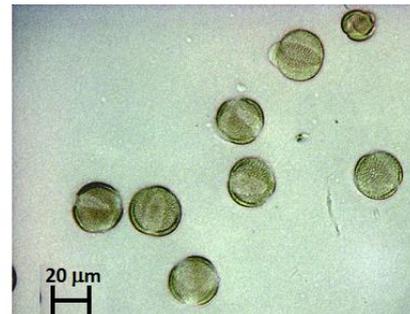
*Mimosa caesalpiniaefolia*



*Mimosa scabrella*



*Eucalyptus*



*Brassica*



*Cocos nucifera*



*Eupatorium*

**Figura 6.** Exemplos de tipos polínicos encontrados em amostras de pólen apícola desidratado produzidas em diferentes Estados brasileiros.

Fonte: arquivo pessoal de Dra Ortrud Monika Barth.

Com a análise polínica, busca-se sempre identificar a espécie vegetal, embora em algumas situações seja possível determinar, apenas, o gênero ou família (CAMPOS *et al.*, 2008). Em alguns casos, o pólen observado ainda não foi

catalogado, o que dificulta a identificação (ALVES *et al.*, 1999). Além da determinação dos táxons, faz-se a contagem de, pelo menos, 500 grãos de pólen por amostra para identificar a frequência de cada tipo polínico e, conseqüentemente, classificá-la como monofloral ou heterofloral. O pólen apícola é classificado como monofloral quando apresenta mais de 90% de um tipo polínico ou quando apresenta 60% ou mais de um tipo polínico sem a ocorrência do pólen acessório (BARTH *et al.*, 2010). Entende-se por pólen acessório o pólen que ocorre numa frequência de 15 a 45% do total dos grãos contados (BARTH, 2004).

No Brasil, um país com seis biomas e uma enorme diversidade climática e vegetal (IBGE, 2004) é produzido pólen apícola de composição variada. Cada produto tem características próprias relacionadas a fonte vegetal visitada pelas abelhas e a região que circunda o apiário. Amostras monoflorais de *Eucalyptus* (eucalipto), *Cocos nucifera* (coqueiro), *Mimosa scabrella* (bracatinga), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), *Baccharis* e *Antigonon leptopus* (cipó-coral, rosália, lágrima-de-noiva, amor-agarradinho) e com os tipos polínicos *Mimosa scabrella* (bracatinga), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) e *Baccharis*, já foram estudadas (BARTH *et al.*, 2010). Uma vez que as características do produto estão fortemente relacionadas com a composição do pólen, pode-se esperar que amostras monoflorais com alta prevalência de um mesmo tipo polínico tenham composição físico-química semelhante e, conseqüentemente, um perfil mais constante (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005), o que pode ser positivo para usos em dietas e medicina (BOGDANOV, 2012a). Por outro lado, cogita-se que amostras monoflorais tenham menor valor nutricional do que as amostras heteroflorais (PEREIRA *et al.*, 2006).

É válido considerar que a análise polínica é importante não só para pesquisadores em seus estudos de caracterização e comparação de amostras, mas também beneficia de maneira direta os apicultores. A identificação dos tipos polínicos permite determinar a contribuição de cada vegetal como fonte polinífera para as abelhas, o que possibilita ao produtor o plantio e a manutenção de espécies de interesse nas proximidades do apiário, além de auxiliar na escolha do local para instalação de novas colmeias (MODRO *et al.*, 2011). Ademais, um trabalho conjunto entre pesquisadores e produtores poderia direcionar a produção para fontes poliníferas com maior teor de compostos de interesse, como vitaminas e substâncias bioativas, resultando em um produto de maior valor nutricional e biológico (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A análise polínica combinada a análises físico-químicas e de propriedades biológicas permitiria a identificação de características específicas do pólen apícola de uma determinada região, o que possibilitaria aos produtores pleitear certificações como o selo de Indicação Geográfica (IG), uma garantia registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial quanto à origem de um produto e/ou suas qualidades e características regionais, a ser utilizado unicamente pelos produtores estabelecidos no local (INPI, 2011). A posse de uma IG agregaria valor e credibilidade ao pólen apícola, abrindo novos mercados e aumentando a renda nas propriedades rurais, como já acontece com o vinho do Vale dos Vinhedos (Rio Grande do Sul), o café do Cerrado Mineiro (Minas Gerais), a cachaça de Paraty (Rio de Janeiro), dentro outros (SEBRAE, 2009a). Se, além disso, o apicultor for capaz de atender certificações orgânicas, pode-se pleitear o selo de Produto Orgânico (IBD CERTIFICAÇÕES, 2013), o que é possível nesta atividade porque não há impactos negativos sobre o solo e demais recursos naturais, cabendo ao produtor observar, principalmente, a qualidade da água e o não uso de agroquímicos nas floradas visitadas pelas abelhas.

### **3.5.2 Características químicas**

A composição química do pólen apícola varia, basicamente, em função de sua origem botânica e geográfica. Também sofre influência das condições edafoclimáticas (como clima, tipo de solo, precipitação, vento), idade e estado nutricional da planta durante o desenvolvimento de grão. Em uma mesma espécie vegetal pode haver variações na composição do pólen de acordo com o local, estação do ano e em entre os anos (FUNARI *et al.*, 2003; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005; MELO *et al.* 2009; SILVEIRA, 2012).

O pólen apícola desidratado é composto por 28 a 66% de açúcares totais, 3 a 62% de proteínas, 1 a 13% de lipídeos, 0,3 a 20% de fibra bruta e 0,5 a 6% de cinzas (FUNARI *et al.*, 2003; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005; BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005a; MARCHINI; REIS, MORETI, 2006; SZCZESNA, 2006a; SZCZESNA, 2006b; MODRO *et al.*, 2007; QIAN *et al.*, 2008; VIT; SANTIAGO, 2008; MELO *et al.*, 2009; MODRO *et al.*, 2009; CARPES *et al.*, 2009; MARTINS, 2010; BOGDANOV, 2012a; CHANTARUDEE *et al.*, 2012; NOGUEIRA, 2012; PINTO; CAMPOS; BARRETO, 2012; ARRUDA *et al.*, 2013; FUENMAYOR *et al.*, 2014;

KOSTIC *et al.*, 2015). Vitaminas e compostos fenólicos também estão presentes (CAMPOS *et al.*, 2008; CARPES *et al.*, 2008; SATTLER, 2013; SOUZA, 2014).

Sacarose, glicose e frutose são os principais carboidratos do pólen apícola. Qian *et al.* (2008) encontraram valor médio de 17,6% de frutose, 16,8% de sacarose e 11,3% de glicose. Em uma amostra coletada na Tailândia, foram constatados 7,2% de frutose, 6,4% de glicose, 0,6% de sacarose e 0,53% de maltose (CHANTARUDEE *et al.*, 2012). Carpes *et al.* (2009) determinaram açúcares redutores (média de 48,8%) e açúcares totais (média de 52,1%) em amostras coletadas na região Sul do Brasil. Souza (2014) quantificou glicose (média de 6,7%) e frutose (média de 5,3%), também, em amostras coletadas na região Sul do país.

A quantidade de proteínas, embora inferior à de carboidratos, é bastante significativa. Em algumas amostras, o conteúdo chega a ser superior ao da carne bovina (24%) e de leguminosas, como o feijão (20%) e a lentilha (23%) (UNICAMP, 2011). O perfil de aminoácidos da fração proteica indica que o pólen apícola pode ser um alimento de elevado valor nutricional (HUMAN; NICOLSON, 2006). É comum observar pouca diferença qualitativa entre os grãos de pólen quanto a composição de aminoácidos, de modo que a maioria destes grãos contém todos os aminoácidos essenciais ao organismo humano (BOGDANOV, 2012a; NEGRÃO, 2014). Assim, pode-se dizer que, no geral, o pólen apícola contém todos estes compostos, porém, em quantidades que podem variar entre as amostras.

Human e Nicolson (2006), Paramás *et al.* (2006) e Szczesna (2006b) identificaram e quantificaram aminoácidos em amostras coletadas na África do Sul, Espanha e Polônia, respectivamente. Neste último estudo, a pesquisadora concluiu que a concentração de aminoácidos essenciais pouco variou entre as amostras e não dependeu da origem botânica do pólen apícola. Nicolson e Human (2012) observaram, em pólen apícola *in natura*, todos os aminoácidos essenciais, dentre os quais a leucina estava em maior quantidade (6,32 g/100 g de proteínas) e o triptofano em menor quantidade (0,17 g/100 g de proteínas).

Considerando-se uma ingestão diária de 25 g de pólen apícola, algumas amostras podem ser consideradas como fonte de proteínas desde que a composição de aminoácidos atenda à Resolução RDC nº 54 do MS. Em 2012, a ANVISA divulgou esta resolução alterando os critérios para uso de certos termos em alimentos. Um alimento é considerado “fonte de” proteínas se contém, no mínimo, 6 g de proteínas por porção e as quantidades de aminoácidos essenciais

estabelecidas na Resolução. É considerado “alto conteúdo” de proteínas se contém, no mínimo, 12 g de proteínas por porção e, também, atende as quantidades de aminoácidos essenciais estabelecidas (BRASIL, 2012).

Ácidos graxos estão presentes na fração lipídica do pólen apícola. Bastos *et al.* (2004) observaram que os compostos insaturados representavam de 14 a 56% do total de ácidos graxos em amostras produzidas em Minas Gerais, sendo que o teor de ácido linoléico variou de 9 a 50% e de ácido linolênico de traços a 4%. Os autores concluíram que o perfil de ácidos graxos nas amostras foi, basicamente, o mesmo, variando em quantidade. Szczêsna (2006a) observou variação no perfil de ácidos graxos ao comparar amostras coletadas na Polônia com amostras coletadas em outros países, atribuindo está variação a origem botânica do produto. Féas *et al.* (2012) identificaram e quantificaram os ácidos cáprico, palmítico, araquidônico, eicosanóico, oleico, linoleico e linolênico, e este último representou de 25,8 a 56,9% do total de ácidos graxos no produto.

O teor de cinzas é indicador da matéria inorgânica (contaminantes e minerais) na amostra. Durante a coleta e beneficiamento dos produtos apícolas, pode haver contaminação por terra ou outros resíduos inorgânicos, o que aumenta o teor de cinzas no produto final (MORGANO *et al.*, 2010; DE-MELO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012). Tal fato é indesejável e por esta razão a legislação brasileira estabelece limite máximo de 4% para este parâmetro (BRASIL, 2001a). O conteúdo de minerais é de interesse em nutrição. Cálcio, ferro, sódio, potássio, zinco, fósforo, magnésio, manganês, boro e cobre foram pesquisados em amostras coletadas em diferentes países, inclusive no Brasil (FUNARI *et al.*, 2003; CARPES *et al.*, 2009; BOGDANOV, 2012a; MORGANO *et al.*, 2012; FUENMAYOR *et al.*, 2014).

Morgano *et al.* (2012), que analisaram pólen apícola desidratado coletado em todas as regiões do país, observaram que as amostras forneciam, em média, 70% da ingestão diária recomendada (IDR) para adultos de manganês, 27% da IDR de cobre e 17% da IDR de zinco (BRASIL, 2005). De acordo com a Resolução RDC nº 54, com relação aos minerais, um alimento é considerado “alto conteúdo” quando fornece acima de 30% da IDR de referência por 100 g de produto e considerado “fonte” quando fornece pelo menos 15% (BRASIL, 2012).

Quanto ao teor de vitaminas no pólen apícola, chama atenção a quantidade de vitaminas do complexo B e precursores da vitamina A. Resultados de estudos sobre o conteúdo destes compostos são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Teores de pró-vitamina A, vitaminas do complexo B, vitamina C e vitamina E descritos em estudos com amostras de pólen apícola.

Parâmetro			Estudo						
			A	B	C	D	E	F	G
Pró-vitamina A (µg/g)	Carotenóides totais	Máx.		268,5				1232,9	
		Mín.		25,3				5,3	
	α-caroteno	Máx.						828,4	
		Mín.						3,3	
	β-caroteno	Máx.		77,9	198,9	15,3		179,2	
		Mín.		3,1	56,3	-		0,5	
Vitaminas do complexo B (mg/100g)	Tiamina (B <sub>1</sub> )	Máx.				0,20	1,01		1,83
		Mín.					0,64		0,46
	Riboflavina (B <sub>2</sub> )	Máx.				0,50	2,56		1,86
		Mín.					1,77		0,40
	PP, B <sub>3</sub> (ácido nicotínico + nicotinamida)	Máx.				7,03	14,43		8,69
		Mín.					7,27		2,67
	B <sub>5</sub>	Máx.				0,39			
		Mín.							
	B <sub>6</sub> (piridoxamina + piridoxal + piridoxol)	Máx.					0,77		7,13
		Mín.					0,33		0,78
Ácido fólico (B <sub>9</sub> )	Máx.				0,05				
	Mín.								
B <sub>12</sub>	Máx.				1,87				
	Mín.								
Vitamina C (µg/g)	Ácido ascórbico	Máx.	125,2	340,0	560,3			796,9	
		Mín.	104,9	114,0	273,9			60,3	
Vitamina E (µg/g)	α-tocoferol	Máx.		38,64		62,10		113,89	
		Mín.		16,27				4,65	
	β-tocoferol	Máx.						9,65	
		Mín.						0,69	
	γ-tocoferol	Máx.						11,56	
		Mín.						2,22	
	δ-tocoferol	Máx.						83,65	
		Mín.						0,81	

(A) Szczesna, Rybak-Chimielewska e Bornus (1991), amostras da Polônia;  
 (B) Melo *et al.* (2009), amostras de Pariquera-Açu/SP;  
 (C) Oliveira *et al.* (2009), amostras de Pindamonhangaba/SP;  
 (D) Chantarudee *et al.* (2012), amostra da Tailândia;  
 (E) Arruda *et al.*, (2013), amostras de Pariquera-Açu/SP;  
 (F) Sattler (2013), amostras da Região Sul do Brasil;  
 (G) Souza (2014), amostras da Região Sul do Brasil.

Numa porção de 25 g de pólen apícola desidratado, com os valores encontrados por Arruda (2009) para as vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e PP (B<sub>3</sub>), algumas amostras poderiam ser consideradas “fonte” destas vitaminas, de acordo com critérios estabelecidos em legislação (BRASIL, 2012). O conteúdo das vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, em pólen apícola desidratado analisado por Souza (2014), permitiria o uso das atribuições “fonte” ou até mesmo “alto conteúdo”. Conforme estabelecido na Resolução RDC nº 54 do MS, um alimento é considerado “fonte” de determinada

vitamina quando fornece o mínimo de 15% da IDR e “alto conteúdo” quando fornece, pelo menos, 30%. Ademais, o teor de vitamina B<sub>6</sub> em algumas amostras analisadas por Sousa (2014) foi alto o suficiente para suprir totalmente a IDR de um indivíduo adulto entre 30 e 50 anos (1,3 mg/dia) (BRASIL, 2005).

### 3.5.3 Características físicas

As características físicas do pólen apícola estão relacionadas à origem botânica dos grãos de pólen e, também, às abelhas. Moreti *et al.*, (2011) analisaram o comportamento de abelhas *A. mellifera* africanizadas, no que se refere ao tamanho das bolotas, e observaram que a maior parte das cargas tinham entre 1,7 e 2,0 mm. Saavedra, Rojas e Delgado (2013), ao avaliarem pólen apícola coletado em Cayaltí, Perú, observaram que as bolotas tinham entre 1,4 e 4 mm. De maneira geral, as cargas tem entre 6 a 26 mg de massa (MODRO *et al.*, 2009; FEUERBACHER *et al.*, 2003). Negrão *et al.* (2010) sugeriram que, se há a necessidade de buscar pólen de fontes vegetais de menor valor nutricional, as abelhas tendem a produzir cargas maiores de pólen apícola numa tentativa de suprir a demanda da colônia, que será maior em termos de quantidade.

Com relação à cor das cargas de pólen apícola, nota-se que também é variável. O mais comum são diferentes tons de amarelo e bege, porém há cargas brancas ou em diversos tons de laranja, vermelho, verde, marrom e cinza (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005; MODRO *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2011; SAAVEDRA; ROJAS; DELGADO, 2015). A composição química e origem botânica influenciam na cor dos grãos de pólen e, conseqüentemente, na cor das bolotas de pólen apícola, porém, apenas uma aparente homogeneidade na cor das cargas não significa que elas tenham a mesma origem botânica (MODRO *et al.*, 2009). O pólen de uma mesma espécie pode apresentar cores diferentes, ou espécies diferentes podem produzir grãos de pólen da mesma cor (VIT; SANTIAGO, 2008). Na Figura 7 são apresentados exemplos de cores das bolotas de pólen apícola e sua classificação após análise polínica.

Coleta, beneficiamento e armazenamento também são fatores que influenciam na cor do pólen apícola. Se o produto permanece por longos períodos na colmeia antes de ser recolhido pelo apicultor pode haver oxidação e, conseqüentemente, alteração na cor das bolotas (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*,

2005). Além disso, grãos de pólen do mesmo táxon podem apresentar variação na cor, de acordo com as condições de desidratação, ou mesmo no decorrer do armazenamento (BARTH *et al.*, 2010).



**FIGURA 7.** Amostra com aparente homogeneidade de cor classificada como heterofloral (A); amostras com cargas de diversas cores, porém classificadas como monoflorais (B, C).

Fonte: arquivo pessoal de Adriane A. M. de Melo.

### 3.5.4 Características microbiológicas

Micro-organismos deteriorantes e até mesmo patogênicos já foram encontrados no pólen apícola desidratado (NOGUEIRA, 2012; PUIG-PEÑA *et al.*, 2012). Estes micro-organismos podem contaminar o grão de pólen, ainda na planta, pela exposição do grão ao ambiente; a própria abelha pode contaminar o pólen ao depositar secreções salivares, mel e/ou néctar; a contaminação pode ocorrer no apiário e a proliferação dos micro-organismos ser favorecida por fatores extrínsecos (umidade do ar, temperatura ambiente) e pelo tempo de permanência do produto nas bandejas coletoras; ou ser resultante de práticas inadequadas de manejo a campo, transporte, processamento e armazenamento do produto (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005a; HERVATIN, 2009; NOGUEIRA, 2012).

O crescimento de micro-organismos em um alimento depende de condições favoráveis. Além da disponibilidade de nutrientes, fatores intrínsecos, como atividade de água ( $a_w$ ), pH e presença de antimicrobianos naturais, e fatores extrínsecos, como umidade e temperatura ambiente, influenciam no desenvolvimento da microbiota (FRANCO; LANDGRAF, 2009). O elevado teor de umidade, quando *in natura*, e o valor nutritivo do pólen apícola favorecem a proliferação de uma gama de micro-organismos, portanto, a criação de um ou mais obstáculos, como o uso de congelamento e desidratação, são importantes para evitar esta proliferação.

A desidratação de um alimento limita o metabolismo dos micro-organismos e inibe o seu desenvolvimento ou reprodução (FRANCO; LANDGRAF, 2009). Durante

a desidratação do pólen apícola, há redução considerável no teor de umidade de cerca de 30% para 4% e na  $a_w$  de 0,66-0,78 para 0,27-0,60 (BASTOS *et al.*, 2003; CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 2008; HERVATIN, 2009). Do ponto de vista microbiológico um alimento pode ser considerado estável quando a  $a_w$  é inferior a 0,60 (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Embora eficiente para controlar o desenvolvimento microbiano porque reduzir a  $a_w$  no produto final, a desidratação deste produto é realizada sob temperatura máxima de 42 C e tempo variando entre 10 a 30 horas, de modo que o processo não   drástico o suficiente para eliminar a popula o de micro-organismos, principalmente, esporos de bactérias mesófilas e fungos (HERVATIN, 2009; FRANCO; LANDGRAF, 2009). Portanto, mesmo após a desidrata o, quantidades variáveis de micro-organismos podem ser encontradas. Além disso, a contamina o pode ocorrer após o processamento (ESTEVINHO *et al.*, 2012).

Poucos países dispõem de critérios microbiológicos para a comercializa o deste produto, mas pesquisadores da *IHC* entendem que padrões devem ser estabelecidos e, de preferência, adotados internacionalmente para garantir o comércio entre países (CAMPOS *et al.*, 2008). A falta de uma legisla o nacional que estabeleça um padrão de qualidade microbiológica para o pólen apicola desidratado pode estar relacionada à ausência de diagnósticos que atestem a necessidade destes padrões, pois poucos estudos científicos, seja com amostras *in natura* ou desidratadas, foram encontrados (BARRETO, FUNARI; ORSI, 2005a; HERVATIN, 2009; SANTOS *et al.*, 2010).

A legisla o cubana, que inclui o pólen apicola no grupo dos alimentos de origem vegetal, estabelece limite máximo de  $10^2$  UFC/g para bolores e leveduras,  $<10^5$  UFC/g para coliformes totais, ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de amostra e ausência de *E. coli* em 1 g de amostra (PUIG-PE A *et al.*, 2012). A legisla o argentina estabelece limite máximo de  $1,5 \times 10^5$  UFC/g para aeróbios, máximo de  $10^2$  UFC/g para bolores e leveduras e ausência de micro-organismos patog nicos (ARGENTINA, 1971).

### **3.5.5 Propriedades biológicas**

Pesquisadores em todo o mundo tem estudado os possíveis benefícios   saúde associados ao consumo de pólen apicola. Resultados de estudos *in vitro* e *in*

*vivo* sinalizam atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora e antimutagênica (CAMPOS *et al.*, 2008; ABDELLA; TOHAMY; AHMAD, 2009; LEBLANC *et al.*, 2009; GRAIKOU *et al.*, 2011; BOGDANOV, 2012b; KACÁNIOVÁ *et al.*, 2012, NOGUEIRA *et al.*, 2012; FATRCOVÁ-SRAMKOVÁ *et al.*, 2013; PASCOAL *et al.*, 2014). As propriedades biológicas do pólen apícola parecem estar relacionadas, principalmente, a ação dos compostos fenólicos (CARPES *et al.*, 2008).

#### 3.5.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, são considerados substâncias bioativas, isto é, não sintetizados pelo organismo humano, de ação metabólica ou fisiológica específica e que, quando presentes regularmente e em quantidades significativas na dieta, auxiliam na prevenção de doenças (CARRATU; SANZINI, 2005; CAMPOS *et al.*, 2008; HORST; LAJOLO, 2011; OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Embora não exista uma indicação oficial de ingestão diária destes compostos, sugere-se um consumo de 200 a 1000 mg/dia de flavonoides (BOGDANOV, 2012b), uma classe de compostos fenólicos de ampla distribuição nos vegetais superiores e potencial biológico (FERREYRA, RIUS, CASATI, 2012).

Ao longo dos anos, pesquisadores identificaram efeitos positivos relacionados aos polifenóis, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiarterosclerose, antimutagênica e cardioprotetora. Estes efeitos parecem relacionados a uma capacidade intrínseca de redução, embora outros mecanismos sejam citados, como a modulação da atividade de certas enzimas, interações com receptores e vias de transdução de sinais e regulação do ciclo celular (MENEZES *et al.*, 2010; OLIVEIRA; BASTOS, 2011; BOGDANOV, 2012b). Deve-se considerar que a atividade biológica destes compostos depende, também, da taxa de absorção intestinal, metabolização e excreção destas substâncias pelo organismo (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Os compostos fenólicos são substâncias de diferenciação e especialização sintetizadas durante o metabolismo secundário dos vegetais. A origem biossintética destes compostos está relacionada a duas rotas metabólicas: a via do chiquimato e a via do acetato-malato, porém há substâncias cuja síntese envolve duas ou mais rotas principais num processo chamado de biossíntese mista. Entre os compostos

formados em duas ou mais vias estão flavonoides, estilbenos, taninos, xantonas e quinonas terpenoídicas (DEWICK, 2009; CUNHA; ROQUE, 2009c). As rotas de síntese de metabólitos secundários são uma série de reações químicas catalisadas por enzimas, nas quais produtos do metabolismo primário (acetil-CoA, fosfoenolpiruvato, 4-fosfo-eritrose) são utilizados como substrato para formação de novos compostos, os quais serão imediatamente utilizados pelas plantas, armazenados para uso posterior ou utilizados como substrato em uma nova rota de síntese (KHANAM, 2007; SILVA, 2009).

Os polifenóis são mediadores importantes na interação das plantas com o meio ambiente, fazendo parte dos mecanismos de defesa do vegetal em situações de estresse (mudanças climáticas, incidência de radiação UV) ou injúrias (cortes, ataque de herbívoros, patógenos) ou servindo como facilitadores em interações benéficas, como na atração de insetos polinizadores (CASTRO *et al.*, 2005; ZÁRADE, 2011). São responsáveis por parte da cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa dos vegetais (ANGELO; JORGE, 2007).

Englobam desde moléculas simples a moléculas com alto grau de polimerização, com no mínimo um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila. Estão presentes em todos os órgãos das plantas, seja na forma livre ou na forma de ésteres, éteres ou de glicosídeos (SIMÕES *et al.*, 2004; CUNHA; ROQUE, 2009c). De maneira geral, são muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas, o que pode dificultar sua identificação e quantificação (ANGELO; JORGE, 2007).

Os polifenóis podem ser classificados de acordo com o esqueleto básico, que corresponde a um anel aromático e uma cadeia substituinte (Tabela 3), ou de acordo com a ocorrência nos vegetais. Há compostos que são amplamente distribuídos, como os derivados de ácido benzoico, e compostos que são de distribuição restrita, como os ésteres de ácido cafeico que são encontrados apenas em plantas da família Lamiaceae. Estes ésteres são específicos e, por esta razão, podem ser considerados marcadores taxonômicos (SIMÕES *et al.*, 2004).

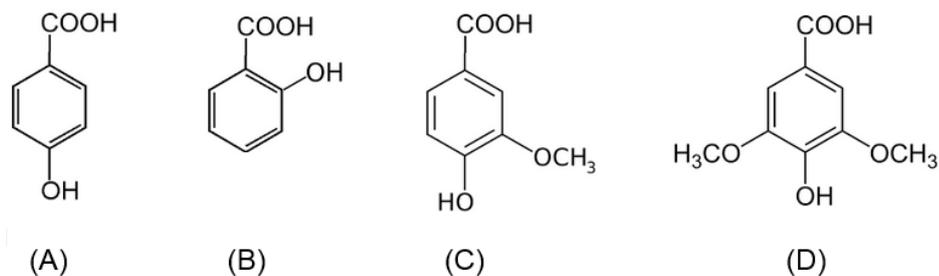
Uma classe de compostos fenólicos muito estudada é a classe dos ácidos fenólicos, da qual fazem parte os derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico. Caracterizam-se pela presença de um anel aromático, um grupamento carboxílico e pelo menos um grupo hidroxila e/ou metoxila. Os derivados do ácido benzoico tem a estrutura básica C6-C1 (anel aromático e cadeia substituinte com um átomo de

carbono) e são abundantes na natureza, principalmente, como parte de estruturas complexas, como os taninos hidrolisáveis. São exemplos de compostos derivados do ácido benzoico os ácidos: gálico e seu dímero (ácido elágico), vanílico, protocatéquico, siríngico e  $\beta$ -resorcílico. Os derivados do ácido cinâmico são, geralmente, encontrados sob a forma de glicosídeos propanoicos com estrutura C6-C3. São exemplos destes compostos os ácidos caféico, *o*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico (SOARES, 2002, CUNHA; ROQUE, 2009a). Na Figura 8 são apresentadas estruturas de ácidos fenólicos derivados de ácido benzoico e na Figura 9 derivados de ácido cinâmico.

**Tabela 3.** Classes de compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

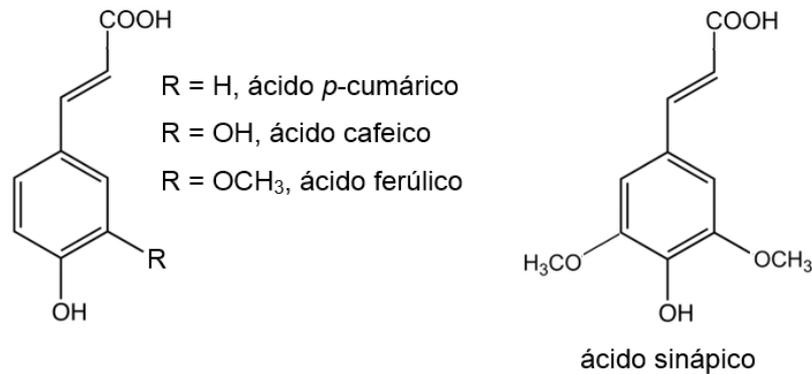
Estrutura	Classe
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenol, ácidos fenilacéticos
C6-C3	Ácidos fenólicos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Nafitoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antoquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides, isoflavonóides
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Diflavonóides
(C6) <sub>n</sub>	Melaninas vegetais
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanas, neolignanas
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6-C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

Fonte: Simões *et al*, 2004; Angelo e Jorge, 2007.



**Figura 8.** Estruturas do ácido *p*-hidroxibenzoico (A), ácido *o*-hidroxibenzoico (B), ácido vanílico (C) e ácido siríngico (D).

Fonte: Cunha e Roque (2009a).



**Figura 9.** Estruturas do ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico.

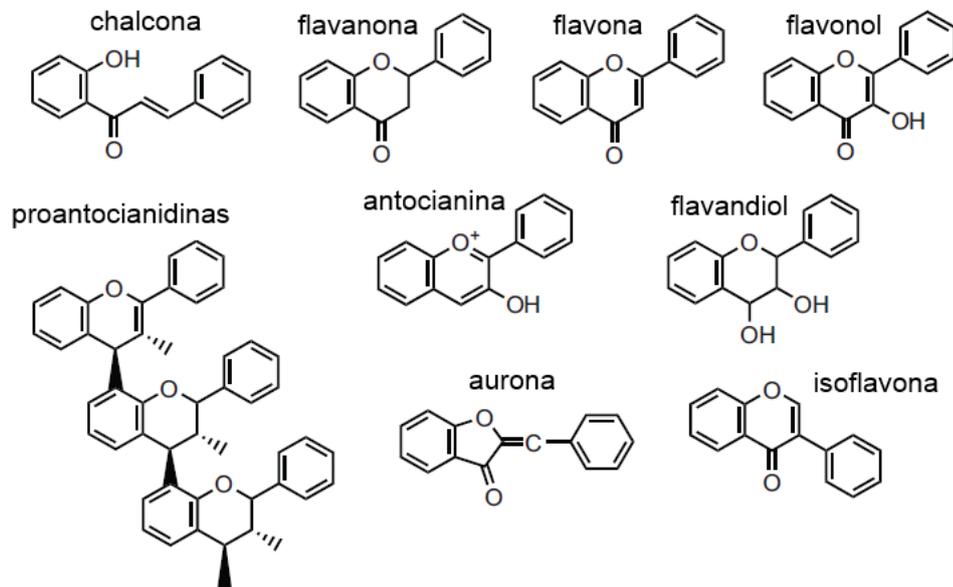
Fonte: Cunha e Roque (2009a).

Os flavonoides são outra classe de fenólicos de grande interesse em pesquisas em razão do potencial bioativo. Milhares de compostos já foram identificados e acredita-se que há muitos outros desconhecidos (FERREYRA, RIUS, CASATI, 2012). O termo flavonoide é derivado do latim *flavus*, que significa amarelo, porém as antocianinas são responsáveis pelas cores laranja-brilhante, rosa-escarlate, vermelho, violeta e azul nas pétalas de flores e nos frutos dos vegetais. Flavanonas, flavonas e flavonóis vão do incolor ao amarelo (BORGUINI, 2006; CAMPOS, 2009).

De acordo com Campos (2009), flavonóides são formados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e de unidades de acetato. Estão presentes em quase todos os tecidos vegetais, inclusive nos grãos de pólen. São encontrados na forma livre (aglicona), na forma de glicosídeos (glicosilada) ou como derivados metilados. Açúcares como glicose, galactose, ramnose, xilose, arabinose, apiose e alose são comuns, sendo que associações podem resultar em di-, tri- ou oligo-glicosídeos. Na forma glicosilada são solúveis em água, álcoois e outros solventes orgânicos polares, enquanto as agliconas são pouco solúveis em água, porém solúveis em solventes de polaridade intermediária e baixa.

Os flavonoides têm baixo peso molecular e são monômeros, dímeros ou polímeros, cuja estrutura básica consiste de 15 átomos de carbono distribuídos em duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos que pode formar ou não um anel pirano. Estes compostos foram divididos em subgrupos com base nas insaturações e no grau de oxidação do anel heterocíclico (SIMÕES *et al.*, 2004). Os principais subgrupos são: chalconas, flavonas, flavonóis, flavanóis (catequinas), flavandióis, flavanonas, antocianinas e proantocianidinas (ANGELO; JORGE, 2007;

FERREYRA, RIUS, CASATI, 2012). Na Figura 10 são apresentadas algumas estruturas dos subgrupos.



**Figura 10.** Estrutura de algumas classes de flavonoides.

Fonte: adaptado de Ferreyra, Rius e Casati, 2012.

Aguirre-Hernández *et al.* (2010) atribuíram a dois flavonoides da classe dos flavonóis (quercetina e campferol) a ação ansiolítica que resultou em significativa redução na atividade de ratos machos. Yang, Guo e Yuan (2008) realizaram estudos de capacidade antioxidante da rutina, em diferentes sistemas *in vitro*, e concluíram que este composto, da classe dos flavonóis, é um poderoso agente antioxidante cuja resposta é dose-dependente. A expressiva ação antioxidante de alguns flavonoides parece relacionada à presença de grupos hidroxila em sua estrutura, às duplas ligações nos anéis aromáticos e à dupla ligação da função oxo ( $-C=O$ ). Quanto maior o número de grupos hidroxílicos na molécula, maior a capacidade antioxidante, especialmente se este grupo estiver na posição 3 (PIETTA, 2000).

Em estudos com pólen apícola foram identificados compostos que pertencem a diferentes subgrupos de flavonoides, como quercetina, campferol e isoramnetina, sendo a maioria na forma de glicosídeos, especialmente *o*-glicosídeos (KETKAR *et al.*, 2014). Derivados de ácido benzoico e de ácido cinâmico, como o ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, também foram identificados (NEGRI *et al.*, 2011; FANALI; DUGO; ROCCO, 2013). Pinto *et al.* (2008) isolaram e identificaram um flavonoide glicosilado (isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo), uma cumarina (escopoletina) e dois derivados de ácido benzoico

(ácidos *p*-hidroxibenzóico e *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico) de extratos de *Richardia brasiliensis* G., uma planta da família Rubiaceae que pode ser fonte de pólen para as abelhas.

A ocorrência dos polifenóis no pólen apícola parece relacionada a origem botânica (CAMPOS *et al.*, 2008). É possível que cada espécie vegetal produza um perfil de compostos bastante característico em termos qualitativos e quantitativos, portanto, pode-se dizer que o perfil destes compostos é espécie-específico. Com base nesta hipótese, pesquisadores realizaram estudos de caracterização na tentativa de identificar, pelo conteúdo de polifenóis, a espécie botânica da qual o grão de pólen foi colhido, o que também permitiria uma associação entre atividade biológica e origem botânica do pólen apícola. Neste contexto, estes compostos seriam considerados marcadores taxonômicos (CAMPOS *et al.*, 2008).

A identificação dos compostos fenólicos pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massa. Uma etapa comum aos métodos é a extração prévia dos compostos que, no caso do pólen apícola, estão protegidos pelas camadas externa (exina) e interna (intina). Os solventes mais utilizados para a extração são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (ANGELO; JORGE, 2007). Embora análises por CLAE possibilitem a identificação e quantificação de compostos, existe a demanda por métodos de maior confiabilidade. O uso de espectrometria de massas permite identificar, com elevada exatidão, compostos em misturas complexas. O espectro de massa indica a massa molecular e o padrão de fragmentação, este último podendo contribuir para a localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais (CUNHA; ROQUE, 2009d). Os dados gerados são comparados com informações disponíveis em literatura ou com padrões analisados em paralelo às amostras.

#### 3.5.5.2 Capacidade antioxidante

Radicais livres são moléculas orgânicas ou inorgânicas e átomos que contém um ou mais elétrons não pareados no orbital externo (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Se o elétron desemparelhado estiver centrado no átomo de oxigênio trata-se de uma espécie reativa de oxigênio, e são exemplos: oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e radical peroxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Embora não se

enquadre na definição de radical livre, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é frequentemente citado porque participa das reações que produzem o radical  $OH^\bullet$ . Quando o elétron desemparelhado encontra-se centrado em um átomo de nitrogênio tem-se uma espécie reativa de nitrogênio, como o óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; COTINGUIBA *et al.*, 2013; MARTELLI; NUNES, 2014). Os radicais livres são compostos oxidantes altamente instáveis e capazes de reagir com praticamente qualquer molécula próxima, a fim de captar um elétron para sua estabilização (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Fatores exógenos, como tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações são fontes geradoras de radicais livres (SOARES, 2002), porém, estes compostos são formados continuamente no citoplasma, mitocôndrias ou membrana das células em processos metabólicos normais dos seres vivos (COTINGUIBA *et al.*, 2013). O organismo dispõe de mecanismos de controle enzimático e não enzimático para estabilizar moléculas oxidantes. Na condição de equilíbrio entre produção de radicais livres e atuação dos mecanismos de controle, estes compostos desempenham importantes funções biológicas (MARTELLI; NUNES, 2014), atuando na sinalização intercelular, na regulação do tônus muscular e no combate a infecções, especialmente, no processo de fagocitose (LOPES *et al.*, 2011).

Quando a concentração de radicais livres no sistema biológico ultrapassa a capacidade de controle do organismo, há um excesso de oxidantes, ocorrendo o chamado estresse oxidativo. Nesta situação, os radicais livres podem reagir com açúcares, causando a quebra da cadeia de moléculas importantes como o ácido hialurônico; com proteínas, causando a oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos; com lipídeos, causando a peroxidação lipídica; e com ácidos nucleicos, levando a quebra da cadeia do DNA, a ligação cruzada entre as fitas e modificações nas suas bases, levando a mutações e apoptose (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O estresse oxidativo pode ser uma das causas do desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças cardíacas e degeneração neuronal (UTTARA *et al.*, 2009).

Numa definição simples, antioxidante é “qualquer composto que, quando presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, reduz ou inibe o dano oxidativo” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A capacidade

antioxidante de um composto depende de características físico-químicas, como polaridade, solubilidade, capacidade de formar pontes de hidrogênio e potencial de oxidação-redução, de uma relação estrutura/atividade e de sua biodisponibilidade (BORGUINI, 2006; CAMPOS *et al.*, 2008; OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Há antioxidantes exógenos naturais (produzidos por vegetais e microorganismos) e antioxidantes exógenos sintéticos, como o BHT (butil-hidróx-itolueno), o BHA (butil-hidroxianisol) e o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico). Antioxidantes sintéticos são utilizados na indústria alimentícia, porém, suspeita-se de potencial risco à saúde associado ao consumo frequente (LOPES *et al.*, 2011).

Antioxidantes exógenos podem ter um papel fundamental na prevenção do estresse oxidativo, portanto, o consumo diário destas substâncias pode auxiliar na prevenção de doenças e do envelhecimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LOPES *et al.*, 2011). O pólen apícola desidratado contém compostos de expressiva capacidade antioxidante. Os fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos e os flavonóides presentes neste alimento, parecem capazes de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres, tornando-os estáveis e, conseqüentemente, incapazes de promover danos (ANGELO; JORGE, 2007). As vitaminas C e E, assim como o  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A), também atuam como agentes antioxidantes e estão presentes no pólen apícola (CAMPOS *et al.*, 2003; CARPES *et al.*, 2008; LeBLANC *et al.*, 2009; MELO; ALMEIDA-MURADIAN, 2010; MORAIS *et al.*, 2011). Segundo Carpes *et al.*, (2008), o teor de substâncias antioxidantes no pólen apícola é influenciado pela origem botânica da amostra.

Existem vários métodos descritos para determinar, *in vitro*, a capacidade antioxidante de um alimento, dentre estes o método DPPH e o método ORAC (*oxygen-radical absorbancy capacity*). O DPPH é um método em esquema não competitivo, isto é, há no sistema apenas dois componentes: a espécie reativa e o antioxidante. Já o método ORAC é um esquema competitivo, ou seja, há no sistema três componentes: a espécie reativa, uma sonda e o antioxidante, onde a sonda e o antioxidante competem pela espécie reativa (radical peroxil) gerada a partir de um composto adicionado. Sondagens são moléculas sensíveis às moléculas reativas e que, após reagirem com a molécula, tem uma propriedade físico-química alterada que pode ser de alguma forma aferida (RODRIGUES, 2009; CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011). De maneira geral, recomenda-se a realização de mais de um ensaio, tanto em esquemas competitivos quanto em esquemas não competitivos,

para um melhor entendimento do potencial antioxidante da amostra em questão (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

O método DPPH baseia-se na desativação do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por compostos antioxidantes presentes no meio. A estrutura deste radical é caracterizada por uma valência com um elétron desemparelhado em um átomo de nitrogênio (RODRIGUES, 2009), o que possibilita a transferência de um elétron para este átomo. O DPPH• é um cromógeno púrpura que, ao receber um elétron, torna-se uma molécula estável de cor amarela, permitindo que sua desativação seja monitorada pelo decréscimo da absorbância a 515-520 nm. Neste sistema, considera-se que quanto menor a percentagem final de radical, maior o teor de antioxidantes na amostra (TOMEI; SALVADOR, 2007; RODRIGUES, 2009). É considerado um método rápido e preciso (BORGUINI, 2006).

O método ORAC é preferido por alguns pesquisadores porque combina tempo e percentagem (%) de inibição do radical pelo antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Neste ensaio, o AAPH [2,2'-azobis(2-metilpropionamida)diidrocloro] é o gerador de radicais peróxil e a fluoresceína uma sonda fluorescente. Os radicais reagem com a sonda, a menos que haja compostos antioxidantes no sistema capazes de impedir. A reação dos radicais com a sonda resulta em um produto não fluorescente, de modo que a leitura da fluorescência, em equipamento específico, é o indicador indireto da capacidade antioxidante dos compostos presentes no meio. (TOMEI; SALVADOR, 2007; ALVES *et al.*, 2010). A *United States Department of Agriculture (USDA)* aponta o método ORAC como uma boa escolha para testes de capacidade antioxidantes *in vitro* de compostos bioativos. Este método foi sugerido pela entidade para análise de alimentos diversos e várias empresas adotam para realizar comparações entre produtos. Também tem sido objeto de interesse em pesquisas (NUTRACEUTICALS WORD, 2004).

Determinações *in vitro* da capacidade antioxidante do pólen apícola são comumente realizadas pelo método DPPH. Os resultados são frequentemente apresentados em EC<sub>50</sub> (*effective concentration 50*), ou seja, em concentração de amostra (mg/mL) necessária para reduzir 50% do radical, ou em percentual de inibição. Carpes *et al.* (2008) analisaram amostras de pólen apícola desidratado procedentes da região Sul do Brasil e observaram percentagem de inativação do radical de 30,54% a 94,73% em extratos a base de etanol a 70% na concentração de 2,7 mg/mL. Já Menezes *et al.* (2010), que analisaram a capacidade antioxidante

de amostras produzidas no Estado da Bahia, observaram percentuais de inativação semelhantes, porém em extratos em maior concentração (67 mg/mL).

É fato que a capacidade antioxidante de um alimento *in vitro* pode não ser a mesma em um sistema *in vivo* (USDA, 2010), mas testes *in vitro* são importantes no sentido de direcionar os estudos para que apenas amostras com algum potencial sejam avaliadas *in vivo*. Esse direcionamento é especialmente importante no caso do pólen apícola, dada variedade de produtos relacionada à origem botânica.

### 3.5.5.3 Capacidade antimicrobiana

Antimicrobianos podem ser definidos como compostos que, em baixas concentrações, são capazes de inibir o desenvolvimento ou inativar, seletivamente, micro-organismos (CUNHA; ROQUE, 2009b). Estes compostos podem ser utilizados no tratamento ou prevenção de infecções (LEVIN; KOBATA; LITVOC, 2014) e como aditivos em formulações alimentares (MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005). Em criações comerciais são administrados para melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar dos animais, sendo chamados de promotores de crescimento. Em cultivos agrícolas são parte das medidas adotadas para o controle das bacterioses (MAIA; RATH, REYES, 2009).

Os agentes antimicrobianos reduziram drasticamente o número de mortes por doenças infecciosas nos anos que se seguiram à sua introdução (COMISSÃO EUROPÉIA, 2015). No entanto, o uso indiscriminado destes compostos exerce uma enorme pressão seletiva para a sobrevivência e multiplicação de cepas que, até então, eram sensíveis à ação de antimicrobianos conhecidos (ANVISA, 2015). A emergência de bactérias resistentes às drogas disponíveis é uma preocupação mundial, de modo que o uso adequado dos antimicrobianos e a busca por compostos eficazes contra cepas resistentes são ações necessárias e urgentes (COMISSÃO EUROPÉIA, 2015).

O pólen apícola possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras (MORAIS *et al.*, 2011, NOGUEIRA *et al.*, 2012; CABRERA; MONTENEGRO, 2013; FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ *et al.*, 2013). É possível que esta atividade esteja relacionada a ação de compostos fenólicos, que atuam na inativação de enzimas, promovendo alterações na permeabilidade das membranas e perda de material celular, ou ainda, na inativação ou destruição do

material genético (BORGUINI, 2006; ALMEIDA, 2007). Quanto maior o grau de hidroxilação dos compostos, maior seria a sua toxicidade (ALMEIDA, 2007).

Graikoi *et al.* (2011) analisaram a atividade antimicrobiana de três extratos de pólen apícola (metanólico, aquoso e diclorometanólico) e observaram fraca atividade no extrato diclorometanólico, enquanto os extratos metanólico e aquoso tiveram uma considerável ação antibacteriana, especialmente contra bactérias Gram positivas. Além disso, os autores analisaram a ação de flavonoides isolados por cromatografia líquida de média pressão. Os flavonoides exerceram forte atividade contra bactérias Gram positivas, o que fez com que os autores associassem parte significativa da atividade observada nos extratos à presença destes compostos.

Carpes *et al.* (2008) observaram que a ação antimicrobiana do pólen apícola varia entre micro-organismos e, de maneira geral, as bactérias são mais sensíveis aos compostos que as leveduras. Graikou *et al.* (2011), que analisaram extratos metanólico e aquoso de pólen apícola desidratado produzido na Grécia, observaram que as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram mais sensíveis que as leveduras *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*. Os autores associaram a capacidade antimicrobiana das amostras à ação de flavonoides.

Entre as bactérias, as Gram negativas são, geralmente, mais resistentes aos compostos antimicrobianos que as Gram positivas. Isto pode estar relacionado a membrana externa que envolve a célula Gram negativa, cuja estrutura química pode restringir a passagem destes compostos (DE-MELO, 2010; MORAIS *et al.*, 2011). A seletividade da membrana externa pode explicar parte dos resultados de Pascoal *et al.* (2014), que analisaram amostras de pólen apícola desidratado, coletadas em Portugal e Espanha, e observaram que os extratos foram mais efetivos contra bactérias Gram positivas.

Além da resposta ao antimicrobiano estar diretamente relacionada ao micro-organismo teste, o solvente e a diluição utilizados na extração dos compostos do pólen apícola, também, influenciam o resultado da análise. Kacániová *et al.* (2012) observaram que quando a extração foi realizada com etanol a 96%, *Aspergillus fumigatus* e *Candida krusei* foram as espécies mais sensíveis, porém, quando a extração foi realizada com etanol a 70% *A. fumigatus* continuou sendo o mais sensível e o potencial de inibição frente a *C. krusei* reduziu consideravelmente. Com

extratos a base de metanol a 99,9%, os autores observaram maior efeito inibitório sobre *E. coli*, já com extratos a base de metanol a 70%, o maior efeito foi observado sobre *C. glabrata*. Estas variações estão relacionadas aos compostos extraídos por cada solvente/diluição, fato que também foi observado por Carpes *et al.* (2008) em estudo anterior. Fatrcová-Šramková *et al.* (2013) avaliaram extratos metanólicos e etanólicos de pólen apícola e concluíram que aqueles à base de etanol foram os de maior atividade.

Há uma variedade de métodos para determinar, *in vitro*, a capacidade antimicrobiana de um alimento ou substância, entre eles os ensaios bioautográficos, ensaios de difusão e ensaios de diluição. Os ensaios bioautográficos envolvem o uso de cromatografia de camada delgada para separação dos compostos, que são então colocados em contato ou imersos em placas previamente inoculadas com o micro-organismo teste. Os ensaios de difusão baseiam-se na difusão do extrato em um meio de cultura sólido e previamente inoculado (ALMEIDA, 2007).

O ensaio de diluição é apontado como o mais preciso para determinar a capacidade antimicrobiana de um composto ou mistura de compostos, embora seja um método complexo. Consiste em adicionar alíquotas da solução teste em meio de cultura previamente inoculado com o micro-organismo, incubar e finalmente comparar o crescimento com um controle negativo. Pode-se, ainda, realizar a leitura da turbidez em espectrofotômetro com comprimento de onda específico para determinar o resultado (ALMEIDA, 2007). A efetividade da mistura de compostos ou composto isolado é frequentemente apresentada em concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de extrato capaz de cessar ou retardar o crescimento do micro-organismo teste.

#### 3.5.5.4 Capacidade anti-inflamatória

A inflamação é o mecanismo natural de defesa do organismo a injúrias, como infecções, traumas e isquemia. O objetivo do processo inflamatório é reestabelecer a homeostase, e para tal ocorre uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas que são mediadas em resposta ao estímulo nocivo. São exemplos de mediadores inflamatórios: aminas vasoativas (histamina, serotonina), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano), sinalizadores celulares (citocinas, como as interleucinas, os fatores de necrose

tumoral e os interferons), sistema complemento (C3a, C5a, C3b) e fator de ativação plaquetária. São manifestações clínicas da inflamação: rubor, calor, edema e dor (VOLTARELLI, 1994).

É importante que o processo inflamatório ocorra de forma controlada e restrita ao local da injúria. Uma resposta exagerada e persistente pode ter consequências graves ao organismo, como lesões teciduais, insuficiência de múltiplos órgãos e até mesmo a morte (OLIVEIRA *et al.*, 2011). As drogas anti-inflamatórias são alternativas para o controle da inflamação que agem inibindo enzimas que atuam na formação de mediadores, bloqueando receptores, ou mesmo inibindo a transcrição de substâncias envolvidas no processo (ANTONOW; MONTEIRO; ARAUJO, 2007; BATLOUNI, 2010).

O potencial de ação dos compostos presentes no pólen apícola é comparado ao de anti-inflamatórios não esteróides, como o naproxeno, analgin, fenilbutazona e indometacina. Flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos graxos e fitoestéroides são indicados como os principais responsáveis pela capacidade anti-inflamatória do pólen apícola (HAMALAINEN *et al.*, 2007; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015).

Pascoal *et al.* (2014) observaram que o percentual de inibição da enzima hialuronidase por extratos de pólen apícola variou de 12 a 25%, de acordo com a amostra. A inibição da hialuronidase é uma medida indireta da atividade anti-inflamatória de um composto ou mistura de compostos, isto porque a enzima age despolimerizando o ácido hialurônico, o que poderia causar perda óssea, inflamação e dor. A capacidade anti-inflamatória do pólen apícola foi testada *in vivo* por Choi (2007), que avaliou a capacidade de extratos de pólen de *Pinus densiflora* (pinheiro) de aliviar a inflamação e a dor em camundongos machos, submetidos a diferentes protocolos. Houve redução significativa na inflamação induzida, bem como na percepção da dor, nos animais que receberam os extratos, porém o mecanismo de ação e os princípios ativos responsáveis pela resposta não foram confirmados.

#### **4 CONCLUSÃO**

O Brasil tem grande potencial para a prática da apicultura, mas em muitos estabelecimentos rurais a atividade, ainda, tem caráter secundário. Os produtos

apícolas tem grande potencial nutritivo e biológico e sabe-se que há um interesse dos consumidores por produtos naturais com estas características. Por tal razão, a atividade apícola deve ser melhor estudada, tecnicada e incentivada, a fim de aumentar a produção atual e atender esta demanda de mercado. O pólen apícola é um importante produto da apicultura, cuja composição varia de acordo com o local e época de produção. Além de potencial nutritivo, propriedades importantes como ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória já foram atribuídas a este produto. Estudos devem ser direcionados no sentido de caracterizar mais amostras, bem como fixar padrões de identidade e qualidade.

## 5 REFERÊNCIAS

ABDELLA, E.M.; TOHAMY, A.; AHMAD, R.R. Antimutagenic activity of egyptian propolis and bee pollen water extracts against cisplatin-induced chromosomal abnormalities in bone marrow cells of mice. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v.2, n.4, 175-181, 2009.

ADMIN. **Aspectos e impactos ambientais da agropecuária**. Campo Grande, 2011. Disponível em: <[www.licenciamentoambiental.eng.br](http://www.licenciamentoambiental.eng.br)>. Acesso em: 15 mai. 2011.

AGUIRRE-HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ-TRUJANO, E.; MARTÍNEZ, A.L.; MORENO, J.; KITE, G.; TERRAZAS, T.; SOTO-HERNÁNDEZ, M. HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, n.1, p.91-97, 2010.

ALMEIDA, A.A.P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. Belo Horizonte, 2007, 137p. Tese de Doutorado - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais.

ALMEIDA, M.A.D.; CARVALHO, C.M.S. **Apicultura: uma oportunidade de negócio sustentável**. Salvador: SEBRAE-BA, 2009, 52p.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B. **Qualidade dos produtos apícolas e otimização quimiométrica dos métodos de análise do mel por espectroscopia no infravermelho (FT-IR ATR)**. São Paulo, 2009, 120p. Tese de Livre Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; ARRUDA, V.A.S.; BARRETO, L.M.R.C. **Manual de Controle de Qualidade do Pólen Apícola**. São Paulo: APACAME, 2012. 28 p.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets, **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, n.1, p.105-111, 2005.

ALVARELLI, L.G.; SANTOS, S.S.F.; LEÃO, M.V.P.; SANTOS, M.M.E.O.; BRAGA, T.C.; MOREIRA, R.M.; BARRETO, L.M.R.C. Índices microbiológicos na rota da coleta ao beneficiamento do pólen apícola em Canavieiras, estado da Bahia. **Revista Magistra**, v.23, n. esp., p.22-25, 2011.

ALVES, M.L.T.M.F. Pólen - alimento e grande fonte de renda para o apicultor. **Apta Regional**, v.10, n.2, 2013a.

ALVES, M.L.T.M.F. Produção de pólen apícola. **Apta Regional**, v.10, n.2, 2013b.

ALVES, L.R.; ARAÚJO, A.A.; BASTOS, E.; NETO, J.L.S. **Aplicação da computação na identificação de pólen em produtos apícolas**, 1999. Disponível em: <<http://laplace.dcc.ufmg.br/npdi/uploads/c0a80a68-9a0d-13b0.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2015.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.232-240, 2007.

ANTONOW, D.R.; MONTEIRO, G.A.; ARAUJO, M.C.S. Glicocorticoides: uma meta-análise. **Disciplinarum Scientia**, v.8, n.1, p.51-68, 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos: mecanismo enzimático**, 2015. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mec\\_enzimatico.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm)>. Acesso em: 13 ago. 2015.

ARGENTINA. Ley nº 18.284, de 30 de junio de 1971. La Secretaría de Estado de Salud Pública establece la vigencia de las normas higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial contenidas en el Código Alimentario Argentino. **Boletín Oficial**, Buenos Aires, 20 set. 1971.

ARRUDA, J.B.F.; BOTELHO, B.D.; CARVALHO, T.C. Diagnóstico da cadeia produtiva da apicultura: um estudo de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 31, Belo Horizonte, 2011. **Anais eletrônicos**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Engenharia de Produção, 2011. Disponível em: <www.abepro.org.br>. Acesso em: 21 mai. 2013.

ARRUDA, V.A.S. **Estabilidade de vitaminas do complexo B em pólen apícola**. São Paulo, 2009. 105p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ARRUDA, V.A.S.; SANTOS-PEREIRA, A.A.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n.2, p.100-105, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Apicultura - Equipamentos - Colméia tipo Langstroth**: NBR 15713. São Paulo, 2009. 24p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT/CEE-87 – Comissão de estudo especial de cadeia apícola**. São Paulo, 2015. Disponível em: <www.abnt.iso.org>. Acesso em: 24 mai. 2015.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete Estados brasileiros e do Distrito Federal, **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.2, p.167-175, 2005a.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. In: CONGRESSO DE APICULTURA DEL MERCOSUR, 1, Punta Del Este, 2005b. **Anais**. Punta Del Este: Sociedad de Apicultores Uruguay, 2005. p.20.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O.; DIB, A.P.S. **Produção de pólen no Brasil**. Taubaté: Cabral, 2006. 100p.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees, **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p.342-350, 2004.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.

BASTOS, D.H.M.; BARTH, O.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S.; MICHELAN, M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (Apis) pollen loads in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.43, n.2, p.35-39, 2004.

BASTOS, D.H.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais - Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.3, p.239-244, 2003.

BASTOS, E. M. A. F. SILVEIRA, V. M. SOARES, A. E. E. Pollen spectrum of honey produced in Cerrado areas of Minas Gerais state (Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v.63, n.4, p.599-615, 2003.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.4, p.556-563, 2010.

BEEKEEPING PHOTOGRAPHY. **Fotos**, 2012. Disponível em: <[www.beekeeping.com](http://www.beekeeping.com)>. Acesso em: 02 fev 2012.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BIOLOGADOS. **Androceu**, 2015. Disponível em: <[http://www.biologados.com.br/botanica/taxonomia\\_vegetal/flor\\_angiosperma\\_androceu\\_estame\\_conectivo\\_antera\\_filete.htm](http://www.biologados.com.br/botanica/taxonomia_vegetal/flor_angiosperma_androceu_estame_conectivo_antera_filete.htm)>. Acesso em: 08 ago. 2015.

BOGDANOV, S. **The bee pollen book: chapter 1**, 2012a. Disponível em: <[www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net)>. Acesso em: 15 fev. 2013.

BOGDANOV, S. **The bee pollen book: chapter 2**, 2012b. Disponível em: <[www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net)>. Acesso em: 15 fev. 2013.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P. **Honey authenticity: a review**. Switzerland: Swiss Bee Research Centre, 2002. 20 p.

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. São Paulo, 2006. 178p. Tese de Doutorado - Faculdade de Nutrição - Universidade de São Paulo.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. O Presidente da República aprova o novo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 jul. 1952. Seção 1, p.10.785.

BRASIL. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001(a). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 2001. Seção 1, p.18.

BRASIL. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 set. 1997. Seção 1, p.19.697

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001(b). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, n.7, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p.45.

BRASIL. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da União**, n.219, Brasília, 13 nov. 2012. Seção 1, p.122

BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. **Diário Oficial da União**, n.184, Brasília, 23 set. 2005. Seção 1, p.372.

CABRERA, C.; MONTENEGRO, G. Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.40, n.1, p.223-230, 2013.

CAMARGO, R.C.R. **Boas práticas de manipulação na colheita de mel**, Teresina: EMBRAPA, 2002, 3p.

CAMARGO, R.C.R.; RÊGO, J.G.S.; LOPES, M.T.R.; PEREIRA, F.M. **Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado**, 2003. Disponível em: <[www.infoteca.cnptia.embrapa.br](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br)>. Acesso em: 08 jun. 2013.

CAMPOS, M.G.R. Flavonoides. In: CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Benkian, 2009. cap.13. p.237-289.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CAMPOS, M.G.R.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.3, p.742-745, 2003.

CARPES, S.T.; PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil, **Química Nova**, v.31, n.7, p.1660-1664, 2008.

CARPES, S.T.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.3, p.220-229, 2009.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. **Annali dell' Istituto Superiore di Sanità**, v.41, n.1, p.7-16, 2005.

CASTELO-BRANCO. V.N.; TORRES, A.G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v.24, n.1, p.173-187, 2011.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e pratica**. Piracicaba: Agrônômica Ceres, 2005. 605p.

CBA. Confederação Brasileira de Apicultura. **Brasil apícola**, 2013. Disponível em: <[www.brasilapicola.com.br](http://www.brasilapicola.com.br)>. Acesso em: 25 mai. 2013.

CHANTARUDEE, A.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A.; CHANCHAO, C. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.45, p.1-12, 2012.

CHOI, E.M. Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. **Phytotherapy Research**, v.21, n.5, p.471-475, 2007.

COMISSÃO EUROPÉIA. **Resistência antimicrobiana**, 2015. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/health/antimicrobial\\_resistance/policy/index\\_pt.htm](http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/policy/index_pt.htm)>. Acesso em: 13 ago. 2015.

CORREA-OLIVEIRA, M.E.; FERREIRA, A.F.; PODEROSO, J.C.M.; LESSA, A.C.V.; ARAÚJO, E.D.; CARNELOSSI, M.A.G.; RIBEIRO, G.T. Atividade de água ( $A_w$ ) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do Estado do Sergipe. **Revista da Fapese**, v.4, n.2, p.27-36, 2008.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.3, p.231-237, 2013.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Ácidos fenólicos, fenóis e seus derivados. In: CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Benkian, 2009a. cap.11. p.217-235.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Antibióticos de origem natural, compostos semi-sintéticos e sintéticos com actividade antibacteriana e antibióticos citotóxicos. In: CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Benkian, 2009b. cap.34. p.608-642.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Compostos fenólicos: características e origem biossintética. In: CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Benkian, 2009c. cap.10. p.211-224.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Obtenção de moléculas com actividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento. In: CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Benkian, 2009d. cap.7. p.109-123.

DE-MELO, A.A.M. **Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango**

**resfriada.** Goiânia, 2010. 68p. Dissertação de Mestrado - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Goiás.

DE-MELO, A.A.M.; MATSUDA, A.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p.540-548, 2012.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products:** a biosynthetic approach. 3. ed. Wiltshire: Wiley, 2009. 539p.

DRUMOND, P.M. Serviço valoroso: quanto custa para a agricultura brasileira os serviços prestados pelos polinizadores naturais? **A Lavoura**, n.696, p.24-27, 2013.

ESTEVINHO, M.L.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A.P.; FEÁS, X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation, **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, n.2, p.429-435, 2012.

FANALI, C.; DUGO, L.; ROCCO, Nano-liquid chromatography in nutraceutical analysis: determination of polyphenols in bee pollen. **Journal of Chromatography A**, v.1313, n.25, p.270-274, 2013.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Crops**, 2015a. Disponível em: <[www.faostat3.fao.org](http://www.faostat3.fao.org)>. Acesso em: 15 mai. 2015.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Livestock Primary**, 2015b. Disponível em: <[www.faostat3.fao.org](http://www.faostat3.fao.org)>. Acesso em: 15 mai. 2015.

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K.; NŮŽKOVÁ, J.; KAČÁNIOVÁ, M.; MÁRIÁSSYOVÁ, M.; ROVNÁ, K.; STRIČÍK, M. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.48, n.2, p.133-138, 2013.

FEÁS, X.; VÁZQUEZ-TATO, M.P.; ESTEVINHO, L.; SEIJAS, J.A.; IGLESIAS, A. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v.17, n.7, p.8359-8377, 2012.

FEUERBACHER, E.; FEWELL, J.H.; ROBERTS, S.P.; SMITH, E.F.; HARRISON, J.F. Effects of load type (pollen or nectar) and load mass on hovering metabolic rate and mechanical power output in the honey bee *Apis mellifera*. **The Journal of Experimental Biology**, v.206, n.11, p.1855-1865, 2003.

FERREYRA, M.L.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v.3; p.1-15, 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 6.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 182p.

FRANZESE, C. **Incentivo à apicultura alia-se à defesa do meio ambiente**, 2005. Disponível em: <[http://www.innovacionlocal.org/files/019projeto\\_mandacaia.pdf](http://www.innovacionlocal.org/files/019projeto_mandacaia.pdf)>. Acesso em: 09 set. 2015.

FUENMAYOR, C.; ZULUAGA, C.; DÍAZ, C.; QUICAZÁN, M.; COSIO, M.; MANNINO, S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. **Revista MVZ Córdoba**, v.19, n.1, p.4003-4014, 2014.

FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; FILHO, H.G.; CURI, P.R.; GOMES DIERCKX, S.M.A.; FUNARI, A.R.M.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Composições Bromatológica e Mineral do Pólen Coletado por Abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.11, n.2, p. 88-93, 2003.

FBB. Fundação Banco do Brasil. **Apicultura: desenvolvimento regional sustentável**. Brasília: Banco do Brasil, 2010. 47p.

GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.1, p.1-9, 2005.

GRAIKOU, K.; KAPETA, S.; ALIGIANNIS, N.; SOTIROUDIS, G.; CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E.; CHINO, L. Chemical analysis of Greek pollen - antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. **Chemistry Central Journal**, v.5, n.33, p.1-9, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and Medicine**. 4.ed. New York: Oxford University Press Inc., 2007. 851p.

HAMALAINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- $\kappa$ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators of Inflammation**, v.2007, p.1-10, 2007.

HERVATIN, H.L. **Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola *in natura* e desidratado sob diferentes temperaturas.** Campinas, 2009. 99p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. **Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos,** 2011. Disponível em: <[www.fcf.usp.br](http://www.fcf.usp.br)>. Acesso em: 02 abr. 2011.

HUMAN, H.; NICOLSON, S.W. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). **Phytochemistry**, v.67, n.14, p.1486-1492, 2006.

IBD CERTIFICAÇÕES. **IBD orgânico e orgânico Brasil,** 2013. Disponível em: <[www.ibd.com.br](http://www.ibd.com.br)>. Acesso em: 24 abr. 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário.** Rio de Janeiro: IBGE, 2007. 777p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Contas nacionais trimestrais: indicadores de volume e valores correntes.** Brasília, DF: IBGE, 2015. 33p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE lança mapa de biomas do Brasil e o mapa de vegetação do Brasil, em comemoração ao dia mundial da biodiversidade,** 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 26 mai. 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de desenvolvimento sustentável.** Brasília, DF: IBGE, 2010. 443p.

IHC. International Honey Commission. **World network of honey and bee products science,** 2013. Disponível em: <[www.ihc-platform.net](http://www.ihc-platform.net)>. Acesso em: 23 mar. 2013.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. **Indicação geográfica,** 2011. Disponível em: <[www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)>. Acesso em: 20 mai. 2011.

KACÁNIOVÁ, M.; VUKOVIC, N.; CHLEBO, R.; HAŠČÍK, P.; ROVNÁ, K.; CUBON, J.; DŽUGAN, M.; PASTERNAKIEWICZ, A. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. **Archives of Biological Science**, v.64, n.3, p.927-934, 2012.

KETKAR, S.S.; RATHORE, A.S.; LOHIDASAN, S.; RAO, L.; PARADKAR, A.R.; MAHADIK, K.R. Investigation of the nutraceutical potential of monofloral Indian mustard bee pollen. **Journal of Integrative Medicine**, v.12, n.4, p.379-389, 2014.

KHANAM, S. **Pharmacognosy: general study of formation of secondary metabolites**, 2007. Disponível em: <<http://www.nsdlniscair.res.in/bitstream/123456789/718/1/corrected+General+study+on+formation+of+Secondary+metabolites.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2011.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAFMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-6, 2015.

KOSTIC, A.Z.; BARAC, M.B.; STANOJEVIC, S.P.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.M.; TESIC, Z.L.; SIKOPARIJA, B.; RADISIC, P.; PRETOVIC, M.; PESIC, M.B. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. **LWT - Food Science and Technology**, v.62, n.1, p.301-309, 2015.

LEBLANC, B.W.; DAVIS, O.K.; BOUE, S.; DELUCCA, A.; DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v.115, n.4, p.1299-1305, 2009.

LEVIN, A.S.S.; KOBATA, C.H.P.; LITVOC, M.N. Princípios do uso de antimicrobianos: perguntas e respostas. **Revista de Medicina**, v.93, n.2, p.63-68, 2014.

LINSKENS, H.F. JORDE, W. Pollen as food and medicine - a review. **Economic Botany**, v.51, n.1, p.78-87, 1997.

LOPES, J.; STANCIU, O.G.; CAMPOS, M.G.; ALMARAZ-ABARCA, N.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MARGHITAS, L.A. Bee pollen antioxidant activity - a review: achievements and further challenges. **Journal of Pharmacognosy**, v.2, n.2, p.25-38, 2011.

LUZ, C.F.P.; BACHA-JUNIOR, G.L.; FONSECA, R.L.S.; SOUSA, P.R. 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**, v.82, n.2, p.293-304, 2010.

MAGALHÃES, E.O. **Produção de pólen apícola**. Itabuna: Editora Magalhães, 2005. CD-ROOM.

MAIA, P.P.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Antimicrobianos em alimentos de origem vegetal - uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.16, n.1, p.49-64, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do RIISPOA: mel**, 2015. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/camaras\\_setoriais/Mel\\_e\\_produtos\\_apicolas/25RO/App\\_Riispoa\\_mel.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Mel_e_produtos_apicolas/25RO/App_Riispoa_mel.pdf)>. Acesso em: 06 ago. 2015.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MARCHINI, L.C.; SOUZA, B.A. Composição físico-química, qualidade e diversidade dos méis brasileiros de abelhas africanizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 16, Aracajú, 2006. **Anais eletrônicos**. Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura, 2006. 1 CR-ROM.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v.66, n.3, p.54-57, 2014.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A.M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLIR.; MURCIA, M.A. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, v.64, n.9, p.1412-1419, 2001.

MARTINS, M.C.T. **Pólen apícola brasileiro: valor nutritivo e funcional, qualidade e contaminantes inorgânicos**. Campinas, 2010. 236p. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.1, p.194-197, 2011.

MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. **Química Nova**, v.33, n3, p.514-518, 2010.

MELO, I.L.P.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.3, p.346-53, 2009.

MELO, N.R.; SOARES, N.F.F.; GONÇALVES, M.P.J.C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v.52, n.304, p.921-938, 2005.

MENEZES, J.D.S.; MACIEL, L.F.; MIRANDA, M.S.; DRUZIAN, J.I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.233-242, 2010.

MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA-NETO, J.A.A. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1057-1065, 2007.

MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA-NETO, J.A.A. Flora de importância polinífera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.1145-1153, 2011.

MODRO, A.F.H.; SILVA, I.C.; LUZ, C.F.P.; MESSAGE, D. Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n.2, p.281-285, 2009.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.5, p.1096-1101, 2011.

MORGANO, M.A.; MARTINS, M.C.T.; RABONATO, L.C.; MILANI, R.F.; YOTSUYANAGI, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, 727-736, 2012.

MORETI, A.C.C.C. **Pólen: alimento protéico para as abelhas, complemento alimentar para o homem**, 2006. Disponível em: <[www.iz.sp.gov.br](http://www.iz.sp.gov.br)>. Acesso em: 24 abr. 2011.

MORETI, A.C.C.C.; TEIXEIRA, E.W.; ALVEZ, M.L.T.M.F.; OLIVEIRA, K.C.L.S.; OTSUK, I.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Tamanho das cargas de pólen interceptadas em coletores mantidos em colméias de *Apis mellifera* africanizadas. **Mensagem Doce**, n.112, 2011.

NEGRÃO, A.F.; BOVI, T.S.; SOUZA, E.A.; STOIAN, M.M.; ORSI, R.O. Produção e classificação do pólen apícola coletado de abelhas *Apis mellifera* L. em Botucatu,

estado de São Paulo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 22, Botucatu, 2010. **Anais eletrônicos**. Botucatu: Universidade do Estado de São Paulo, 2010. Disponível em: <[www.prope.unesp.br/xxii\\_cic](http://www.prope.unesp.br/xxii_cic)>. Acesso em 22 fev. 2013.

NEGRÃO, A.F. **Efeito da sazonalidade no teor proteico e composição de aminoácidos no pólen apícola produzido em Botucatu, Estado de São Paulo**. Botucatu, 2014. 56p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

NEGRI, G.; TEIXEIRA, E.W.; ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P.; BORGUINI, R.G.; SALATINO, A. Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from Southeast Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.10, p.5516-5522, 2011.

NOGUEIRA, C.M.P. **Estudo do pólen apícola comercial**. Bragança, 2012. 62p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Bragança.

NOGUEIRA, C.; IGLESIAS, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.11173-11187, 2012.

NUTRACEUTICALS WORD. **Antioxidants: high expectations for a high quality of life**, 2004. Disponível em: <[www.nutraceuticalsworld.com](http://www.nutraceuticalsworld.com)>. Acesso em: 1 abr. 2011.

OLIVEIRA, S. **Estratégias na reprodução sexuada em animais e plantas**, 2008. Disponível em: <<http://e-porteflio.blogspot.com.br/2008/11/estrategias-na-reproducao-sexuada-em.html>>. Acesso em: 30 jul 2015.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, K.C.L.S.; MORIYA, M.; AZEDO, R.A.B.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; TEIXEIRA, E.W.; ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1099-1102, 2009.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n.2, p.255-265, 2011.

PARAMÁS, A.M.G.; BÁREZ, J.A.G.; MARCOS, C.C.; GARCÍA-VILLANOVA, R.J.; SÁNCHEZ, J.S. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). **Food Chemistry**, v.95, n.1, p.148-156, 2006.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FÉAS, X.; ESTEVINHO, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v.63, p.233-239, 2014.

PEREIRA, F.M.; FREITAS, B.M.; NETO, J.M.V.; LOPES, M.T.R.; BARBOSA, A.L.; CAMARGO, R.C.R. Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.1-7, 2006.

PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R. **O início da apicultura no Brasil**, 2011. Disponível em: <[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)>. Acesso em: 23 mai. 2013.

PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. **Produção de mel**, 2003. Disponível em: <[www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br](http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br)>. Acesso em: 15 mai. 2011.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PINTO, F.A.; CAMPOS, C.N.; BARRETO, L.M.R.C. Perfil físico-químico do pólen apícola produzido em Taubaté, Vale do Paraíba, sudeste do Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.20, n.1-2; p.1-6, 2012.

PINTO, D.S.; TOMAZ, A.C.A.; TAVARES, J.F.; TENÓRIO-SOUZA, F.H.; DIAS, C.S.; BRAZ-FILHO, R.; DA-CUNHA, E.V.L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.3, p.367-372, 2008.

PUIG-PEÑA, Y.; DEL-RISCO-RÍOS, C.A.; ÁLVAREZ-RIVERA, V.P.; LEIVA-CASTILLO, V.; GARCÍA-NENINGER, R. Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, v.43, n.1, p.23-27, 2012.

QIAN, W.L.; KHAN, Z.; WATSON, D.G.; FEARNLEY, J. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, n.1, p.78-83, 2008.

REDE GLOBO DE TELEVISÃO. **Pólen combate o envelhecimento e ajuda a recuperar energias**, 2010. Disponível em: <[www.g1.globo.com/globo-reporter](http://www.g1.globo.com/globo-reporter)>. Acesso em: 04 mai. 2011.

REINHARD, K.J.; HAMILTON, D.L.; HEVLY, R.H. Use of pollen concentration in palaeopharmacology: coprolite evidence in medical plants. **Journal of Ethnobiology**, v.11, p.117-132, 1991.

RODRIGUES, E. **Atividade antioxidante *in vitro* e perfil fenólico de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil**. Florianópolis, 2009. 86p. Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina.

SAAVEDRA, K.I.C.; ROJAS, C.I.; DELGADO, G.E.P. Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque – Perú). **Revista Chilena de Nutrición**, v.40, n.1, p.71-78, 2013.

SANTOS, L.O.; SILVEIRA, N.F.A.; LEITE, R.S.F.; BORGUINI, R.G. Avaliação microbiológica do pólen apícola comercializado no estado de São Paulo. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4, Campinas, 2010. **Anais eletrônicos**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2010. Disponível em: <[www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010](http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010)>. Acesso em: 23 mar. 2013.

SATTLER, J.A.G. **Quantificação das vitaminas antioxidantes E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A ( $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil**. São Paulo, 2013. 140p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SEAGRI. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Reforma Agrária, Pesca e Aquicultura. **Produção baiana de pólen terá maior valor agregado**, 2010. Disponível em: <<http://www4.seagri.ba.gov.br>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequena Empresa. **Indicação geográfica como diferencial competitivo**, 2009a. Disponível em: <[www.tecpar.br](http://www.tecpar.br)>. Acesso em: 20 mai. 2011.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequena Empresa. **Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia: sumário executivo**, 2007. Disponível em: <[www.sebrae.com.br](http://www.sebrae.com.br)>. Acesso em: 01 mai. 2011.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequena Empresa. **Manual de segurança e qualidade para Apicultura**, 2009b. Disponível em: <www.tecpar.br>. Acesso em: 23 mai. 2013.

SIMÕES, C.M.O.; GUERRA, M.P.; SCHENKEL, E.P.; ZANNIN, M.; MENTZ, L.A.; BORDIGNON, S.A.L.; IRGANG, B. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 959p.

SILVA, S.A.S. **Biossíntese de produtos naturais**, 2009. Disponível em: <<http://dc142.4shared.com/doc/MIB5vmJd/preview.html>>. Acesso em: 11 nov. 2011.

SILVA, M.B.L. **Diagnóstico do sistema de produção e qualidade do mel de Apis Mellifera**. Viçosa, 2007. 97p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, R.C.P.A.; PEIXE, B.C.S. Estudo da cadeia produtiva do mel no contexto da apicultura paranaense: uma Contribuição para a Identificação de Políticas Públicas Prioritárias. In: SEMINÁRIO DE POLÍTICAS PÚBLICAS NO PARANÁ, 1, Curitiba, 2008. **Anais eletrônicos**. Curitiba: Escola de Governo do Paraná, 2008. Disponível em: <[www.escoladegoverno.pr.gov.br](http://www.escoladegoverno.pr.gov.br)>. Acesso em: 22 mai. 2013.

SILVEIRA, T.A. **Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental**. Piracicaba, 2012. 67p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P.; CARVALHO, C.A.L. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1139-1144, 2007.

SOUZA, B.R. **Quantificação das vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) e vitâmeros das vitaminas B<sub>3</sub> e B<sub>6</sub> em amostras de pólen apícola desidratado provenientes da Região Sul do Brasil**. São Paulo, 2014. 125p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SZCZESNA, T. Long-chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. **Journal of Apicultural Science**, v.50, n.2, p.81-90, 2006a.

SZCZESNA, T. Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins. **Journal of Apicultural Science**, v.50, n.2, p.81-90, 2006b.

SZCZESNA, T.; RYBAK-CHIMIELEWSKA, H; BORNUS, L. Effect of storage on variation of contents vitamin c and a in pollen collected bees. **Apiacta**, v.2, p.1-3, 1991.

TOLEDO, V.A.A.; CHAMBÓ, E.D.; HALAK, A.L.; FAQUINELLO, P.; PARPINELLI, R.S.; OSTROWSKI, K.R.; CASAGRANDE, A.P.B.; RUVOLOTAKASUSUKI, M.C.C. Biologia floral e polinização em girassol (*Helianthus annuus* L.) por abelhas africanizadas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.5-17, 2011.

TOMEI, R.R.; SALVADOR, M.J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 7, São José dos Campos, 2007. **Anais eletrônicos**. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2007. Disponível em: <[www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2007](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007)>. Acesso em: 20 abr. 2012.

UNICAMP. Universidade Estadual De Campinas. **Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO**, 2006. Disponível em: <[www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco)>. Acesso em: 13 mai. 2013.

USDA. United States Department of Agriculture. **Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods: release 2**, 2010. Disponível em: <[www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov)>. Acesso em: 03 jan. 2013.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v.7, n.1; p.65-74, 2009.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V., BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VIT, P.; SANTIAGO, B. Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos. **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**, v.58, n.4, p.411-415, 2008.

VOLTARELLI, J.C. Febre e inflamação. **Medicina**, v.27, n.1/2, p.7-48, 1994.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n.6., p.1060-1066, 2008.

ZÁRATE, R. Plant secondary metabolism engineering: methods, strategies, advances, and omics. In: MANDER, L.; LIU, H.W. **Comprehensive natural products II: Chemistry and Biology**. Kidlington: Elsevier, 2011. cap.18, p. 629-668. (Volume 3).

# CAPÍTULO 2

## AVALIAÇÃO PALINOLÓGICA DE PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO PRODUZIDO EM NOVE ESTADOS BRASILEIROS

### RESUMO

O pólen apícola é a principal fonte de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais da colmeia. Cada carga de pólen apícola é composta por milhares de grãos de pólen coletados pelas abelhas de uma ou mais espécies de plantas. O objetivo do presente estudo foi identificar e classificar os tipos polínicos em 69 amostras de pólen apícola desidratado, coletadas em nove Estados brasileiros, a fim de determinar as fontes poliníferas utilizadas pelas abelhas. As amostras foram tratadas com etanol a 70% e solução de água destilada:glicerina (1:1) e o sedimento analisado em microscópio fotônico para identificação e contagem dos tipos polínicos. Foram identificados 39 táxons, sendo a espécie *Cocos nucifera* a de maior ocorrência, e 27 amostras (39,1%) foram classificadas como monoflorais. Os resultados deste estudo servirão para auxiliar os produtores no manejo dos apiários, bem como na preservação de espécies que, comprovadamente, servem de fonte polinífera para as abelhas *Apis mellifera*.

**Palavras-chave:** pólen apícola desidratado; grãos de pólen; análise polínica; origem botânica.

### ABSTRACT

Bee-pollen is the primary source of proteins, lipids, vitamins and minerals for the hive. Each bee-pollen load is composed of thousands of pollen grains collected by bees from one or more species of plants. The purpose of this study was to identify and classify the pollen types in 69 dehydrated bee-pollen samples collected in nine Brazilian states in order to determine the pollen sources used by bees. The samples were treated with 70% ethanol and distilled water:glycerin solution (1:1), then the sediment were examined under a photonic microscope for identification and counting of the pollen types. 39 taxa were identified and *Cocos nucifera* species was the most frequent, and 27 samples (39.1%) were classified as monofloral. These results will be

used to help beekeepers in the management of the apiaries and the preservation of species that are proven to serve as pollen source for *Apis mellifera* bees.

**Keywords:** dehydrated bee-pollen; pollen grains; pollen analysis; botanical origin.

## 1 INTRODUÇÃO

A apicultura é uma atividade agropecuária que atende aos requisitos do tripé da sustentabilidade, visto que é economicamente viável, socialmente justa e ambientalmente favorável (ALMEIDA; CARVALHO, 2009). As abelhas coletam, das flores, a matéria-prima para produção de seus alimentos: o néctar, para elaboração de mel; e o pólen, que será utilizado para formar o pólen apícola (PEREIRA *et al.*, 2003). Durante a coleta, também chamada de forrageamento, estes insetos atuam como agentes polinizadores, pois transferem grãos de pólen (que contém o gametófito masculino) das anteras para o estigma das flores (parte receptiva do órgão feminino), ocorrendo a fecundação. As abelhas desempenham, portanto, um importante papel na reprodução das plantas floríferas e, conseqüentemente, na manutenção da biodiversidade (SANTOS; RIBEIRO, 2009).

O pólen apícola é a principal fonte de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais da colmeia (BOGDANOV, 2012). É o resultado da aglutinação de milhares de grãos de pólen colhidos pelos insetos, que utilizam suas secreções salivares e néctar para unir os grãos (CAMPOS *et al.*, 2008; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015). Para produzir uma única carga de pólen apícola, as abelhas operárias visitam centenas de flores numa altura de até 30 m e em um raio de, em média, 500 m em volta do apiário, embora o raio de ação das abelhas seja de até 10 km (máximo de 3 km para uma coleta produtiva) (PEREIRA *et al.*, 2003; MODRO *et al.*, 2011; BOGDANOV, 2012).

A coleta dos grãos de pólen pelas abelhas é influenciada por um conjunto de fatores: a anatomia da planta, que favorece ou não o acesso do inseto ao grão; a disponibilidade e abundância de florada; a quantidade de grãos em uma única flor; a preferência da abelha por cada espécie vegetal, que pode estar relacionada ao valor nutricional do grão; a presença de insetos competidores; e, como mencionado anteriormente, a distância entre a fonte polinífera e a colméia (CARVALHO;

MARCHINI; ROS, 1999; BARTH, 2004; LUZ *et al.*, 2010; SILVEIRA, 2012). As plantas poliníferas podem ser classificadas como fontes preferenciais, alternativas ou casuais para as abelhas (MODRO *et al.*, 2011).

As plantas forrageadas pelas abelhas para produção do pólen apícola podem ser identificadas pela análise morfológica e estrutural dos grãos de pólen que formam as cargas polínicas (ALVES *et al.*, 2006; BARTH *et al.*, 2010; ISMAIL *et al.*, 2013). Esta é uma análise eficiente para a diferenciação de amostras produzidas em diferentes regiões e condições climáticas (FÉAS *et al.*, 2012). Este conhecimento é especialmente importante para os apicultores no sentido de apontar as fontes de pólen disponíveis e/ou preferíveis pelas abelhas ao longo do ano (BARTH, 2004; MODRO *et al.*, 2011), o que permite preservar e cultivar espécies de importância para as abelhas, organizar o deslocamento de apiários migratórios para locais com floração ou, ainda, prever os períodos em que será necessário oferecer suplementação para as colmeias (MODRO *et al.*, 2011).

Aos pesquisadores, o resultado da análise polínica possibilita comparações entre origem botânica e propriedades físicas, químicas e biológicas do pólen apícola, além de fornecer dados a respeito da vegetação que circunda o apiário, sendo um possível indicador de mudanças na prevalência das espécies vegetais e, também, da introdução de espécies exóticas (CAMPOS *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2012).

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi identificar os tipos polínicos e classificar como monoflorais ou heteroflorais, 69 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros, a fim de sugerir as fontes poliníferas utilizadas pelas abelhas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

Foram adquiridas de apicultores, entrepostos ou comércio, 69 amostras de pólen apícola de abelhas *Apis mellifera*, já desidratadas e prontas para o consumo, entre os meses de novembro de 2011 e dezembro de 2013. As amostras foram produzidas em 28 apiários, localizados em nove Estados brasileiros, recebidas no

Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, e codificadas (letra: produtor/entrepósito, número: lote) (Tabela 1). Em seguida, foram enviadas, à temperatura ambiente, ao Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, onde foram armazenadas. As análises foram realizadas em parceria com os pesquisadores Dra Ortrud Monika Barth e Alex da Silva de Freitas.

**Tabela 1.** Código, origem e data de coleta das 69 amostras de pólen apícola desidratado adquiridas em nove Estados brasileiros.

<b>Amostra*</b>	<b>Origem/Estado</b>	<b>Data de Coleta</b>
A1	Sergipe	12 a 20/04/12
A2	Sergipe	21/04 a 11/05/12
B1	Bahia	10/05/12
C1	Rio Grande do Sul	05/05/12
C2	Rio Grande do Sul	28/06/12
C3	Rio Grande do Sul	28/07/12
D1	São Paulo	abr/12
D2	São Paulo	abr/12
D3	São Paulo	set/12
D4	São Paulo	set/12
D5	São Paulo	set/12
E1	Bahia	01/08/12
E2	Bahia	19/06/12
E3	Bahia	16/09/12
E4	Bahia	06/10/12
E5	Bahia	12/08/12
E6	Bahia	23/09/12
E7	Bahia	23/07/12
F1	Rio Grande do Norte	nov-dez/11
F2	Rio Grande do Norte	25/09/12
G1	São Paulo	03/09/12
G2	São Paulo	18/09/12
G3	São Paulo	03/10/12
G4	São Paulo	16/10/12
G5	São Paulo	16/10 a 25/10/12
G6	São Paulo	25/10 a 08/11/12
G7	São Paulo	14/11 a 19/11/12
G8	São Paulo	20/11 a 04/12/12
G9	São Paulo	06/12 a 13/12/12
G10	São Paulo	08/01 a 15/01/13
G11	São Paulo	18/01 a 25/01/13
H1	Paraná	14/09/12
I1	Bahia	21/06/12
I2	Bahia	18/09/12
J1	Santa Catarina	set/12
K1	Rio Grande do Sul	05/10/12
K2	Rio Grande do Sul	25/10/12
K3	Rio Grande do Sul	15/11/12
K4	Rio Grande do Sul	05/12/12
L1	Rio Grande do Sul	15/10 a 30/10/12
L2	Rio Grande do Sul	01/11 a 20/11/12

(Continua)

**Tabela 1.** Continuação...

<b>Amostra*</b>	<b>Origem/Estado</b>	<b>Data de Coleta</b>
L3	Rio Grande do Sul	25/11 a 10/12/12
M1	Bahia	28/11/12
M2	Bahia	11/02/13
N1	Santa Catarina	2011
O1	Mato Grosso	2012
P1	Mato Grosso	set/2013
Q1	Bahia	26/04 a 04/05/13
R1	Bahia	25/04 a 01/05/13
S1	São Paulo	ago-set/12
S2	São Paulo	01/05 a 26/05/13
S3	São Paulo	27/05 a 07/06/13
S4	São Paulo	11/06 a 07/07/13
S5	São Paulo	08/07 a 04/08/13
S6	São Paulo	05/08 a 29/08/13
S7	São Paulo	30/08 a 15/09/13
T1	Rio Grande do Norte	01/10/12
U1	Rio Grande do Norte	05/10/12
V1	Bahia	jun/13
X1	Bahia	jun/13
Z1	Mato Grosso do Sul	05/09/13
AA1	Paraná	mai/13
AA2	Paraná	dez/13
AB1	Lapa/PR	nov/13
AC1	São Paulo	set/13
AC2	São Paulo	nov/13
AC3	São Paulo	dez/13
AD1	São Paulo	dez/12
AD2	São Paulo	jun/13

\*Letras iguais: indicam mesmo produtor/entreposto. Números: indicam lote.

## 2.2 ANÁLISE POLÍNICA

### 2.2.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas conforme método descrito por Barth *et al.* (2010). 2 g de cada amostra (cerca de 300 bolotas de pólen apícola) foram misturadas com etanol a 70% (volume final: 13 mL) e a mistura deixada em repouso por 30 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a ultrassom por 5 min. Ao sedimento obtido após centrifugação (2500 rpm; 15 min) foi adicionado etanol a 70% e feita uma nova homogeneização (ultrassom; 5 min). Após esta etapa, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Uma solução de água destilada:glicerina (1:1) foi adicionada ao sedimento até um volume final de 5 mL. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 30 min.

### 2.2.2 Preparo das lâminas para microscopia

Uma gota do sedimento das amostras foi transferida para uma lâmina de microscopia e coberta com uma lamínula (22 x 22 mm). A lamínula foi vedada com esmalte e identificada para posterior observação em microscópio de luz fotônica (BARTH *et al.*, 2010).

### 2.2.3 Identificação e contagem dos tipos polínicos e classificação das amostras

Os tipos polínicos foram identificados por comparação com informações já catalogadas e designados pelo táxon ao qual se assemelhavam (BARTH, 1970a; BARTH, 1970b; BARTH, 1970c; BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002). Pelo menos 500 grãos foram contados para o cálculo das percentagens de cada tipo polínico na amostra e classificados conforme as classes de frequência em: pólen predominante (PP, >45%), pólen acessório (PA, 15-45%) e pólen isolado importante (PI, 3-15%). Tipos polínicos com frequência inferior a 3% não foram considerados. As amostras foram classificadas como monoflorais quando apresentaram acima de 90% de um mesmo tipo polínico ou 60% ou mais de um tipo polínico sem a ocorrência de pólen acessório. Se não monoflorais, as amostras foram classificadas como heteroflorais (BARTH *et al.*, 2010).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram identificados 39 tipos polínicos, que pertencem a 19 famílias botânicas (Tabela 2). Mimosaceae, Arecaceae e Asteraceae foram as famílias com maior número de táxons nas amostras. Os tipos polínicos foram identificados em nível de espécie, gênero ou família e classificados conforme a frequência, o que permitiu nomear as amostras conforme a origem botânica predominante.

Dentre as 69 amostras, 27 (39,1%) foram classificadas como monoflorais: todas aquelas coletadas em Sergipe (A1, A2), Mato Grosso (O1, P1) e Santa Catarina (J1, N1), 50% das amostras do Rio Grande do Sul (C1, C2, K2, L2, L3),

50% das coletas no Rio Grande do Norte (F1, F2), 43,8% das amostras coletadas na Bahia (E3, E7, I2, M1, M2, Q1, V1) e 25% das amostras de São Paulo (G3, G5, S3, S4, S6, S7, AC1) (Tabela 3). O tipo polínico que mais predominou nas amostras monoflorais foi o gênero *Brassica* (4 amostras), seguido dos gêneros *Myrcia*, *Alternanthera* e das espécies *Cocos nucifera* e *Mimosa scabrella* que foram, cada um, pólen predominante (PP) em 3 amostras. 14 produtos foram classificados como monoflorais por apresentarem acima de 90% de um único tipo polínico (A1, A2: *Mimosa caesalpiniaefolia*, I2, Q1: *Cocos nucifera*, J1, P1, T1: *Mimosa scabrella*, L2, L3: *Myrcia*, N1: *Brassica*, S3, S4, S6: *Alternanthera*, S7: *Anadenanthera*. As abelhas africanizadas tendem a ser seletivas e podem concentrar-se na exploração de plantas que se encontrem agrupadas e em alta densidade (LORENZON; MATRANGOLO; SCHOEREDER, 2003).

**Tabela 2.** Família de vegetal a qual pertencem as espécies e os gêneros identificados em 69 amostras de pólen apícola desidratado adquiridas em nove Estados brasileiros.

<b>Família</b>	<b>Gênero/Espécie (nome popular)</b>
Aquifoliaceae	<i>Ilex</i>
Amaranthaceae	<i>Alternanthera</i> (quebra-panela)
Anacardiaceae	<i>Astronium</i> , <i>Schinus</i> (aroeiras)
Apiaceae	(bamburral, hortelã, menta)
Arecaceae	<i>Astrocaryum</i> , <i>Cocos nucifera</i> (coco-da-baía, coqueiro); <i>Syagrus</i> (geribá)
Asteraceae	<i>Baccharis</i> , <i>Elephantopus</i> , <i>Eupatorium</i> , <i>Montanoa</i> , <i>Vernonia</i>
Brassicaceae	<i>Brassica</i> (mostarda)
Cecropiaceae	<i>Cecropia</i> (embaúba)
Cyperaceae	(tiriricas)
Euphorbiaceae	<i>Ricinus</i> (mamona), <i>Sebastiania</i> (sebastiania)
Fabaceae	<i>Machaerium</i>
Loranthaceae	(erva-de-passarinha)
Malvaceae	(malva, hibisco, relógio)
Melastomataceae	(quaresmeiras)
Mimosaceae	<i>Anadenanthera</i> , <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo), <i>Mimosa scabrella</i> (bracatinga), <i>Mimosa verrucosa</i> (jurema-mansa, jurema-branca)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> (eucalipto), <i>Myrcia</i> (murta)
Piperaceae	<i>Piper</i> (caapeba)
Poaceae	(gramíneas)
Polygonaceae	<i>Antigonon</i>
Rubiaceae	<i>Coffea</i> (cafeeiro), <i>Richardia</i> (ipepacuanha)

**Tabela 3.** Percentagem dos tipos polínicos e origem botânica predominante em 69 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros.

<b>Amostra/ Origem</b>	<b>Tipos Polínicos e Frequência<sup>1</sup></b>	<b>Origem Botânica Predominante<sup>2</sup></b>
A1 Sergipe	<b>PP:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (95,5%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (3,5%)	Amostra monofloral de <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>
A2 Sergipe	<b>PP:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (96,3%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (3,7%)	Amostra monofloral de <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>
B1 Bahia	<b>PP:</b> <i>Cocos nucifera</i> (59,9%); <b>PA:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (21,0%); <b>PI:</b> <i>Eucalyptus</i> (14,2%); Asteraceae (3,8%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Cocos nucifera</i> , <i>Mimosa scabrella</i> e <i>Eucalyptus</i>
C1 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Brassica</i> (84,6%); <b>PI:</b> Asteraceae (11,7%); <i>Eucalyptus</i> (3,4%)	Amostra monofloral de <i>Brassica</i>
C2 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Brassica</i> (87,2%) <b>PI:</b> (10,5%)	Amostra monofloral de <i>Brassica</i>
C3 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Brassica</i> (67,6%); <b>PA:</b> <i>Eucalyptus</i> (18,0%); <b>PI:</b> Asteraceae (12,0%)	Amostra heterofloral com boa contribuição de <i>Brassica</i> e <i>Eucalyptus</i>
D1 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Eucalyptus</i> (53,8%); <b>PA:</b> Asteraceae (30,0%); <b>PI:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (11,5%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eucalyptus</i> e Asteraceae/Linguliflora
D2 São Paulo	<b>PA:</b> <i>Eucalyptus</i> (43,9%); Asteraceae (34,9%); <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (16,6%); <b>PI:</b> Indeterminado (3,1%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eucalyptus</i> e Asteraceae/Linguliflora
D3 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Eupatorium</i> (57,3%); <b>PA:</b> <i>Elephantopus</i> (27,7%); <b>PI:</b> <i>Eucalyptus</i> (4,9%), Piper (5,9%), Cyperaceae (3,2%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eupatorium</i> e <i>Elephantopus</i>
D4 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Eupatorium</i> (46%); <b>PA:</b> Piper (32,1%), <i>Elephantopus</i> (17,7%); <b>PI:</b> Anacardiaceae (3,2%).	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eupatorium</i> e Piper
D5 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Eupatorium</i> (57,6%); <b>PA:</b> Piper (30,3%); <b>PI:</b> <i>Elephantopus</i> (7,8%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eupatorium</i> e Piper
E1 Bahia	<b>PP:</b> <i>Cocos nucifera</i> (56,7%); <b>PA:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (20,6%); <i>Eucalyptus</i> (15,5%); <b>PI:</b> Indeterminado (3,3%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Cocos nucifera</i> , <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> e <i>Eucalyptus</i>
E2 Bahia	<b>PP:</b> <i>Eucalyptus</i> (63,4%); <b>PA:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (25,8%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (3,0%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eucalyptus</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>

(Continua)

Tabela 3. Continuação...

Amostra/ Origem	Tipos Polínicos e Frequência <sup>1</sup>	Origem Botânica Predominante <sup>2</sup>
E3 Bahia	<b>PP:</b> <i>Eucalyptus</i> (86,5%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (7,5%), <i>Eupatorium</i> (3,7%)	Amostra monofloral de <i>Eucalyptus</i>
E4 Bahia	<b>PP:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (55,4%); <b>PA:</b> <i>Eucalyptus</i> (35,6%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (4,5%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> e <i>Eucalyptus</i>
E5 Bahia	<b>PP:</b> <i>Eucalyptus</i> (57,2%); <b>PA:</b> <i>Coffea</i> (24,4%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (7,6%), <i>Asteraceae</i> (7,6%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eucalyptus</i> e <i>Coffea</i>
E6 Bahia	<b>PP:</b> <i>Coffea</i> (49,9%); <b>PA:</b> <i>Cocos nucifera</i> (22,4%); <b>PI:</b> <i>Eupatorium</i> (11,2%), <i>Myrcia</i> (4,9%), <i>Poaceae</i> (3,7%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Coffea</i> e <i>Cocos nucifera</i>
E7 Bahia	<b>PP:</b> <i>Rubiaceae</i> (77,9%); <b>PI:</b> <i>Eucalyptus</i> (11,2%), <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (10,6%), <i>Cocos nucifera</i> (8,4%)	Amostra monofloral de <i>Rubiaceae</i>
F1 Rio Grande do Norte	<b>PP:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (61,6%); <b>PA:</b> <i>Cocos nucifera</i> (34,3%); <b>PI:</b> <i>Eucalyptus</i> (3,0%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Mimosa scabrella</i> e <i>Cocos nucifera</i>
F2 Rio Grande do Norte	<b>PP:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (79,7%); <b>PA:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (15,6%); <b>PI:</b> <i>Mimosa verrucosa</i> (4,3%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Mimosa scabrella</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>
G1 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Syagrus</i> (62,8%); <b>PI:</b> <i>Eupatorium</i> (13,5%), <i>Myrcia</i> (10,8%); <i>Cecropia</i> (9,9%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Syagrus</i> e <i>Eupatorium</i>
G2 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Syagrus</i> (63,6%); <b>PA:</b> <i>Fabaceae</i> (21,5%); <b>PI:</b> <i>Vernonia</i> (5,1%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Syagrus</i> e <i>Fabaceae</i>
G3 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Astrocaryum</i> (66,0%); <b>PI:</b> <i>Ilex</i> (13,0%), <i>Vernonia</i> (10,1%)	Amostra monofloral de <i>Astrocaryum</i>
G4 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Eupatorium</i> (50,3%); <b>PA:</b> <i>Syagrus</i> (41,0%); <b>PI:</b> <i>Vernonia</i> (6,3%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eupatorium</i> e <i>Syagrus</i>
G5 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Myrcia</i> (66,4%); <b>PI:</b> <i>Ilex</i> (13,3%), <i>Syagrus</i> (13,3%), <i>Cecropia</i> (6,0%)	Amostra monofloral de <i>Myrcia</i>
G6 São Paulo	<b>PA:</b> <i>Piper</i> (39,0%), <i>Cecropia</i> (27,1%); <b>PI:</b> <i>Myrcia</i> (14,1%), <i>Schinus</i> (12,8%), <i>Syagrus</i> (3,7%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Piper</i> e <i>Cecropia</i>

(Continua)

Tabela 3. Continuação...

Amostra/ Origem	Tipos Polínicos e Frequência <sup>1</sup>	Origem Botânica Predominante <sup>2</sup>
G7 São Paulo	<b>PA:</b> <i>Piper</i> (38,6%), <i>Astrocaryum</i> (34,7%); <b>PI:</b> <i>Cecropia</i> (14,5%), <i>Ilex</i> (5,8%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Piper</i> e <i>Astrocaryum</i>
G8 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Cecropia</i> (50,9%); <b>PA:</b> <i>Myrcia</i> (30,3%); <b>PI:</b> <i>Piper</i> (12,9%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Cecropia</i> e <i>Myrcia</i>
G9 São Paulo	<b>PP:</b> Arecaceae (74,2%); <b>PA:</b> <i>Cecropia</i> (18,8%)	Amostra heterofloral com boa participação de Arecaceae e <i>Cecropia</i>
G10 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Cocos nucifera</i> (68%); <b>PA:</b> <i>Cecropia</i> (15,3%), <b>PI:</b> <i>Myrcia</i> (8,8%), <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (4,3%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Cocos nucifera</i> e <i>Cecropia</i>
G11 São Paulo	<b>PA:</b> Arecaceae (37,9%), <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (29,7%), <i>Cecropia</i> (18,5%)	Amostra heterofloral com boa participação de Arecaceae, <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> e <i>Cecropia</i>
H1 Paraná	<b>PP:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (63,5%); <b>PA:</b> <i>Brassica</i> (36,5%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Mimosa scabrella</i> e <i>Brassica</i>
I1 Bahia	<b>PA:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (29,1%), Arecaceae (26,4%), <i>Cecropia</i> (19,1%); <b>PI:</b> Indeterminado (11,8%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> , Arecaceae e <i>Cecropia</i>
I2 Bahia	<b>PP:</b> <i>Cocos nucifera</i> (97,5%)	Amostra monofloral de <i>Cocos nucifera</i>
J1 Santa Catarina	<b>PP:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (95,5%)	Amostra monofloral de <i>Mimosa scabrella</i>
K1 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Anadenanthera</i> (56,3%); <b>PA:</b> <i>Eucalyptus</i> (28,6%), <i>Cecropia</i> (11%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Anadenanthera</i> e <i>Eucalyptus</i>
K2 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Anadenanthera</i> (89,9%); <b>PI:</b> <i>Sebastiania</i> (6,9%), Asteraceae (3,2%)	Amostra monofloral de <i>Anadenanthera</i>
K3 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Anadenanthera</i> (64,7%); <b>PA:</b> <i>Cecropia</i> (17%); <b>PI:</b> <i>Sebastiania</i> (14,6%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Anadenanthera</i> , <i>Cecropia</i> e <i>Sebastiania</i>
K4 Rio Grande do Sul	<b>PA:</b> <i>Cecropia</i> (27,2%), <i>Anadenanthera</i> (25,4%), <i>Sebastiania</i> (18,5%), <i>Eucalyptus</i> (12,3%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Cecropia</i> , <i>Anadenanthera</i> , <i>Sebastiania</i> e <i>Eucalyptus</i>
L1 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Schinus</i> (46%); <b>PA:</b> <i>Ilex</i> (34,8%); <b>PI:</b> Asteraceae (11,7%), <i>Myrcia</i> (6,2%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Schinus</i> e <i>Ilex</i>

(Continua)

Tabela 3. Continuação...

<b>Amostra/ Origem</b>	<b>Tipos Polínicos e Frequência<sup>1</sup></b>	<b>Origem Botânica Predominante<sup>2</sup></b>
L2 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Myrcia</i> (99,5%)	Amostra monofloral de <i>Myrcia</i>
L3 Rio Grande do Sul	<b>PP:</b> <i>Myrcia</i> (92,5%); <b>PI:</b> <i>Eupatorium</i> (6,0%)	Amostra monofloral de <i>Myrcia</i>
M1 Bahia	<b>PP:</b> <i>Astrocaryum</i> (71,9%); <b>PI:</b> <i>Astronium</i> (13,4%), <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (7,3%), <i>Mimosa verrucosa</i> (6,1%)	Amostra monofloral de <i>Astrocaryum</i>
M2 Bahia	<b>PP:</b> Fabaceae (89,2%); <b>PI:</b> Myrtaceae (3,8%), Indeterminado (3,8%)	Amostra monofloral de Fabaceae
N1 Santa Catarina	<b>PP:</b> <i>Brassica</i> (91,3%); <b>PI:</b> <i>Montanoa</i> (5,4%).	Amostra monofloral de <i>Brassica</i>
O1 Mato Grosso	<b>PP:</b> <i>Brassica</i> (87,3%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (5,3%), Asteraceae (4%)	Amostra monofloral de <i>Brassica</i>
P1 Mato Grosso	<b>PP:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (100%)	Amostra monofloral de <i>Mimosa scabrella</i>
Q1 Bahia	<b>PP:</b> <i>Cocos nucifera</i> (91,7%); <b>PI:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (6,1%)	Amostra monofloral de <i>Cocos nucifera</i>
R1 Bahia	<b>PA:</b> <i>Eucalyptus</i> (36,2%), <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (36,2%), <i>Cocos nucifera</i> (27,6%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Eucalyptus</i> , <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> e <i>Cocos nucifera</i>
S1 São Paulo	<b>PA:</b> <i>Anadenanthera</i> (40,5%), <i>Cocos nucifera</i> (36,5%); <b>PI:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (13,5%), Malvaceae (8,1%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Anadenanthera</i> e <i>Cocos nucifera</i>
S2 São Paulo	<b>PA:</b> <i>Alternanthera</i> (43,2%), <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (29,6%); <b>PI:</b> <i>Ricinus</i> (13,5%), Asteraceae (4,9%), Poaceae (3,9%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Alternanthera</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> e <i>Ricinus</i>
S3 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Alternanthera</i> (93,3%)	Amostra monofloral de <i>Alternanthera</i>
S4 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Alternanthera</i> (94,2%)	Amostra monofloral de <i>Alternanthera</i>
S5 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Alternanthera</i> (78,9%); <b>PA:</b> <i>Vernonia</i> (18,7%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Alternanthera</i> e <i>Vernonia</i>

(Continua)

Tabela 3. Continuação...

Amostra/ Origem	Tipos Polínicos e Frequência <sup>1</sup>	Origem Botânica Predominante <sup>2</sup>
S6 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Alternanthera</i> (94%); <b>PI:</b> <i>Montanoa</i> (3,4%)	Amostra monofloral de <i>Alternanthera</i>
S7 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Anadenanthera</i> (95%); <b>PI:</b> <i>Schinus</i> (3,4%)	Amostra monofloral de <i>Anadenanthera</i>
T1 Rio Grande do Norte	<b>PP:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (98,7%)	Amostra monofloral de <i>Mimosa scabrella</i>
U1 Rio Grande do Norte	<b>PP:</b> <i>Mimosa verrucosa</i> (84,3%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (10,5%), <i>Richardia</i> (3,4%)	Amostra monofloral de <i>Mimosa verrucosa</i>
V1 Bahia	<b>PP:</b> <i>Cocos nucifera</i> (86,5%); <b>PI:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (12,4%)	Amostra monofloral de <i>Cocos nucifera</i>
X1 Bahia	<b>PP:</b> <i>Cocos nucifera</i> (65,7%); <b>PA:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (20,9%); <b>PI:</b> Asteraceae (7,5%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Cocos nucifera</i> e <i>Mimosa scabrella</i>
Z1 Mato Grosso do Sul	<b>PP:</b> Fabaceae (57,2%); <b>PA:</b> <i>Anadenanthera</i> (28,6%); <b>PI:</b> Melastomataceae (5%), <i>Ricinus</i> (5%), <i>Cecropia</i> (3,7%)	Amostra heterofloral com boa participação de Fabaceae e <i>Anadenanthera</i>
AA1 Paraná	<b>PP:</b> <i>Mimosa scabrella</i> (53,8%); <b>PA:</b> Asteraceae (17,5%); <b>PI:</b> Arecaceae (9,4%), <i>Myrcia</i> (5,4%), Poaceae (5,4%), Fabaceae (5,4%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Mimosa scabrella</i> e Asteraceae
AA2 Paraná	<b>PA:</b> Anacardiaceae (30,4%), Fabaceae (29,7%), <i>Mimosa verrucosa</i> (20,3%) <b>PI:</b> Loranthaceae (12,5%)	Amostra heterofloral com boa participação de Anacardiaceae, Fabaceae e <i>Mimosa verrucosa</i>
AB1 Paraná	<b>PP:</b> <i>Myrcia</i> (51,4%); <b>PA:</b> <i>Machaerium</i> (33,7%); <b>PI:</b> <i>Schinus</i> (7,4%), <i>Brassica</i> (3,2%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Myrcia</i> e <i>Machaerium</i>
AC1 São Paulo	<b>PP:</b> Asteraceae (63,3%); <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (14%), <i>Machaerium</i> (13%), <i>Montanoa</i> (9,4%), <i>Ilex</i> (9%), <i>Myrcia</i> (9%), Indeterminado (6%), <i>Antigonon</i> (4,2%)	Amostra monofloral de Asteraceae
AC2 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Brassica</i> (49,2%); <b>PI:</b> Asteraceae (11,6%), Indeterminado (9,4%), <i>Montanoa</i> (6%), <i>Ilex</i> (9%), <i>Myrcia</i> (9%), Apiaceae (3,9%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Brassica</i> e Asteraceae
AC3 São Paulo	<b>PP:</b> <i>Brassica</i> (44,8%); <b>PI:</b> <i>Montanoa</i> (13,2%), Anacardiaceae (8,4%), Asteraceae (10,5%), <i>Myrcia</i> (6,6%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Brassica</i> e <i>Montanoa</i>

(Continua)

Tabela 3. Continuação...

Amostra/ Origem	Tipos Polínicos e Frequência <sup>1</sup>	Origem Botânica Predominante <sup>2</sup>
AD1 São Paulo	<b>PA:</b> <i>Brassica</i> (25,1%), <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (22,7%) <b>PI:</b> <i>Cocos nucifera</i> (14,1%), Asteraceae (7,1%), <i>Mimosa scabrella</i> (5,7%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Brassica</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>
AD2 São Paulo	<b>PA:</b> <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (42%), <i>Myrcia</i> (18,6%), <b>PI:</b> <i>Baccharis</i> (8,1%), <i>Brassica</i> (5,8%), <i>Cocos nucifera</i> (4,2%)	Amostra heterofloral com boa participação de <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> e <i>Myrcia</i>

<sup>1</sup> PP = pólen predominante (> 45%). PA = pólen acessório (15 a 45%), PI= pólen isolado importante (3 a 15%).

<sup>2</sup> Amostra monofloral: acima de 90% de um tipo polínico ou 60% ou mais de um tipo polínico sem a ocorrência do pólen acessório.

Nota-se que, dos 39 tipos polínicos identificados, 28 (71,8%) estavam presentes em mais de uma amostra e até mesmo em diferentes Estados (Tabela 4). O número máximo de tipos polínicos em um único produto foi oito (AC1: Asteraceae; *Cocos nucifera*, *Machaerium*, *Montanoa*, *Ilex*, *Myrcia*, *Antigonon* e um táxon indeterminado). 10,1% das amostras apresentaram apenas um tipo polínico, 17,4% dois tipos, 31,9% (a maioria delas) três tipos polínicos, 23,2% quatro e 11,6% cinco tipos polínicos. Apenas as amostras AA1 e AC2 apresentaram, respectivamente, seis e sete diferentes táxons em sua composição.

De maneira geral, cada carga de pólen apícola contém grãos de uma única espécie vegetal, porém, durante um período de forrageamento, as abelhas podem visitar mais de uma espécie, a fim de obter um produto que atenda suas necessidades, resultando em um misto de pólen apícola com diferentes tipos polínicos (MODRO *et al.*, 2011 BARTH *et al.*, 2011; BOGDANOV, 2012; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015). Odoux *et al.* (2012) levantaram a hipótese de que quanto mais fontes poliníferas disponíveis, maior a diversidade do pólen apícola. Além disto, a variedade de táxons em uma única amostra pode ser explicada, também, pela prática comum dos apicultores de misturar o produto de diferentes coletas para formar um único lote. Barreto, Funari e Orsi (2005) descrevem que o objetivo desta mistura seria formar um produto colorido e de sabor agradável, favorecendo a comercialização.

*Cocos nucifera* e *Mimosa caesalpiniaefolia* foram os tipos polínicos de maior incidência nas amostras. *C. nucifera* foi encontrado, principalmente, como pólen isolado importante (PI) (52,2% das ocorrências), enquanto a maior frequência de *M.*

*caesalpiniaefolia* foi como pólen acessório (PA) (55,6%). 11 táxons ocorreram uma única vez [(Apiaceae, *Antigonon*, *Astronium*, *Baccharis*, Cyperaceae, Loranthaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Myrtaceae (não característico de *Eucalyptus* ou *Myrcia*), *Richardia* e Rubiaceae (não característico de *Coffea* ou *Richardia*)].

**Tabela 4.** Ocorrência dos táxons vegetais em 69 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros.

Taxa	Ocorrência (Nº de amostras)									
	Total	Estado								
		SP	BA	SE	RN	PR	SC	RS	MT	MS
<i>Cocos nucifera</i>	23	5	13	2	2				1	
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	18	7	8	2	1					
Asteraceae	16	7	3			1		4	1	
<i>Eucalyptus</i>	16	3	8		1			4		
<i>Myrcia</i>	16	9	2			2		3		
<i>Cecropia</i>	13	8	1					3		1
<i>Mimosa scabrella</i>	12	2	3		3	2	1		1	
<i>Brassica</i>	11	4				2	1	3	1	
<i>Eupatorium</i>	8	5	2					1		
<i>Anadenanthera</i>	7	2						4		1
<i>Piper</i>	6	6								
<i>Ilex</i>	6	5						1		
<i>Alternanthera</i>	5	5								
Fabaceae	5	1	1			2				1
<i>Montanoa</i>	5	4					1			
<i>Syagrus</i>	5	5								
Arecaceae	4	2	1			1				
<i>Mimosa verrucosa</i>	4		1		2	1				
<i>Schinus</i>	4	2				1		1		
<i>Vernonia</i>	4	4								
Anacardiaceae	3	2				1				
<i>Astrocaryum</i>	3	2	1							
<i>Elephantopus</i>	3	3								
Poaceae	3	1	1			1				
<i>Sebastiania</i>	3							3		
<i>Coffea</i>	2		2							
<i>Machaerium</i>	2	1				1				
<i>Ricinus</i>	2	1								1
Apiaceae	1	1								
<i>Antigonon</i>	1	1								
<i>Astronium</i>	1		1							
<i>Baccharis</i>	1	1								
Cyperaceae	1	1								
Loranthaceae	1					1				
Malvaceae	1	1								
Melastomataceae	1									1
Myrtaceae	1		1							
<i>Richardia</i>	1				1					
Rubiaceae	1		1							

SP = São Paulo; BA = Bahia; SE = Sergipe; RN = Rio Grande do Norte; PR = Paraná; SC = Santa Catarina; RS = Rio Grande do Sul.

Em sete amostras, um dos táxons não pode ser identificado (C3, D2, E1, I1, M2, AC1, AC2), porém, em nenhum dos casos tratava-se de um PP ou de um PA, mas sim, de um PI, uma vez que a frequência destes tipos polínicos indeterminados variou de 3,1 (D2) a 11,8% (I1) nas amostras. Segundo Dórea, Novais e Santos (2010), em alguns casos não é possível identificar o táxon utilizando apenas a análise polínica, isso porque o grão de pólen pode, ainda, não ter sido catalogado ou por não ser possível diferenciar vegetais cuja morfologia do pólen é muito semelhante.

As amostras procedentes de Sergipe (n=2) foram coletadas no mesmo apiário e nota-se pouca variação na origem botânica [A1: *Mimosa caesalpiniaefolia* (95,5%), *Cocos nucifera* (3,5%); A2: *M. caesalpiniaefolia* (96,3%), *C. nucifera* (3,7%)]. Isto pode estar relacionado ao fato de que, embora tenham sido coletadas em diferentes períodos, durante o intervalo entre as coletas não houve mudança significativa na florada da região ou na rotina de forrageamento das abelhas. Barth *et al.* (2010) analisaram quatro amostras oriundas de Sergipe e em uma delas houve predominância dos táxons *M. caesalpiniaefolia* e *C. nucifera*.

A espécie *M. caesalpiniaefolia* é uma leguminosa arbórea/arbustiva. A madeira tem alto poder calorífico e resistência físico-mecânica e a folhagem é utilizada como alimento para ruminantes. A planta é considerada nativa do Estado de Minas Gerais e da região Nordeste do país, onde ocorre nas áreas de semiárido dos Estados do Piauí, Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia e Ceará (MOURA; PEGORARO, 2006; SANTOS; ARAÚJO; ARAÚJO-NETO, 2007; LORENZI; SOUZA, 2008; GONÇALVES; LELIS; ABREU, 2010). Além do interesse para a produção de madeira e forragem, RIBEIRO *et al.* (2008) citam que o uso desta espécie é uma alternativa para recuperação de áreas degradadas, sendo ideal para uso em reflorestamentos consorciados.

A floração da *M. caesalpiniaefolia* é bastante irregular e pode acontecer ao longo de todo o ano. Em Sergipe foram observadas floradas de novembro a dezembro e em São Paulo de abril a maio e durante o mês de fevereiro (MARCHINI *et al.*, 2001; CARVALHO, 2007). No presente estudo, este tipo polínico foi encontrado em amostras cuja coleta ocorreu durante todos os meses do ano, exceto fevereiro e março. O pólen desta espécie vegetal é bastante atrativo para as abelhas, sendo esta uma fonte polinífera comum para a espécie *Apis mellifera* (LOPES *et al.*, 2010).

*C. nucifera* é uma espécie característica de regiões litorâneas (CHAN; ELEVITCH, 2006). A incidência deste tipo polínico em pólen apícola da região Nordeste é alta (BARTH *et al.*, 2010; ALVES, 2013b; FREITAS *et al.*, 2013). No Brasil, 70% da produção de *C. nucifera* está concentrada nesta região, sendo o Estado da Bahia um dos principais produtores (SOUZA, 2010). A espécie é tão constante no pólen apícola desta região, especialmente naqueles produzidos em áreas litorâneas, que pode-se dizer que a planta contribui de maneira sólida para a apicultura da região (ALVES, 2013b). Levando em conta a data de coleta das amostras (Tabela 1), nota-se que a espécie *C. nucifera* serviu como fonte polinífera para as abelhas durante sete dos doze meses do ano (abril a outubro). Segundo Castro, Passos e Aragão (2009), a floração desta espécie está relacionada a uma boa condição hídrica no momento da formação dos primórdios florais, de modo que pode ocorrer, ininterruptamente, ao longo do ano quando há condições para tal.

No pólen apícola coletado no Rio Grande do Norte (n=4) predominaram duas espécies da família Mimosaceae (*Mimosa scabrella* e *M. verrucosa*). A amostra U1 foi a única, entre as 69, monofloral de *M. verrucosa*. Os tipos polínicos *C. nucifera*, *M. caesalpiniaefolia*, *Eucalyptus* e *Richardia* também foram identificados, porém como PA ou PI. As amostras F1 e F2 foram coletadas em um mesmo apiário e, embora a coleta tenha ocorrido em meses e anos diferentes (nov-dez/11; set/12, respectivamente), o tipo polínico *M. scabrella* foi predominante em ambas (F1: 98,7%; F2: 84,3%). Tal fato pode ser um indicador da época de florada desta planta na região. A espécie *M. scabrella* ocorre, naturalmente, na região Sul do Brasil associada a pinhais, porém, já foi encontrada em Estados do Nordeste, onde pode ter sido introduzida para exploração de lenha (DAHMER, 2011). Segundo Mazuchowski (2012), o florescimento é abundante e pode ocorrer no inverno, primavera e verão, de acordo com a variedade da espécie.

Nas amostras coletadas na Bahia (n=16), os tipos polínicos de maior incidência foram *C. nucifera*, *M. caesalpiniaefolia* e *Eucalyptus*. *C. nucifera* estava presente em 81,3% das amostras e *M. caesalpiniaefolia* e *Eucalyptus* foram identificados em 50% das amostras deste Estado. Embora *C. nucifera* tenha sido frequente, este táxon foi PP em apenas cinco das 13 amostras em que ocorreu, nas demais estava como PA ou PI. Das seis amostras classificadas como monoflorais, em duas predominou *C. nucifera* (I2 e Q1) e nas demais predominaram *Eucalyptus* (E3), *Astrocaryum* (M1), um táxon indeterminado de Fabaceae (M2) e um táxon

indeterminado de Rubiaceae (E7), sendo este último encontrado apenas nesta amostra. Freitas *et al.* (2013) analisaram seis amostras produzidas na Bahia e concluíram que *C. nucifera*, *M. scabrella* e um táxon da família Asteraceae foram os tipos polínicos de maior frequência nas amostras, sendo todas heteroflorais. Barth *et al.* (2010) analisaram sete amostras coletadas neste mesmo Estado e observaram que em apenas uma a espécie *C. nucifera* não estava presente.

Nas amostras procedentes de São Paulo (n=28) foram identificados 30 tipos polínicos. Os táxons de maior incidência foram os gêneros *Myrcia* e *Cecropia*, a espécie *M. caesalpiniaefolia* e um tipo polínico da família Asteraceae. Três das sete amostras monoflorais tinham como PP o gênero *Alternanthera* (S3, S4, S6), nas demais predominaram os gêneros *Astrocaryum* (G3), *Myrcia* (G5), *Anadenanthera* (S7) e um táxon não identificado da família Asteraceae (AC1). É deste Estado a amostra com maior número de tipos polínicos (AC1).

A análise dos resultados de um conjunto de amostras coletadas em São Paulo (código G, o maior número de amostras de um único apiário) permitiu acompanhar a variação na composição do pólen apícola ao longo de cinco meses (setembro/12 a janeiro/13). Foram observados 13 tipos polínicos, cujas ocorrências e, principalmente, as frequências variaram ao longo deste período. Inicialmente, predominou o gênero *Syagrus* nas duas coletas de setembro, cuja presença manteve-se até novembro, porém como PA ou PI. Nas quatro amostras coletadas em outubro, os tipos polínicos com maior frequência foram *Astrocaryum*, *Eupatorium*, *Myrcia* e *Piper*; nas duas amostras coletadas em novembro foram táxons dos gêneros *Piper* e *Cecropia*; na amostra coletada em dezembro um tipo não identificado da família Arecaceae; e nas duas amostras coletadas em janeiro predominaram a espécie *C. nucifera*, na primeira coleta, e um táxon da família Arecaceae, na segunda coleta.

Arruda *et al.* (2013) analisaram sete amostras de pólen apícola, produzidas em São Paulo, e encontraram taxa característicos de *Cecropia*, *Eucalyptus*, *Ilex*, *Myrcia*, *Piper*, *Vernonia*, *Cestrum*, *Trema*, Arecaceae e Cyperaceae. Destes, apenas os táxons *Cestrum* e *Trema* não ocorreram nas amostras do presente estudo. Mendonça *et al.* (2008) avaliaram o perfil polínico de amostras coletadas em Itirapina/SP e encontraram 17 tipos polínicos. Assim como no presente estudo, os pesquisadores observaram os táxons *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Eupatorium*, *Vernonia* e Fabaceae. De acordo com Moreti *et al.* (2011), plantas dos gêneros *Eucalyptus* e

*Myrcia* e da família Poaceae podem ser importantes fontes de pólen na região de Pindamonhangaba/SP. Mendonça *et al.* (2008) perceberam como dominantes, em amostras de pólen apícola coletadas em Itirapina/SP, táxons de *Eucalyptus*, *Myrcia*, uma espécie não identificada da família Poaceae e *Citrus*.

Nas amostras coletadas no Rio Grande do Sul (n=10) houve predominância dos gêneros *Eucalyptus* e *Anadenanthera* e de táxons não identificados da família Asteraceae. Das cinco amostras monoflorais, em duas predominou o gênero *Brassica* (C1 e C2), em outras duas o gênero *Myrcia* (L2 e L3) e em uma o gênero *Anadenanthera* (K2). Moreti *et al.* (2011), também, encontraram o tipo polínico *Anadenanthera* em pólen apícola, porém em amostras coletadas em São Paulo. É possível que uma planta seja forrageada pelas abelhas em uma região e em outra não, ou mesmo durante um período ou ano e em outro não (LORENZON; MATRANGOLO; SCHOEREDER, 2003). Carpes (2008) observou 11 tipos polínicos em dez amostras de pólen apícola coletadas no Estado do Rio Grande do Sul, entre eles táxons da família Brassicaceae (da qual faz parte o gênero *Brassica*), da família Asteraceae e do gênero *Eucalyptus*.

O gênero *Eucalyptus* corresponde a mais de 600 espécies conhecidas. Foi introduzido no Brasil e tem sido extensivamente cultivado com vistas à produção de madeira, folhas, resinas, óleos essenciais e medicamentos (SOARES; CARVALHO; VALE, 2003; LORENZI; SOUZA, 2008). Trata-se de uma planta de rápido crescimento e de boa adaptação a diferentes habitats. De acordo com o último Censo Agropecuário do IBGE, o eucalipto é cultivado em 23 Estados brasileiros e no Distrito Federal, de modo que apenas no Acre, Amazonas e Amapá não havia, até então, registros do cultivo de alguma espécie (IBGE, 2007).

O período de floração do eucalipto depende da espécie, condições climáticas e de solo e, ainda, da sanidade da planta. Algumas espécies têm floração permanente. Há plantas deste gênero que produzem grandes quantidades de flores que são atrativas às abelhas (MARCHINI; MORETI, 2003). A integração apicultura-silvicultura é uma prática possível de ser adotada pelos apicultores, que podem cultivar diferentes espécies de eucalipto, selecionadas considerando a preferência das abelhas e a abundância da florada, a fim de garantir que ao longo de todo o ano alguma planta esteja em floração (FAPCEN, 2011).

Todas as amostras coletadas no Estado do Paraná (n=4) foram classificadas como heteroflorais. O tipo polínico *M. scabrella* foi o PP em duas amostras (H1 e

AA1), nas demais predominaram um táxon não identificado de Anacardiaceae (AA2) e um táxon do gênero *Myrcia* (AB1). No Estado de Santa Catarina foram coletadas duas amostras e três tipos polínicos foram identificados [J1: *M. scabrella* (95,5%); N1: *Brassica* (91,3%), *Montanoa* (5,4%)]. Freitas *et al.* (2013) analisou amostras de pólen apícola, coletadas em Santa Catarina, e identificou diferentes táxons, entre eles o gênero *Brassica*.

Souza (2014), que realizou a análise polínica de amostras dos Estados do Paraná e Santa Catarina, identificou 20 tipos polínicos: *Andira*, Asteraceae, *Brassica napus*, *Brassica* (que não *Brassica napus*), *Celtis*, *Crotalaria*, *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Eupatorium*, *Euterpe*, *Ilex*, *Lithraea*, *Machaerium*, *Montanoa*, *Phoradendron*, *Piper*, *Piptocarpha*, Rosaceae, *Senecio*, *Vernonia*). A autora analisou seis amostras do Paraná e cinco amostras de Santa Catarina, o que poderia explicar o maior número de tipos polínicos nestas amostras. Ademais, de acordo com Luz *et al.* (2010), variações ocorrem quando as amostras são oriundas de diferentes apiários e/ou foram coletadas em épocas diferentes. Mesmo que certas espécies vegetais sejam características de determinadas regiões, há pequenas ou grandes variações na vegetação que circunda as colmeias.

Nas amostras coletadas em Mato Grosso (n=2) quatro tipos polínicos foram identificados, dois como PP (*Brassica* e *M. scabrella*) e dois como PI (*C. nucifera* e um táxon não identificado da família Asteraceae). Na amostra de Mato Grosso do Sul cinco tipos polínicos foram encontrados, sendo um táxon da família Fabaceae o PP. Freitas *et al.* (2013) analisaram três amostras de Mato Grosso e em todas elas predominou o gênero *Cecropia*. D'Apolito *et al.* (2010) estudaram a coleta de pólen por *Apis mellifera* em uma região de Mato Grosso do Sul e observaram que 42 tipos polínicos foram utilizados pelas abelhas, entre eles quatro táxons da família Fabaceae.

#### 4 CONCLUSÃO

Os 39 tipos polínicos presentes nas amostras foram identificados em nível de espécie, gênero ou família, e apenas sete táxons não foram reconhecidos. A maior parte das amostras foi classificada como heterofloral. O número máximo de tipos polínicos por amostra foi oito (considerando-se uma frequência acima de 3%),

indicando que as abelhas chegam a visitar várias espécies para a produção do pólen apícola. Os resultados obtidos podem ser enviados a apicultores e entrepostos para auxiliá-los no manejo dos apiários, bem como na preservação de espécies que, comprovadamente, servem de fonte polinífera para as abelhas.

## 5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A.D.; CARVALHO, C.M.S. **Apicultura: uma oportunidade de negócio sustentável**. Salvador: SEBRAE-BA, 2009, 52p.

ALVES, R.F. **Análise palinológica do pólen apícola produzido no estado de Sergipe, Brasil**. Feira de Santana, 2013b, 71p. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Feira de Santana.

ALVES, M.L.T.M.F. Pólen - alimento e grande fonte de renda para o apicultor. **Apta Regional**, v.10, n.2, 2013.

ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A. Espectro polínico de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.28, n.1, p.65-70, 2006.

ARRUDA, V.A.S.; SANTOS-PEREIRA, A.A.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n.2, p.100-105, 2013.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. In: CONGRESSO DE APICULTURA DEL MERCOSUR, 1, Punta Del Este, 2005. **Anais**. Punta Del Este: Sociedad de Apicultores Uruguay, 2005. p.20.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen dominante. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.2, p.351-366, 1970a.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 2. Pólen acessório. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.3, p.571-590, 1970b.  
BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 3. Pólen isolado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.4, p.747-772, 1970c.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees, **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p.342-350, 2004.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; SALES, E.O.; VIT, P. Palynological evaluation of bee pollen load batches from the venezuelan Andes of Misintá. **Interciencia**, v.36, n.4, p.296-299, 2011.

BOGDANOV, S. **The bee pollen book: chapter 1**, 2012. Disponível em: [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net). Acesso em: 15 fev. 2013.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CARPES, S.T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil**. 2008, 255p. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, P.E.R. **Sabiá - *Mimosa caesalpinifolia***, 2007. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/304676/1/Circular135.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2015.

CARVALHO, C.A.L.; MARCHINI, L.C.; ROS, P.B. Fontes de pólen utilizadas por *Apis mellifera* L. e por algumas espécies de Trigonini (Apidae) em Piracicaba (SP). **Bragantia**, v.58, n.1, p.49-56, 1999.

CASTRO, C.P.; PASSOS, E.E.M.; ARAGÃO, W.M. Fenologia de cultivares de coqueiro-anão nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.1, p.13-19, 2009.

CHAN, E.; ELEVITCHI, C.R. **Cocos nucifera (coconut)**, 2006. Disponível em: <[www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org)>. Acesso em: 22 mai. 2013.

D'APOLITO, C.; PESSOA, S.M.; BALESTIERI, F.C.L.M.; BALESTIERI, J.B.P. Pollen harvest by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in the Dourados region, Mato Grosso do Sul state (Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.4, p.898-904, 2010.

DAHMER, N. **Citotaxonomia do gênero *Mimosa* L. e variabilidade molecular em *Mimosa scabrella* Benth.** Porto Alegre, 2011. 169p. Tese de Doutorado - Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DÓREA, M.C.; NOVAIS, J.S.; SANTOS, F.A.R. Botanical profile of bee pollen from the southern coastal region of Bahia, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.3, p.862-867, 2010.

FÉAS, X.; VÁZQUEZ-TATO, M.P.; ESTEVINHO, L.; SEIJAS, J.A.; IGLESIAS, A. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v.17, n.7, p.8359-8377, 2012.

FREITAS, A.S.; ARRUDA, V.A.S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; BARTH, O.M. The botanical profiles of dried bee pollen loads collected by *Apis mellifera* (Linnaeus) in Brazil. **Sociobiology**, v.60, n.1, p.56-64, 2013.

FAPCEN. Fundação de Apoio à Pesquisa do Corredor de Exportação Norte. **Proposta de integração apicultura e silvicultura será apresentada no TO**, 2011. Disponível em: <<http://www.fapcen.agr.br/?p=451>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

GONÇALVEZ, C.A.; LELIS, R.C.C.; ABREU, H.S. Caracterização físico-química da madeira de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). **Revista Caatinga**, v.23, n.1, p.54-62, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. 777p.

ISMAIL, A.H.M.; OWAYSS, A.A.; MOHANNY, K.M.; SALEM, R.A. Evaluation of pollen collected by honey bee, *Apis mellifera* L. colonies at Fayoum Governorate, Egypt. Part 1: Botanical origin. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.12, n.2, p.129-135, 2013.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAFMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-6, 2015.

LOPES, M.T.R.; REIS, A.S.; SOUZA, B.A.; PEREIRA, F.M.; OLIVEIRA, F.F.; NEVES, L.S.M.L.; PEREIRA, L.A.; ROCHA, F.S.B.; NETO, J.M.V. **Levantamento da fauna e plantas apícolas na Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2010. 35p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4.ed., São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 1120p.

LORENZON, M.C.A.; MATRANGOLO, C.A.R.; SCHOEREDER, J.H. Flora visitada pelas abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) na Serra da Capivara, em caatinga do Sul do Piauí. **Neotropical Entomology**, v.32, n.1, p.27-36, 2003.

LUZ, C.F.P.; BACHA-JUNIOR, G.L.; FONSECA, R.L.S.; SOUSA, P.R. 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**, v.82, n2, p.293-304, 2010.

MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C. Comportamento de coleta de alimento por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, apidae) em cinco espécies de eucalyptus. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.11, n.2, p.75-79, 2003.

MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; TEIXEIRA, E.W.; SILVA, E.C.A.; RODRIGUES, R.R.; SOUZA, V.C. Plantas visitadas por abelhas africanizadas em duas localidades do estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, v.58, n.2, p.413-420, 2001.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Sistema de produção de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) sob técnicas de manejo silvicultural**. Curitiba, 2012. 217p. Tese de Doutorado - Setor de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná.

MENDONÇA, K.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, B.A.; ALMEIDA-ANACLETO, D.; MORETI, A.C.C.C. Plantas Apícolas de Importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Fragmento de Cerrado em Itirapina, SP. **Neotropical Entomology**, v.37, n.5, p.513-521, 2008.

MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA-NETO, J.A.A. Flora de importância polinífera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.1145-1153, 2011.

MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, V.C.; RODRIGUES, R.R. **Atlas do pólen de plantas apícolas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual. 2002. 88p.

MORETI, A.C.C.C.; TEIXEIRA, E.W.; ALVEZ, M.L.T.M.F.; OLIVEIRA, K.C.L.S.; OTSUK, I.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Tamanho das cargas de pólen interceptadas em coletores mantidos em colméias de *Apis mellifera* africanizadas. **Mensagem Doce**, n.112, 2011.

MOURA, J.; PEGORARO, A. Produção de pólen apícola com coletor nos horários de disponibilidade de alimento no pico da florada da bracatinga (*Mimosa scabrella*). **Scientia Agraria**, v. 7, n. 1-2, p. 97-100, 2006.

NOGUEIRA, C.; IGLESIAS, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.11173-11187, 2012.

ODOUX, J.F.; FEUILLET, D.; AUPINEL, P.; LOUBLIER, Y.; TASEI, J.N.; MATEESCU, C. Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies. **Apidologie**, v.43, n.5, p.561-575, 2012.

PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. **Produção de mel**, 2003. Disponível em: <[www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br](http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br)>. Acesso em: 15 mai. 2011.

RIBEIRO, M.C.C.; BARROS, N.M.S.; BARROS-JÚNIOR, A.P.; SILVEIRA, L.M. Tolerância do sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) à salinidade durante a germinação e o desenvolvimento de plântulas. **Revista Caatinga**, v.21, n.5 (supl), p.123-126, 2008.

SANTOS, E.D.; ARAÚJO, R.R.; ARAÚJO-NETO, J.C. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) em diferentes pontos de maturação. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.3, n.1, p.14-17, 2007.

SANTOS, C.S.; RIBEIRO, A.S. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista Verde**, v.4, n.3, p.1-6, 2009.

SILVEIRA, T.A. **Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental**. Piracicaba, 2012. 67p. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo.

SOARES, T.S.; CARVALHO, R.M.M.A.; VALE, A.B. Avaliação econômica de um povoamento de *Eucalyptus grandis* destinado a multiprodutos. **Revista Árvore**, v.27, n.5, p.689-694, 2003.

SOUZA, B.R. **Quantificação das vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) e vitâmeros das vitaminas B<sub>3</sub> e B<sub>6</sub> em amostras de pólen apícola desidratado provenientes da Região Sul do Brasil**. São Paulo, 2014. 125p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SOUZA, I.V. **Phytoseiidae em fruteiras cultivadas e padrão de ocorrência de *Aceria guerreronis* Keifer (Eriophyidae) e outros ácaros em frutos de coqueiro no sul da Bahia**. Ilhéus, 2010. 111p. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Santa Cruz.

# CAPÍTULO 3

## TEOR DE UMIDADE, PRODUÇÃO E BENEFICIAMENTO DE PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi levantar dados a respeito da produção, verificar a adequação, com base na legislação brasileira, de práticas adotadas durante o beneficiamento do pólen apícola e, ainda, identificar a percepção dos produtores quanto a vegetação forrageada pelas abelhas. A coleta dos dados foi realizada, junto aos apicultores, por meio de questionário. As amostras foram analisadas quanto ao teor de umidade, por gravimetria, e quanto a origem botânica, por identificação e contagem dos tipos polínicos. Observou-se que o número de colmeias produtivas, por estabelecimento, foi de 3 a 300. O coletor tipo frontal foi utilizado por todos os produtores que responderam a esta questão. O intervalo entre as etapas de coleta e de desidratação foi variável e apenas duas amostras foram liofilizadas (as demais foram desidratadas em estufa). Parte das amostras foi desidratada sob temperatura acima do limite estabelecido na legislação e, ainda, 91% dos produtos analisados tinham teor de umidade acima do limite de 4%. Nenhum aditivo foi utilizado em qualquer etapa do processo. A análise polínica indicou que, em alguns casos, os produtores foram capazes de perceber as plantas visitada pelas abelhas apenas acompanhando o forrageamento. Concluiu-se que a produção de pólen apícola foi realizada por pequenos ou médios produtores, os quais adotam práticas variadas de produção e beneficiamento, respeitando o não uso de aditivos, porém, com falhas quanto a temperatura de desidratação e o teor de umidade no produto final. Ademais, quando o produtor acompanha efetivamente a coleta de matéria-prima pelas abelhas, ele é capaz de perceber as fontes poliníferas.

**Palavras-chave:** pólen apícola; legislação; desidratação; umidade; origem botânica.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to collect production data, to verify the adequacy, based on Brazilian legislation, of the practices adopted by beekeepers during the

processing of bee-pollen, and also to identify their perception about the vegetation visited by bees. The data were collected from the beekeepers using a questionnaire. The samples were analyzed for moisture content by gravimetric method, and for botanical origin by identification and counting of the pollen types. The number of productive hives per apiary ranged from 3 to 300. The collector installed against the front of the hive was used. The interval between the collection and dehydration of the samples varied between apiaries and only two samples were lyophilized (the others were dehydrated in an electric oven). Part of the samples was dehydrated at temperature above the limit established in Brazilian legislation, and 91% of the analyzed products had moisture content above 4%. No food additives were used at any point of the process. The pollen analysis indicated that, in some cases, producers were able to identify the pollen source visited by bees. It is concluded that, the production of bee-pollen was performed by small to medium beekeepers, which adopt different practices of production and processing, respecting the non-use of additives, however, failed in the temperature of dehydration and the moisture content in the final product. Moreover, when the producer effectively accompanies the collection of food by bees they are able to perceive the polliniferous sources.

**Keywords:** bee-pollen; legislation; dehydration; moisture; botanical origin.

## 1 INTRODUÇÃO

A apicultura é uma atividade realizada em todo o mundo, ainda que muitas vezes seja considerada um “*hobby*” ou tenha caráter secundário nos estabelecimentos rurais (BRADBEAR, 2009). No Brasil, a produção de pólen apícola teve início no final da década de 80 (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005a) e estima-se que a safra atual seja insuficiente para atender a demanda de mercado (SEBRAE, 2007; ALVES, 2013b).

Para a criação das abelhas é imprescindível a oferta de água e alimento em abundância (PEREIRA *et al.*, 2003). É do conhecimento dos apicultores que as abelhas coletam das flores a matéria-prima necessária para produzir mel e pólen apícola, os principais alimentos da colônia (MORETI, 2006; ARRUDA, 2009). Portanto, os apiários são instalados próximos a fontes vegetais de floração

permanente ou em áreas em que, ao longo do ano, ao menos uma fonte polínifera esteja disponível (FAPCEN, 2011; MODRO *et al.*, 2011).

O Brasil é um dos poucos países com legislação específica para os produtos da apicultura. O Regulamento Técnico para Fixação e Identidade e Qualidade de Pólen Apícola é o anexo V da Instrução Normativa (IN) nº 3 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que, nos demais anexos, trata também de outros produtos da colmeia (geleia real, geleia real liofilizada, própolis, extrato de própolis, cera de abelha e apitoxina).

De acordo com a IN 3, entende-se por pólen apícola “o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colméia”. Este produto pode ser designado apenas como “pólen apícola”, quando mantido em sua forma original, ou como “pólen apícola desidratado”, quando submetido ao processo de secagem em temperatura não superior a 42°C, e com teor de umidade final inferior a 4% (BRASIL, 2001). Para o processo de desidratação é comum o uso de estufas com aquecimento sob condições de tempo e temperatura que variam entre as propriedades (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005b). Quanto ao uso de aditivos neste alimento, ainda segundo a IN 3, não é permitido.

O objetivo deste estudo foi levantar dados de produção, verificar a adequação, com base na IN 3 do MAPA, de práticas adotadas pelos apicultores durante o beneficiamento do pólen apícola e, ainda, identificar a percepção dos produtores quanto a vegetação forrageada pelas abelhas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAS**

Este estudo foi conduzido com 69 amostras de pólen apícola de abelhas *Apis mellifera* prontas para o consumo, coletadas entre os anos de 2011 a 2013 em apiários localizados em nove Estados brasileiros. 56 amostras foram enviadas diretamente por produtores ou entrepostos na época da safra e 13 foram adquiridas no comércio. As amostras foram encaminhadas, à temperatura ambiente, ao

Laboratório de Análise de Alimentos (LAA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foram codificadas usando letras seguidas de um número para indicar, respectivamente, fornecedor e lote. A análise polínica foi realizada em parceria com os pesquisadores Dra Ortrud Monika Barth e Alex da Silva de Freitas do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (LMMV) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, para onde uma parcela de cada amostra foi enviada à temperatura ambiente e armazenada, também sob esta condição, até o momento das análises.

## 2.2 OBTENÇÃO DOS DADOS

Os produtores foram questionados a respeito de:

### Produção:

- data da coleta;
- número de colmeias em produção;
- tipo de coletor utilizado;
- plantas forrageadas pelas abelhas para produção do pólen apícola;
- data da desidratação;
- tipo de equipamento utilizado para desidratação e o tempo de duração do processo.

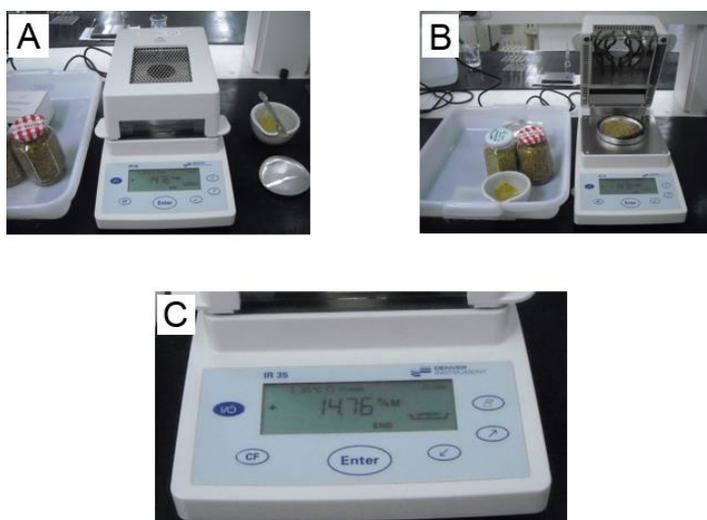
### Adequação a requisitos da IN 3:

- temperatura de desidratação;
- uso de aditivos.

## 2.3 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

O teor de umidade foi determinado no momento em que as amostras foram recebidas no LAA. Para tal, foi adotado o procedimento descrito por Oliveira (2006) e Melo e Almeida-Muradian (2011). As amostras foram trituradas em moinho analítico e peneiradas através de uma peneira de 0,595 mm. 1 g de amostra triturada foi submetida à temperatura de 85°C por 3,5 min em balança eletrônica de precisão adaptada com secador infravermelho (Mettler, modelo B-160, São Paulo, SP) e o

percentual indicado automaticamente pelo equipamento (Figura 1). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos, como média  $\pm$  desvio padrão, em g umidade por 100 g pólen apícola desidratado.



**Figura 1.** Balança de precisão adaptada com secador infravermelho (A); Amostra de pólen apícola desidratado (previamente triturada) no interior da balança após análise (B); percentual de umidade no mostrador (C).

Fonte: arquivo pessoal de Dra Ligia B. de Almeida Muradian.

## 2.4 ANÁLISE POLÍNICA

As amostras foram preparadas e, então, analisadas em microscópio de luz fotônica (BARTH *et al.*, 2010). Os tipos polínicos foram identificados por comparação com informações catalogadas e designados pelo táxon ao qual se assemelhavam (BARTH, 1970a; BARTH, 1970b; BARTH, 1970c; BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002). O procedimento utilizado está descrito com detalhes no Capítulo 2 (Material e Métodos, item 2.2).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A data de coleta; o número de colmeias em produção; a data de desidratação, tipo de equipamento utilizado, temperatura e tempo; e o teor de umidade das amostras, são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Informações levantadas a respeito da produção, beneficiamento e teor de umidade de 69 amostras pólen apícola desidratado.

Amostra*	Origem	Coleta		Desidratação					
		Data	Estação do ano	Número de Colmeias	Início	Tipo de Equipamento	Temperatura	Tempo	Umidade (g/100 g)
A1	SE	12 a 20/04/12	outono	25	23/04/12	Estufa de madeira	42°C	35 h	7,7 ± 0,3
A2	SE	21/04 a 11/05/12	outono	25	16/05/12	Estufa de madeira	42°C	35 h	7,2 ± 0,3
B1	BA	10/05/12	outono	40	13/05/12	Estufa com fluxo de ar	27-32°C	24 h	7,8 ± 0,3
C1	RS	05/05/12	outono	35	05/05/12	Estufa elétrica c/ fluxo forçado de ar	ambiente	5 h	10,2 ± 0,5
C2	RS	28/06/12	inverno	28	28/06/12	Estufa elétrica c/ fluxo forçado de ar	45°C	5 h	6,8 ± 0,2
C3	RS	28/07/12	inverno	28	28/07/12	Estufa elétrica c/ fluxo forçado de ar	45°C	5 h	6,4 ± 0,2
D1	SP	abr/12	outono	3	mai/12	Estufa elétrica	42°	24 h	7,6 ± 0,2
D2	SP	abr/12	outono	3	mai/12	Liofilizador	-	18 h	7,0 ± 0,2
D3	SP	set/12	inverno/primavera	3	out/12	Estufa elétrica	42°C	52 h	6,2 ± 0,1
D4	SP	set/12	inverno/primavera	3	out/12	Liofilizador	-	18 h	6,0 ± 0,1
D5	SP	set/12	inverno/primavera	3	out/12	Liofilizador	NI	18 h 30 min	3,6 ± 0,1
E1	BA	01/08/12	inverno	NI	05/08/12	Forno industrial	42°C	24 h	5,1 ± 0,1
E2	BA	19/06/12	outono	NI	23/06/12	Forno industrial	42°C	24 h	5,2 ± 0,1
E3	BA	16/09/12	inverno	NI	20/09/12	Forno industrial	42°C	24 h	4,6 ± 0,1
E4	BA	06/10/12	primavera	NI	10/10/12	Forno industrial	42°C	24 h	5,6 ± 0,0
E5	BA	12/08/12	inverno	NI	16/08/12	Forno industrial	42°C	24 h	5,7 ± 0,1
E6	BA	23/09/12	primavera	NI	27/09/12	Forno industrial	42°C	24 h	6,1 ± 0,0
E7	BA	23/07/12	inverno	NI	27/07/12	Forno industrial	42°C	24 h	5,1 ± 0,1
F1	RN	nov-dez/11	primavera	NI	jan/12	Estufa elétrica	41°C	NI	8,1 ± 0,2
F2	RN	25/09/12	primavera	45	10/10/12	Estufa elétrica	41°C	24 h	5,1 ± 0,2
G1	SP	03/09/12	inverno	NI	10/09/12	Estufa elétrica	45°C	38 h	4,3 ± 0,2
G2	SP	18/09/12	inverno	NI	24/09/12	Estufa elétrica	45°C	40 h	4,8 ± 0,2
G3	SP	03/10/12	primavera	NI	08/10/12	Estufa elétrica	45°C	39 h	4,7 ± 0,1
G4	SP	16/10/12	primavera	19	22/10/12	Estufa elétrica	45°C	NI	3,9 ± 0,1
G5	SP	16/10 a 25/10/12	primavera	19	29/10/12	Estufa elétrica	45°C	44 h	4,6 ± 0,1
G6	SP	25/10 a 08/11/12	primavera	22	12/11/12	Estufa elétrica	45°C	41 h	3,6 ± 0,1
G7	SP	14/11 a 19/11/12	primavera	21	19/11/12	Estufa elétrica	45°C	18 h	3,9 ± 0,1
G8	SP	20/11 a 04/12/12	primavera	22	04/12/12	Estufa elétrica	45°C	40 h	4,6 ± 0,1
G9	SP	06/12 a 13/12/12	primavera	22	18/12/12	Estufa elétrica	45°C	31 h	5,2 ± 0,0
G10	SP	08/01 a 15/01/13	verão	22	22/01/13	Estufa elétrica	45°C	34 h	5,1 ± 0,1
G11	SP	18/01 a 25/01/13	verão	22	29/01/13	Estufa elétrica	45°C	60 h	4,7 ± 0,1
H1	PR	14/09/12	inverno	300	19/09/12	Estufa elétrica	45°C	12 h	4,7 ± 0,2
I1	BA	21/06/12	inverno	6	13/07/12	Estufa elétrica	40°C	26 h	4,3 ± 0,1
I2	BA	18/09/12	inverno	15	30/09/12	Estufa elétrica	40°C	27 h	4,9 ± 0,1
J1	SC	set/12	inverno/primavera	NI	set/12	NI	NI	NI	6,8 ± 0,2

(Continua)

Tabela 1. Continuação...

Amostra*	Origem	Coleta			Desidratação				
		Data	Estação do ano	Número de Colmeias	Início	Tipo de Equipamento	Temperatura	Tempo	Umidade (g/100 g)
K1	RS	05/10/12	primavera	20	07/10/12	Estufa elétrica	42°C	24 h	5,2 ± 0,1
K2	RS	25/10/12	primavera	20	27/10/12	Estufa elétrica	42°C	24 h	5,0 ± 0,1
K3	RS	15/11/12	primavera	15	18/11/12	Estufa elétrica	42°C	24 h	3,8 ± 0,1
K4	RS	05/12/12	primavera	18	07/12/12	Estufa elétrica	42°C	24 h	3,8 ± 0,1
L1	RS	15/10 a 30/10/12	primavera	22	02/11/12	Estufa elétrica	40°C	30 h	4,3 ± 0,0
L2	RS	01/11 a 20/11/12	primavera	22	22/11/12	Estufa elétrica	40°C	30 h	4,3 ± 0,1
L3	RS	25/11 a 10/12/12	primavera	22	12/12/12	Estufa elétrica	40°C	30 h	6,3 ± 0,3
M1	BA	28/11/12	primavera	10	05/12/12	Estufa artesanal	38-40°C	24 h	5,8 ± 0,2
M2	BA	11/02/13	verão	10	15/02/13	Estufa artesanal	38-40°C	24 h	5,6 ± 0,0
N1	SC	2011	-	NI	2011	NI	NI	NI	5,0 ± 0,2
O1	MT	2012	-	NI	2012	NI	NI	NI	7,8 ± 0,4
P1	MT	set/13	inverno/primavera	NI	2013	NI	NI	NI	7,1 ± 0,3
Q1	BA	26/04 a 04/05/13	outono	NI	07/05/13	Estufa elétrica	40°C	24 h	5,1 ± 0,1
R1	BA	25/04 a 01/05/13	outono	NI	05/05/13	Estufa elétrica	40°C	24 h	6,3 ± 0,1
S1	SP	ago-set/12	inverno	20	set/12	Secador a gás com ventoinhas	45°C	24 h	7,5 ± 0,1
S2	SP	01/05 a 26/05/13	outono	19	27/05/13	Secador a gás com ventoinhas	40-60°C	48 h	5,7 ± 0,1
S3	SP	27/05 a 07/06/13	outono	19	08/06/13	Secador a gás com ventoinhas	40-90°C	48 h	6,0 ± 0,1
S4	SP	11/06 a 07/07/13	inverno	18	05/08/13	Secador a gás com ventoinhas	40-50°C	24 h	6,9 ± 0,1
S5	SP	08/07 a 04/08/13	inverno	18	05/08/13	Secador a gás com ventoinhas	40-50°C	24 h	6,1 ± 0,1
S6	SP	05/08 a 29/08/13	inverno	18	15/10/13	Secador a gás com ventoinhas	40-50°C	24 h	4,7 ± 0,1
S7	SP	30/08 a 15/09/13	inverno	6	15/10/13	Secador a gás com ventoinhas	40-50°C	24 h	5,7 ± 0,0
T1	RN	01/10/12	primavera	40	10/10/12	Estufa elétrica	41°	NI	5,5 ± 0,2
U1	RN	05/10/12	primavera	50	14/10/12	Estufa elétrica	41°	24 h	4,4 ± 0,1
V1	BA	jun/13	outono/inverno	NI	jun/13	NI	NI	NI	6,7 ± 0,2
X1	BA	jun/13	outono/inverno	NI	jun/13	NI	NI	NI	4,7 ± 0,0
Z1	MS	05/09/13	inverno	NI	11/09/13	Estufa elétrica	41°C	14 h	7,5 ± 0,1
AA1	PR	mai/13	outono	NI	mai/13	NI	NI	NI	4,7 ± 0,1
AA2	PR	dez/13	primavera/verão	NI	dez/13	NI	NI	NI	6,0 ± 0,1
AB1	PR	nov/13	primavera	NI	nov/13	NI	NI	NI	5,4 ± 0,2
AC1	SP	set/13	inverno/primavera	NI	set/13	NI	NI	NI	5,6 ± 0,2
AC2	SP	nov/13	primavera	NI	nov/13	NI	NI	NI	5,8 ± 0,3
AC3	SP	dez/13	primavera/verão	NI	dez/13	NI	NI	NI	6,1 ± 0,1
AD1	SP	dez/12	primavera/verão	NI	dez/12	NI	NI	NI	6,1 ± 0,3
AD2	SP	jun/13	outono/inverno	NI	jun/13	NI	NI	NI	6,5 ± 0,3

\*Letras iguais indicam pólen de um mesmo produtor/entrepósito. Números indicam lote.

As amostras foram coletadas ao longo de todas as estações do ano, embora a maior parte delas tenha sido coletada durante a primavera (45%) e a menor parte durante o verão (8%). A coleta do pólen pelas abelhas depende, principalmente, da disponibilidade de flores e de condições climáticas que favoreçam o forrageamento (ODOUX *et al.*, 2012). Na primavera pode haver maior variedade de fontes políferas em relação as demais estações (NEGRÃO, 2014), já no verão temperaturas elevadas podem influenciar de maneira negativa na rotina de forrageamento das abelhas (MALERBO-SOUZA; SILVA, 2011).

O número de colmeias, em produção, variou de 3 a 300 unidades, assim, os apicultores podem ser considerados pequenos produtores (até 150 colmeias) ou médios produtores (150 a 1500 colmeias) (FBB, 2010). Com relação ao tipo de coletor utilizado na colmeia, todos os fornecedores que responderam esta informação, afirmaram utilizar um modelo tipo frontal.

Alves (2013b) descreveu que há três tipos mais comuns de coletores de pólen apícola: tipo alvado ou frontal, de fundo ou de piso, e tipo topo ou superior. O coletor frontal é posicionado à frente do alvado (nome dado à entrada da colmeia) e as bolotas que ficam retidas caem em outro recipiente, o qual foi, previamente, fixado fora da colmeia. Neste sistema, é necessário recolher o produto diariamente para evitar sua exposição ao ambiente externo e, conseqüentemente, à contaminação, insidência de chuva ou sol, dentre outros fatores indesejáveis. O coletor de piso substitui o fundo e o alvado, ficando o produto retido armazenado e protegido no interior da colmeia, o que permite a retirada a cada dois ou três dias. Quando se instala o coletor tipo topo ou superior, o alvado é vedado para que as abelhas entrem na colmeia pela parte onde está a estrutura, de modo que, nesta situação, o pólen retido também fica protegido no interior da colmeia e poderia ser recolhido a cada dois ou três dias.

Os apicultores escolhem o coletor considerando a facilidade de instalação, de remoção da grade de retenção e do recipiente coletor. A escolha se dá, também, com base no tipo de manejo que pretendem adotar, considerando inclusive a frequência com que o produto será recolhido (ALVES, 2013b). Na Figura 2 são apresentados coletores do tipo frontal utilizados no Rio Grande do Sul.

Após a coleta, o produto é destinado às unidades de beneficiamento. Dois produtores realizaram a desidratação no mesmo dia ou no dia seguinte a coleta, porém a maioria deles manteve o produto armazenado por, no mínimo, dois dias

antes de iniciar o processamento. De acordo com Barreto, Funari e Orsi (2005b), pelo limite tecnológico, dificilmente os produtores dispõem de estrutura para desidratar grandes quantidades de pólen apícola imediatamente após a coleta, então, é comum que lotes sejam congelados e armazenados por certo período até que possam ser descongelados e desidratados.



**Figura 2.** Exemplos de coletores de pólen apícola do tipo frontal, utilizados no Rio Grande do Sul.

Fonte: arquivo pessoal de Dr Aroni Sattler

Dentre 55 amostras, apenas duas foram desidratadas em liofilizador e as demais em equipamento com ou sem aquecimento e com ou sem circulação forçada de ar. Um dos produtores informou que construiu sua própria estufa com aquecimento a gás e ventoinhas para forçar a circulação de ar. Bastos *et al.*, (2003) e Barreto, Funari e Orsi (2005b) observaram que alguns pequenos apicultores utilizam estufas de ventilação improvisadas, ventiladores, ou mesmo a secagem ao sol para reduzir a umidade do pólen apícola.

O processo de desidratação durou de 5 a 60 horas e foi realizado sob temperaturas que variam de ambiente à 90°C, sendo esta última empregada em apenas uma amostra. A legislação brasileira estabelece temperatura máxima de 42°C durante o processo de desidratação do pólen apícola, sendo assim, parte das amostras foram desidratadas sob temperaturas acima do estipulado (BRASIL, 2001). De acordo com Bogdanov (2012), de acordo com a temperatura e o tempo

empregados, o aquecimento pode causar perdas significativas de certos nutrientes. Melo e Almeida-Muradian (2010) analisaram seis amostras de pólen apícola antes e após a desidratação (45°C; aproximadamente 6h) e observaram que o processamento resultou em perdas de, em média, 19%, 16% e 16% nos teores de vitamina E, carotenoides totais e  $\beta$ -caroteno, respectivamente. Um estudo da influência das condições de processamento foi realizado com as amostras D1, D2, D3 e D4 e está descrito no Capítulo 7.

Nota-se que em apenas seis amostras (9%) o teor de umidade estava dentro do limite máximo de 4% estabelecido na legislação brasileira (BRASIL, 2001). O menor valor de umidade (D5: 3,6, G6: 3,6 g/100 g) foi observado em duas amostras oriundas do Estado de São Paulo e o maior valor (C1: 10,2 g/100 g) em uma amostra coletada no Estado Rio Grande do Sul. A amostra D5 foi uma das três submetidas a liofilização e a única, destas três, cujo resultado estava de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira. As amostras liofilizadas (D2, D4 e D5) foram processadas pela mesma empresa, porém D5 permaneceu no liofilizador por cerca de 30 minutos a mais. Na amostra C1 nota-se um teor de umidade superior aos demais produtos enviados por este produtor (C2: 6,8 e C3: 6,4), o que pode estar relacionado às diferentes temperaturas empregadas durante o processamento (C1: temperatura ambiente; C2 e C3: 45°C).

Países como Argentina e Suíça estabeleceram limite máximo de 8% de umidade para o pólen apícola desidratado (ARGENTINA, 2010; SUIÇA, 2005) e, neste caso, apenas duas amostras (3%) estariam fora do padrão. Ao avaliar as legislações de todos os países, Bogdanov (2012) observou que o máximo de umidade permitido no produto desidratado foi de 10%. O autor também concluiu que valores acima deste tornariam o produto mais susceptível à fermentação. Campos *et al.* (2008) sugerem que o teor de umidade no pólen apícola desidratado deve ficar entre 6 a 8% para que o produto mantenha sua qualidade por um período de dois anos. Ainda segundo estes autores, umidade abaixo de 5% resultaria em maior vida de prateleira, mas também em um produto menos atrativo do ponto de vista sensorial. Nogueira *et al.*, (2012) citaram que um processo de desidratação drástico e que resulte em umidade abaixo de 3% pode provocar descoloração e reações químicas indesejáveis, resultando em odor e sabor desagradáveis.

O teor de umidade nas amostras oriundas do Estado de São Paulo variou de 3,6 a 7,6, Bahia de 4,3 a 7,8, Sergipe de 7,2 a 7,7, Rio Grande do Norte de 4,4 a 8,1,

Rio Grande do Sul de 3,8 a 10,2, Paraná de 4,7 a 6,0, Santa Catarina de 5,0 a 6,8, Mato Grosso de 7,1 a 7,8 e na amostra de Mato Grosso do Sul foi de 7,5 g/100 g. Arruda *et al.* (2013), ao avaliarem sete amostras oriundas de São Paulo e utilizando a mesma balança eletrônica adaptada com secador infravermelho, observaram teores de umidade de 3,2 a 4,0 g/100 g. Carpes (2008) determinou o teor de umidade de 36 amostras procedentes da Região Sul do Brasil em estufa a vácuo a 60°C e observou valores de 1,7 a 7,8 g/100 g de umidade. Barreto, Funari e Orsi (2005a) analisaram amostras coletadas nos Estados de Sergipe e Bahia e observaram teores de umidade variando de 3,8 a 4,1 e de 2,0 a 6,7 g/100 g, respectivamente. Os pesquisadores realizaram as análises em estufa a 105°C.

De acordo com Barreto, Funari e Orsi (2005a), variações no conteúdo de umidade podem estar relacionadas aos parâmetros tempo e temperatura de desidratação. Além disso, segundo Marchini, Reis e Moreti (2006), o pólen apícola desidratado é um produto altamente higroscópico, de modo que se o beneficiamento, após a desidratação, não ocorrer em ambiente com umidade relativa do ar controlada pode haver reabsorção de água, principalmente em períodos chuvosos. Almeida-Muradian, Arruda e Barreto (2012) recomendaram o uso de desumidificador na sala de desidratação.

Considerando-se a umidade relativa do ar e os índices pluviométricos nas áreas de produção tem-se que as seis amostras com teor de umidade abaixo de 4% (D5, G4, G6, G7, K3 e K4) foram coletadas e processadas quando, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2015), as médias de umidade relativa do ar (%) e precipitação total (mm) foram de 70% e 0 mm nas regiões de São Paulo onde as amostras D5, G4, G6 e G7 foram produzidas, e de 60% e 0 mm na região do Rio Grande do Sul onde foram coletados os produtos K3 e K4. As amostras com maior conteúdo de umidade (C1: 10,2%, F1: 8,1%, B1: 7,8%) foram produzidas e beneficiadas quando a umidade relativa do ar e precipitação total foram de 68% e 0 mm (C1), 70% e 0 mm (F1) e 57% e 0 mm (B1) nas áreas próximas aos locais de produção. Assim, no presente estudo, estes dois pontos parecem não ter influenciado no conteúdo de umidade das amostras, e sim, as condições de desidratação (tipo de equipamento, tempo, temperatura).

Os apicultores não dispõem de mecanismos confiáveis para determinar o teor de umidade durante o processamento, que é finalizado quando, visualmente e pelo tato e paladar, supõe-se que o produto esteja dentro do padrão. Melo e

Almeida-Muradian (2011) concluíram que a medida da umidade em balança eletrônica de precisão adaptada com secador infravermelho é um dos métodos mais precisos para determinar este parâmetro, portanto, o ideal seria que cada unidade de processamento contasse com este equipamento para que análises fossem realizadas ao longo do processo, possibilitando que fosse interrompido, apenas, quando o limite máximo de 4% fosse alcançado.

Quanto ao uso de aditivos, produtores e entrepostos responderam que não utilizavam. A legislação proíbe o uso destas substâncias tanto no pólen apícola comercializado *in natura* quanto no produto desidratado. Alguns produtores foram questionados quanto ao motivo do não uso de aditivos e todos afirmaram que não o fazem por se tratar de um produto natural que deve ser comercializado sem adição de qualquer substância. De que se tem notícia, este é o primeiro inquérito realizado no Brasil a respeito do uso de aditivos alimentares pelos produtores ou entrepostos de pólen apícola. Estudos semelhantes, com apicultores de outros países, também não foram encontrados.

A vegetação visitada pelas abelhas foi presumida por 14 produtores para 46 amostras. Em 41% dos casos, a presença de alguma das plantas indicadas foi confirmada pela análise polínica (Tabela 2). Nota-se que, em alguns casos, os apicultores listaram uma variedade de plantas, mas apenas uma ou duas foram efetivamente utilizadas pelas abelhas, enquanto outros informaram simplesmente “vegetação nativa” ou “mata atlântica”. Estes resultados mostram que falta a muitos apicultores uma boa percepção a respeito das fontes poliníferas em seus apiários, o que permitiria o cultivo e manutenção de espécies de importância apícola, migração de colmeias ao longo do ano e o uso desta informação no rótulo dos produtos. Sattler (2013) também observou divergências entre a percepção dos apicultores e o resultado da análise polínica em amostras de pólen apícola coletadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Embora nem todas as plantas presumidas pelos apicultores tenham sido identificadas nas amostras, estas informações foram tabuladas porque podem auxiliar em estudos futuros de identificação dos táxons. A análise polínica é um procedimento amplamente utilizado para determinar famílias, gêneros ou espécies botânicas no pólen apícola, porém, esta determinação depende de dados já catalogados (DÓREA; NOVAIS; SANTOS, 2010). Se no momento da análise houver dúvidas quanto a classificação do táxon, informações fornecidas pelos apicultores

podem auxiliar na interpretação e sinalizar espécies que sejam fontes de pólen para as abelhas cujos grãos, ainda, não foram catalogados.

**Tabela 2.** Percepção dos produtores quanto a vegetação visitada pelas abelhas e táxons identificados pela análise polínica de 46 amostras de pólen apícola desidratado.

Amostra* (Origem)	Florada presumida**	Origem botânica confirmada** (nome vulgar)
A1 (SE)	<b>palmáceas; sabiá;</b> cajueiro; mata atlântica; alecrim do campo; velame	<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> ( <b>sabiá</b> , unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>Cocos nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> )
A2 (SE)	<b>palmáceas; sabiá;</b> cajueiro; mata atlântica; alecrim do campo; velame	<i>M. caesalpiniaefolia</i> ( <b>sabiá</b> , unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>C. nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> )
B1 (BA)	<b>coqueiro</b>	<i>C. nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> ); <i>M. scabrella</i> (bracatinga); <i>Eucalyptus</i> (eucalipto); Asteraceae
C1 (RS)	nêspera; trevo silvestre; <b>nabo silvestre;</b> cipó caboclo; corda de viola; cipó de viado	<i>Brassica</i> (mostarda, <b>nabo</b> ); Asteraceae; <i>Eucalyptus</i> (eucalipto)
C2 (RS)	nêspera; trevo silvestre; <b>nabo silvestre;</b> cipó caboclo; flor de pessegueiro; ameixa de verão; nectarina; acácia mimosa	<i>Brassica</i> (mostarda, <b>nabo</b> );
C3 (RS)	nêspera; trevo silvestre; <b>nabo silvestre;</b> cipó caboclo; flor de pessegueiro	<i>Brassica</i> (mostarda, <b>nabo</b> ); <i>Eucalyptus</i> (eucalipto); Asteraceae
D1 (SP)	vegetação nativa	<i>Eucalyptus</i> (eucalipto); Asteraceae; <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo)
D2 (SP)	vegetação nativa	<i>Eucalyptus</i> (eucalipto); Asteraceae; <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo)
D3 (SP)	vegetação nativa	<i>Eupatorium</i> ; <i>Elephantopus</i> ; <i>Eucalyptus</i> (eucalipto); Piper (caapeba); Cyperaceae (tiriricas)
D4 (SP)	vegetação nativa	<i>Eupatorium</i> ; Piper (caapeba); <i>Elephantopus</i> ; Anacardiaceae
D5 (SP)	vegetação nativa	<i>Eupatorium</i> ; Piper (caapeba); <i>Elephantopus</i>

(Continua)

Tabela 2. Continuação...

Amostra* (Origem)	Florada presumida**	Origem botânica confirmada** (nome vulgar)
E1 (BA)	<b>eucalipto</b>	<i>C. nucifera</i> (palmácea/coqueiro); <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>Eucalyptus</i> ( <b>eucalipto</b> );
E2 (BA)	<b>eucalipto</b> ; cupuba	<i>Eucalyptus</i> ( <b>eucalipto</b> ); <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>C. nucifera</i> (palmácea/coqueiro)
E3 (BA)	<b>coqueiro</b>	<i>Eucalyptus</i> (eucalipto); <i>C. nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> ); <i>Eupatorium</i>
E4 (BA)	acácia; capim	<i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>Eucalyptus</i> (eucalipto); <i>C. nucifera</i> (palmácea/coqueiro)
E5 (BA)	<b>cafeeiro</b>	<i>Eucalyptus</i> (eucalipto); <i>Coffea</i> ( <b>cafeeiro</b> ); <i>C. nucifera</i> (palmácea/coqueiro); Asteraceae
E6 (BA)	<b>cafeeiro</b> ; vegetação nativa	<i>Coffea</i> ( <b>cafeeiro</b> ); <i>C. nucifera</i> (palmácea/coqueiro); <i>Eupatorium</i> ; <i>Myrcia</i> (murta); Poaceae (gramíneas)
E7 (BA)	acácia	Rubiaceae; <i>Eucalyptus</i> (eucalipto); <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>C. nucifera</i> (palmácea/coqueiro)
F1 (RN)	<b>coqueiro</b>	<i>M. scabrella</i> (bracatinga); <i>C. nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> ); <i>Eucalyptus</i> (eucalipto)
F2 (RN)	coqueiro; melancia	<i>M. scabrella</i> (bracatinga); <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>M. verrucosa</i>
G1 (SP)	mata atlântica	<i>Syagrus</i> (jerivá); <i>Eupatorium</i> ; <i>Myrcia</i> (murta); <i>Cecropia</i> (embaúba)
G2 (SP)	mata atlântica	<i>Syagrus</i> (jerivá); Fabaceae; <i>Vernonia</i>
G3 (SP)	mata atlântica	<i>Astrocaryum</i> ; <i>Ilex</i> ; <i>Vernonia</i>

(Continua)

Tabela 2. Continuação...

Amostra* (Origem)	Florada presumida**	Origem botânica confirmada** (nome vulgar)
G4 (SP)	mata atlântica	<i>Eupatorium</i> ; <i>Syagrus</i> (jerivá); <i>Vernonia</i>
G5 (SP)	ingá; palmito-jussara; <b>jerivá</b>	<i>Myrcia</i> (murta); <i>Ilex</i> ; <i>Syagrus</i> ( <b>jerivá</b> ); <i>Cecropia</i> (embaúba)
G6 (SP)	ingá; palmito-jussara; <b>jerivá</b> ; areca; cupiuva; fenix; sibipiruna	<i>Piper</i> (caapeba); <i>Cecropia</i> (embaúba) <i>Myrcia</i> (murta); <i>Schinus</i> (aroeiras); <i>Syagrus</i> ( <b>jerivá</b> )
G7 (SP)	jambolão; jerivá; areca; caquera/carqueja	<i>Piper</i> (caapeba); <i>Astrocaryum</i> ; <i>Cecropia</i> (embaúba); <i>Ilex</i>
G8 (SP)	jambolão; jerivá; areca; caquera/carqueja	<i>Cecropia</i> (embaúba); <i>Myrcia</i> (murta); <i>Piper</i> (caapeba)
G9 (SP)	mata atlântica	Arecaceae; <i>Cecropia</i> (embaúba)
G10 (SP)	mata atlântica	<i>C. nucifera</i> (palmácea/coqueiro); <i>Cecropia</i> (embaúba); <i>Myrcia</i> (murta); <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo)
G11 (SP)	mata atlântica	Arecaceae; <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>Cecropia</i> (embaúba)
H1 (PR)	mil-flores; vegetação nativa	<i>M. scabrella</i> (bracatinga); <i>Brassica</i> (mostarda, nabo)
I1 (BA)	vegetação nativa; dendê	<i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); Arecaceae; <i>Cecropia</i> (embaúba)
I2 (BA)	vegetação nativa; <b>palmáceas</b>	<i>C. nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> )
M1 (BA)	vegetação nativa	<i>Astrocaryum</i> ; <i>Astronium</i> ; <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>M. verrucosa</i> (jurema-mansa, jurema- branca)
M2 (BA)	vegetação nativa	Fabaceae; Myrtaceae

(Continua)

**Tabela 2.** Continuação...

<b>Amostra* (Origem)</b>	<b>Florada presumida**</b>	<b>Origem botânica confirmada** (nome vulgar)</b>
S1 (SP)	<b>angico; palmácea</b>	<i>Anadenanthera</i> ( <b>angico</b> ); <i>C. nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> ); <i>M. scabrella</i> (bracatinga); Malvaceae
S2 (SP)	<b>cosmo; margaridão</b>	<i>Alternanthera</i> (quebra-panela); <i>M. caesalpiniaefolia</i> (sabiá, unha-de-gato, sansão-do-campo); <i>Ricinus</i> (mamona); Asteraceae ( <b>margaridão, cosmo</b> ); Poaceae (gramíneas)
S3 (SP)	bambu	<i>Alternanthera</i> (quebra-panela)
S4 (SP)	cipó-de-são-joão	<i>Alternanthera</i> (quebra-panela)
S5 (SP)	assa-peixe	<i>Alternanthera</i> ; <i>Vernonia</i> ( <b>assa-peixe</b> )
S6 (SP)	vegetação nativa	<i>Alternanthera</i> ; <i>Montanoa</i>
S7 (SP)	<b>angico</b>	<i>Anadenanthera</i> ( <b>angico</b> ); <i>Schinus</i> (aroeiras)
T1 (RN)	velame; catanduva; cabeça-de-velho; fato-de-piaba	<i>M. scabrella</i> (bracatinga)
U1 (RN)	palmáceas; vegetação nativa	<i>M. verrucosa</i> (jurema-mansa, jurema- branca); <i>C. nucifera</i> ( <b>palmácea/coqueiro</b> ); <i>Richardia</i> (ipepacuanha)
Z1 (MS)	açoita-cavalo; capitão	Fabaceae; <i>Anadenanthera</i> ; Melastomataceae (quaresmeiras); <i>Ricinus</i> (mamona); <i>Cecropia</i> (embaúba)

\*Letras iguais indicam pólen de um mesmo produtor/entreposto. Números indicam lote;

\*\*Em negrito as concordâncias.

## 4 CONCLUSÃO

A produção de pólen apícola ocorreu em pequenas e médias propriedades, principalmente, durante a primavera. As práticas de produção e beneficiamento variam entre as unidades e os produtores respeitam o não uso de aditivos. Com base na legislação brasileira, há falhas quanto a temperatura adotada para o processo de desidratação e no teor de umidade final, sendo necessários ajustes

para que não haja empecílios à comercialização do produto. O processo de liofilização é pouco utilizado, talvez pelo custo do equipamento, por falta de conhecimento a respeito ou da necessidade de estudos que comprovem as vantagens desse processo. Alguns apicultores foram capazes de perceber as fontes poliníferas das abelhas e, mesmo quando não o foram, forneceram informações que podem contribuir para estudos futuros de origem botânica deste produto.

## 5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; ARRUDA, V.A.S.; BARRETO, L.M.R.C. **Manual de Controle de Qualidade do Pólen Apícola**. São Paulo: APACAME, 2012. 28 p.

ALVES, M.L.T.M.F. Pólen - alimento e grande fonte de renda para o apicultor. **Apta Regional**, v.10, n.2, 2013a.

ALVES, M.L.T.M.F. Produção de pólen apícola. **Apta Regional**, v.10, n.2, 2013b.

ARGENTINA. Ley nº 18.284, de 30 de junio de 1971. La Secretaría de Estado de Salud Pública establece la vigencia de las normas higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial contenidas en el Código Alimentario Argentino. **Boletín Oficial**, Buenos Aires, 20 set. 1971.

ARRUDA, V.A.S. **Estabilidade de vitaminas do complexo B em pólen apícola**. São Paulo, 2009. 105p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ARRUDA, V.A.S.; SANTOS-PEREIRA, A.A.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n.2, p.100-105, 2013.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete Estados brasileiros e do Distrito Federal, **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.2, p.167-175, 2005a.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. In: CONGRESSO DE APICULTURA DEL MERCOSUR, 1, Punta Del Este, 2005b. **Anais**. Punta Del Este: Sociedad de Apicultores Uruguayo, 2005. p.20.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen dominante. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.2, p.351-366, 1970a.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 2. Pólen acessório. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.3, p.571-590, 1970b.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 3. Pólen isolado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.4, p.747-772, 1970c.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.

BOGDANOV, S. The bee pollen book: chapter 1, 2012. Disponível em: <[www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net)>. Acesso em: 15 fev. 2013.

BRADBPEAR, N. The importance of apiculture for rural livelihoods. In: \_\_\_\_\_. **Bees and their role in forest livelihoods**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009. cap.4. p.17-27.

BRASIL. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 2001. Seção 1, p.18.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

DÓREA, M.C.; NOVAIS, J.S.; SANTOS, F.A.R. Botanical profile of bee pollen from the southern coastal region of Bahia, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.3, p.862-867, 2010.

FAPCEN. Fundação de Apoio à Pesquisa do Corredor de Exportação Norte. **Proposta de integração apicultura e silvicultura será apresentada no TO**, 2011. Disponível em: <<http://www.fapcen.agr.br/?p=451>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

FBB. Fundação Banco do Brasil. **Apicultura: desenvolvimento regional sustentável**. Brasília: Banco do Brasil, 2010. 47p.

HERVATIN, H.L. **Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola *in natura* e desidratado sob diferentes temperaturas**. Campinas, 2009. 99p. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **BDMEP – Dados históricos**, 2015. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 03 set. 2015.

MALERBO-SOUZA, D.T.; SILVA, F.A.S. Comportamento forrageiro da abelha africanizada *Apis mellifera* L. no decorrer do ano. **Maringá**, v.33, n.2, p.183-190, 2011.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.1, p.194-197, 2011.

MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. **Química Nova**, v.33, n3, p.514-518, 2010.

MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA-NETO, J.A.A. Flora de importância polinífera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.1145-1153, 2011.

MORETI, A.C.C.C. **Pólen: alimento protéico para as abelhas, complemento alimentar para o homem**, 2006. Disponível em: <[www.iz.sp.gov.br](http://www.iz.sp.gov.br)>. Acesso em: 24 abr. 2011.

MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, V.C.; RODRIGUES, R.R. **Atlas do pólen de plantas apícolas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual. 2002. 88p.

NEGRÃO, A.F. **Efeito da sazonalidade no teor proteico e composição de aminoácidos no pólen apícola produzido em Botucatu, Estado de São Paulo.** Botucatu, 2014. 56p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

NOGUEIRA, C.M.P. **Estudo do pólen apícola comercial.** Bragança, 2012. 62p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Bragança.

NOGUEIRA, C.; IGLESIAS, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.11173-11187, 2012.

ODOUX, J.F.; FEUILLET, D.; AUPINEL, P.; LOUBLIER, Y.; TASEI, J.N.; MATEESCU, C. Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies. **Apidologie**, v.43, n.5, p.561-575, 2012.

OLIVEIRA, K.C.L.S. **Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadores do processo de desidratação.** 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. **Produção de mel**, 2003. Disponível em: <[www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br](http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br)>. Acesso em: 15 mai. 2011.

SATTLER, J.A.G. **Quantificação das vitaminas antioxidantes E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A ( $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil.** São Paulo, 2013. 140p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequena Empresa. **Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia: sumário executivo**, 2007. Disponível em: <[www.sebrae.com.br](http://www.sebrae.com.br)>. Acesso em: 01 mai. 2011.

SUIÇA. Ordonnance du DFI 817.022.108 du 23 novembre 2005. Le Département fédéral de l'intérieur établit l'ordonnance sur les denrées alimentaires d'origine animale. **Droit interne**, Suisse, 01 jan. 2005.

# CAPÍTULO 4

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO MONOFLORAL E HETEROFLORAL, PRODUZIDO NO BRASIL

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o perfil físico-químico e as propriedades biológicas de 64 amostras de pólen apícola desidratado, correlacionar os resultados e, ainda, avaliar a influência da origem botânica, aplicando uma abordagem multivariada para a análise dos resultados. Foram determinados teores de proteínas (micro-Kjeldahl), lipídeos (Soxhlet), cinzas (mufla à 550°C) e carboidratos (diferença); valor energético (fórmula padrão); teores de ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco, manganês, sódio e potássio (espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado); parâmetros instrumentais de cor (refletância); capacidade antioxidante (método *ORAC* e método *DPPH*); capacidade antimicrobiana frente a bactérias e leveduras (microdiluição em microplacas); teor de fenólicos totais (reação com Folin Ciocalteu) e flavonoides totais (reação com nitrato de alumínio); e origem botânica (identificação e contagem dos tipos polínicos). Os compostos fenólicos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas. Os resultados indicaram teor de carboidratos de 54,9 a 82,8 g/100 g, proteínas de 7,9 a 32,2 g/100 g, lipídeos de 3,2 a 13,5 g/100 g e cinzas de 1,9 a 3,6 g/100 g, respectivamente. Algumas amostras foram consideradas “fonte” ou “alto conteúdo” de ferro, manganês, zinco, magnésio e cobre. O teor de fenólicos totais variou de 5,56 a 29,74 mg EAG/g e flavonoides totais de 0,31 a 18,96 mg EQ/g de amostra. A identificação dos compostos fenólicos sugeriu a prevalência de flavonoides. A capacidade antioxidante variou de 133,15 a 562,98  $\mu\text{mol ET/g}$ , pelo método *ORAC*, e de 9,43 a 154,73  $\mu\text{mol ET/g}$ , pelo método *DPPH*. Todas as amostras apresentaram ação antimicrobiana contra os microorganismos testados. A análise instrumental de cor indicou que os valores de  $L^*a^*b^*$  e Chroma são fortes indicativos da presença de cálcio, magnésio e ferro nas amostras. Com o resultado das análises multivariadas observou-se que, no geral, teor de fenólicos totais, capacidade antimicrobiana, capacidade antioxidante e parâmetros instrumentais de cor são variáveis que discriminam as amostras, porém,

não são absolutos para classificá-las de acordo com a origem botânica e a Região de origem. As características do pólen apícola variam de acordo com a origem botânica e com o local onde a amostra foi produzida e, quando se considera a média geral, não há diferença significativa entre amostras monoflorais e heteroflorais.

**Palavras-chave:** pólen apícola; valor nutricional; minerais; propriedades biológicas; espectrometria de massas, análise multivariada.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the physicochemical profile and biological properties of 64 dehydrated bee-pollen samples, to correlate the results and also to evaluate the influence of botanical origin on the profiles, applying a multivariate approach to the data analysis. The contents of proteins (micro-Kjeldahl), lipids (Soxhlet), ashes (oven at 550°C), carbohydrates (difference), iron, copper, calcium, magnesium, zinc, manganese, sodium and potassium (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) were determined; as well as the energy value (standard formula); the color instrumental parameters (reflectance); the antioxidant capacity (ORAC and DPPH methods); the antimicrobial capacity against bacteria and yeasts (microdilution in microplates); the content of total phenolic (reaction with Folin Ciocalteu) and total flavonoids (reaction with aluminum nitrate); and botanical origin (identification and counting of pollen types). Phenolic compounds were identified by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. The results indicated carbohydrates content ranged from 54.9 to 82.8 g/100 g; proteins from 7.9 to 32.2 g/100 g; lipids 3.2 to 13.5 g/100 g; and ashes from 1.9 to 3.6 g/100 g, respectively. According to Brazilian legislation, some samples were considered "source" or "high content" of iron, manganese, zinc, magnesium and copper. The total phenolic content varied from 5.56 to 29.74 mg GAE/g of sample and total flavonoids varied from 0.31 to 18.96 mg EQ/g. The identification of phenolic compounds suggested the prevalence of flavonoids. The antioxidant capacity by ORAC method varied from 133.15 to 562.98  $\mu\text{mol ET/g}$  and by DPPH method ranged from 9.43 to 154.73  $\mu\text{mol ET/g}$ . All samples showed antimicrobial activity against tested microorganisms. The instrumental analysis indicated that color values of L\*, a\*, b\* and Chroma are strong indicative of the presence of calcium, magnesium and

iron in the samples. As a result of the multivariate analysis it was found that, overall, the total phenolic content, antimicrobial capacity, antioxidant capacity and color instrumental parameters are variables that discriminate samples, however, are not sufficient to classify them. The bee-pollen characteristics vary according to the botanical origin and the place where the sample was produced. Finally, when it is considered the overall average, there were no significant differences between monofloral and heterofloral samples.

**Keywords:** bee-pollen; nutritional value; minerals; biological properties; mass spectrometry; multivariate analysis.

## 1 INTRODUÇÃO

A degradação ambiental no Brasil está fortemente relacionada ao corte de árvores para fins comerciais e a expansão das atividades agropecuárias (CUNHA *et al.*, 2008; ARRAES; MARIANO; SIMONASSI, 2012), de modo que, por muitos anos, os impactos ambientais negativos foram pouco considerados e a produção em larga escala a principal preocupação (CUNHA *et al.*, 2008). Assim, é evidente a necessidade de sistemas de produção sustentáveis e, neste contexto, a apicultura é uma alternativa, podendo servir como fonte principal ou complementar de renda, independente ou integrada a cultivos comerciais (CUNHA *et al.*, 2008; FAPCEN, 2011; TOLEDO *et al.*, 2011; DRUMOND, 2013). As abelhas são os principais polinizadores de plantas selvagens e cultivadas, desempenhando um papel fundamental na produção de frutos e vegetais, na manutenção da biodiversidade e, conseqüentemente, na dieta de seres humanos e animais (SLOW FOOD, 2015).

Um dos principais produtos da apicultura, o pólen apícola, alimento produzido pelas abelhas a partir dos grãos de pólen colhidos das plantas, serve como fonte de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais para a colônia. As características físico-químicas deste produto variam em função da origem botânica, portanto, em um país de dimensões continentais como o Brasil, onde muitas espécies vegetais são fontes de pólen para as abelhas, pressupõe-se que sejam produzidos vários tipos de pólen apícola com composição variada (IBGE, 2004; CAMPOS *et al.*, 2008; BARTH *et al.*, 2010; MODRO *et al.*, 2011).

O pólen apícola contém macro e micronutrientes, com destaque para o elevado teor de proteínas, que pode chegar a 62 g/100 g, e para o conteúdo de minerais essenciais para o organismo humano, como ferro e zinco, cujas quantidades por porção podem ser suficientes para considerar algumas amostras como “fonte” ou até mesmo “alto conteúdo” destas substâncias (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012; MORGANO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013).

Compostos de potencial biológico, como os compostos fenólicos, também são encontrados no pólen apícola. A estes já foram atribuídas ação antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, anti-osteoporose, antialérgica, antiarterosclerose, antimutagênica, imunoestimulante, hepatoprotetora e cardioprotetora (CAMPOS *et al.*, 2010; KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015). Os compostos fenólicos podem ser identificados e quantificados por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (LV *et al.*, 2015) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (ANGELO; JORGE, 2007; NEGRI *et al.*, 2011; LV *et al.*, 2015).

O valor nutricional e biológico do pólen apícola tem despertado o interesse de pesquisadores para estudos de identidade e qualidade deste alimento, contudo, muitos dos produtos que são comercializados permanecem com suas características físico-químicas e propriedades biológicas desconhecidas. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar amostras de pólen apícola desidratado quanto ao seu perfil físico-químico e propriedades biológicas, correlacionar os resultados e, ainda, avaliar a influência da origem botânica, aplicando uma abordagem multivariada para a análise dos resultados.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAS**

Durante os anos de 2011 a 2013, foram adquiridas 64 amostras de pólen apícola desidratado, beneficiadas sob condições de rotina em cada unidade e prontas para a comercialização. As amostras foram coletadas em 28 apiários, localizados em nove Estados (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São

Paulo, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Norte, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) de quatro Regiões (Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste). De cada unidade produtora foi adquirido um número variável de lotes, definido conforme a safra e o volume de produção. As amostras foram encaminhadas, à temperatura ambiente, ao Laboratório de Análise de Alimentos (LAA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foram codificadas conforme o fornecedor (letra) e o lote (número) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Código, origem e data de coleta das 64 amostras de pólen apícola desidratado adquiridas para este estudo.

<b>Amostra*</b>	<b>Origem/Estado</b>	<b>Data de Coleta</b>
A1	Sergipe	12 a 20/04/12
A2	Sergipe	21/04 a 11/05/12
B1	Bahia	10/05/12
C1	Rio Grande do Sul	05/05/12
C2	Rio Grande do Sul	28/06/12
C3	Rio Grande do Sul	28/07/12
D5	São Paulo	set/12
E1	Bahia	01/08/12
E2	Bahia	19/06/12
E3	Bahia	16/09/12
E4	Bahia	06/10/12
E5	Bahia	12/08/12
E6	Bahia	23/09/12
E7	Bahia	23/07/12
F2	Rio Grande do Norte	25/09/12
G1	São Paulo	03/09/12
G2	São Paulo	18/09/12
G3	São Paulo	03/10/12
G4	São Paulo	16/10/12
G5	São Paulo	16/10 a 25/10/12
G6	São Paulo	25/10 a 08/11/12
G7	São Paulo	14/11 a 19/11/12
G8	São Paulo	20/11 a 04/12/12
G9	São Paulo	06/12 a 13/12/12
G10	São Paulo	08/01 a 15/01/13
G11	São Paulo	18/01 a 25/01/13
H1	Paraná	14/09/12
I1	Bahia	21/06/12
I2	Bahia	18/09/12
J1	Santa Catarina	set/12
K1	Rio Grande do Sul	05/10/12
K2	Rio Grande do Sul	25/10/12
K3	Rio Grande do Sul	15/11/12
K4	Rio Grande do Sul	05/12/12

(Continua)

**Tabela 1.** Continuação...

<b>Amostra*</b>	<b>Origem/Estado</b>	<b>Data de Coleta</b>
L1	Rio Grande do Sul	15/10 a 30/10/12
L2	Rio Grande do Sul	01/11 a 20/11/12
L3	Rio Grande do Sul	25/11 a 10/12/12
M1	Bahia	28/11/12
M2	Bahia	11/02/13
N1	Santa Catarina	2011
O1	Mato Grosso	2012
P1	Mato Grosso	set/2013
Q1	Bahia	26/04 a 04/05/13
R1	Bahia	25/04 a 01/05/13
S1	São Paulo	ago-set/12
S2	São Paulo	01/05 a 26/05/13
S3	São Paulo	27/05 a 07/06/13
S4	São Paulo	11/06 a 07/07/13
S5	São Paulo	08/07 a 04/08/13
S6	São Paulo	05/08 a 29/08/13
S7	São Paulo	30/08 a 15/09/13
T1	Rio Grande do Norte	01/10/12
U1	Rio Grande do Norte	05/10/12
V1	Bahia	jun/13
X1	Bahia	jun/13
Z1	Mato Grosso do Sul	05/09/13
AA1	Paraná	mai/13
AA2	Paraná	dez/13
AB1	Paraná	nov/13
AC1	São Paulo	set/13
AC2	São Paulo	nov/13
AC3	São Paulo	dez/13
AD1	São Paulo	dez/12
AD2	São Paulo	jun/13

\*Letras iguais indicam amostras procedentes de um mesmo produtor/entreposto. Números indicam o lote.

No LAA, parcelas de todas as amostras foram tomadas e enviadas, à temperatura ambiente, para:

- Laboratório de Microbiologia (LM) da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA-IPB), Bragança/Portugal, onde foram realizadas as análises de capacidade antimicrobiana e de identificação e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, em parceria com a pesquisadora Dra Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho;

- Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (LMMV) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, onde foram realizadas as análises polínicas, em parceria com os pesquisadores Dra Ortrud Monika Barth e Alex da Silva de Freitas;
- Centro de Tecnologia Agrícola e Ambiental (CTAA), onde foram realizadas as determinações de minerais.

No LAA e no LM, as amostras foram armazenadas à temperatura de -4°C até o momento da análise e, então, retiradas do congelador antes dos ensaios para que, à temperatura ambiente, fossem preparadas como requerido para cada experimento. No LMMV e no CTAA as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente.

## 2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Previamente às análises, as amostras foram trituradas em moinho analítico para granulometria de 0,595 mm. Apenas para o preparo dos extratos metanólicos e para a realização das análises polínicas não foi necessário triturar as amostras.

## 2.3 PREPARO DOS EXTRATOS

O extrato etanólico (ETE) foi preparado conforme procedimento descrito por Carpes *et al.* (2007), com algumas modificações. Os compostos de interesse foram extraídos de 2 g de amostra com 25 mL etanol (Grau P.A., Synth) a 70%, em banho-maria (70°C), sob agitação (105 rpm), por 30 min. Os extratos foram filtrados com papel qualitativo (porosidade: 3 micras) para um balão volumétrico de 25 mL e o volume ajustado com etanol a 70%. Os ETE foram armazenados em vidro âmbar, à temperatura de 0°C. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

Para o preparo do extrato metanólico (EME) foi adotado o procedimento descrito por Morais *et al.* (2011). 2 g de amostra e 4 mL de metanol (Grau P.A., Synth) foram misturados e deixados a macerar por 72 h, à temperatura ambiente e abrigo da luz. Então, a mistura foi filtrada com papel qualitativo (porosidade: 3

micras) e o resíduo re-extraído sob as mesmas condições. Por fim, os filtrados foram combinados e, em seguida, procedeu-se a evaporação do solvente em evaporador rotatório a vácuo (Buchi, RE-111 com banho aquecido B-461), à temperatura de 45°C durante, aproximadamente, 1h. O extrato seco foi armazenado à temperatura ambiente e abrigo da luz. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

## 2.4 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado com base em procedimento descrito por Singleton *et al.* (1999) e Carpes *et al.* (2008), com poucas modificações. Os ETE foram diluídos na proporção de 1:25 em etanol a 70% e alíquotas de 0,5 mL destas diluições foram transferidas para tubos de ensaio. Aos tubos foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteau (Sigma-Aldrich), previamente diluído em água deionizada Milli-Q na proporção de 1:10 (mL:mL), e feita a homogeneização em vortex por 2 s. Após 5 a 8 min, o pH do meio foi elevado com adição de 2 mL de carbonato de sódio (Grau P.A., Synth) a 4%. O branco foi conduzido nas mesmas condições, porém com etanol a 70%, sem extrato.

O sistema permaneceu em repouso por 2 h, à temperatura ambiente e abrigo da luz, para a redução dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco presentes no reagente pelos compostos fenólicos do extrato, formando um complexo de cor azul que absorve na faixa de 620 a 740 nm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu (UV 1650 PC), com absorbância em 740 nm e temperatura de trabalho de 20°C. O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras em uma curva analítica construída com seis concentrações, entre 5 e 100 ppm, de ácido gálico (Sigma-Aldrich) em etanol a 70%. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.5 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de flavonoides totais foi determinado conforme procedimento descrito por Carpes *et al.* (2008), com algumas modificações. Os ETE foram diluídos na

proporção de 1:10 (mL:mL) em etanol a 70% e alíquotas de 0,5 mL destas diluições foram transferidas para tubos de ensaio. Aos tubos foram adicionados 4,3 mL de etanol a 80% e 0,1 mL de nitrato de alumínio (Grau P.A., Synth) a 10%, respectivamente e, em seguida, procedeu-se a homogeneização em vortex por 2 s.

Após 5 a 8 minutos, 0,1 mL de acetato de potássio (Grau P.A., Synth) a 10% foi adicionado aos tubos, que foram, enfim, armazenados à temperatura ambiente e abrigo da luz, por 40 minutos. Este período foi necessário para que os flavonoides presentes no extrato formassem complexos estáveis com o alumínio, promovendo alteração na coloração do meio que foi, então, aferida em espectrofotômetro. O branco foi conduzido nas mesmas condições, utilizando-se etanol a 70% como amostra, sem extrato, e sem adição de solução de nitrato de alumínio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu (UV 1650 PC) com absorvância em 415 nm, que corresponde ao pico de absorção do complexo flavonoides-alumínio. A temperatura de trabalho do equipamento foi mantida em 20°C.

Foi construída uma curva analítica com seis concentrações (5 a 100 ppm) de quercetina (Sigma-Aldrich), para interpolação da absorvância das amostras. As soluções de quercetina foram preparadas em etanol a 70%. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ) por g de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

### 2.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ou *high-performance liquid chromatography (HPLC)*, foi realizada com base em procedimento descrito por Rubilar *et al.* (2007), com modificações. O cromatógrafo utilizado foi um Shimadzu (Software LabSolutions), com forno para coluna (CTO-10AS VP), sistema de injeção (LC-20AD), amostrador automático (SIL-20A HT) e detector de arranjo de fotodiodo – *diode array detector (DAD)* (SPD-M20A), equipado com coluna de fase reversa Gemini C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm; 5 µm) da Phenomenex.

Os ETE foram filtrados com filtro de nylon 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) para *vials* âmbar e o volume injetado foi de 20  $\mu\text{L}$ . A fase móvel foi composta por água (solvente A) e metanol (solvente B), ambos acidificados com ácido fórmico (Sigma-Aldrich) a 0,1%, e foi utilizada a 1,0 mL/min. Os eluentes foram previamente filtrados com filtro de nylon (porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , Whatman) e desgaseificados por 10 min em sonicador. A fase móvel foi eluída em modo gradiente da seguinte maneira: 0 min, 15% de B em A; 20 min, 30% de B em A; 40 min, 45% de B em A; 45 min, 50% de B em A; 50 min, 55% de B em A; 65 min, 70% de B em A; 75 min, 100% de B; manteve-se 100% de B (75-80 min); então, a composição da fase móvel regressou às condições iniciais nos 10 minutos seguintes e estas condições foram mantidas durante mais 10 minutos para estabilização da coluna antes da próxima injeção. Durante as análises a temperatura da coluna foi mantida em 25°C.

A detecção dos compostos fenólicos foi realizada por varredura entre 190 e 600 nm e a quantificação a 280 nm para os flavan-3-óis monoméricos (catequina e epicatequina), ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatéquico, ácido siríngico e ácido  $\beta$ -resorcílico), naringina, naringenina e ácido cinâmico, a 320 nm para os ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico) e a 360 nm para rutina, quercetina e campferol. Os padrões foram escolhidos com base na literatura (CARPES, 2008; LEBLANC *et al.*, 2009; KETKAR *et al.*, 2014; TAVDIDISHVILI *et al.*, 2014; ULUSOY; KOLAYLI, 2014) e adquiridos da Sigma-Aldrich. Os analitos em cada extrato foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e espectros UV-Vis com os resultados dos padrões. A pureza de cada pico foi verificada de forma a excluir qualquer contribuição de picos interferentes.

A concentração de cada composto identificado foi obtida interpolando as áreas dos picos na curva de calibração, a qual foi construída com uma mistura dos padrões acima citados. Foram utilizadas concentrações dos padrões entre 1 e 50 mg/L de metanol a 50%. Os parâmetros das curvas de calibração, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), para a análise dos extratos de pólen, são apresentados na Tabela 2. Adotou-se um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de, pelo menos, 0,999.

Os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de pólen apícola desidratado, em base seca.

**Tabela 2.** Parâmetros analíticos das curvas de calibração utilizados para a quantificação dos extratos de pólen por *HPLC-DAD*.

Composto	$m \pm \Delta m$	$b \pm \Delta b$	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Ácido gálico	50706 ± 214	-6217 ± 5928	0.55	1.83
Ácido protocatéquico	33664 ± 661	-21592 ± 19863	2.77	9.24
Ácido vanílico	35314 ± 321	-931 ± 7773	1.03	3.45
Ácido siríngico	21490 ± 574	16716 ± 14077	3.08	10.26
Ácido β-resorcílico	12308 ± 49	-423 ± 1368	0.52	1.74
Ácido ferúlico	107272 ± 902	-9853 ± 22762	1.00	3.32
Ácido sinápico	95532 ± 1417	-8888 ± 36837	1.81	6.04
Ácido cinâmico	163683 ± 393	19094 ± 11379	0.33	1.09
Ácido cafeico	106608 ± 566	-16156 ± 13030	0.57	1.91
Ácido <i>p</i> -cumárico	127784 ± 937	-3060 ± 23418	0.86	2.87
Ácido clorogénico	56066 ± 556	-32375 ± 14629	1.23	4.09
Catequina	13105 ± 138	2406 ± 3573	1.28	4.27
Epicatequina	69040 ± 491	-25251 ± 12141	0.83	2.75
Naringenina	62404 ± 494	12483 ± 12394	0.93	3.11
Naringina	33168 ± 49	616 ± 1247	0.18	0.59
Rutina	31543 ± 79	1460 ± 1971	0.29	0.98
Kaempferol	73460 ± 1244	14914 ± 30308	1.94	6.46
Quercetina	64868 ± 1312	-42618 ± 31783	2.30	7.67

### 2.6.2 Cromatografia líquida aclopada à espectrometria de massas

A separação dos compostos foi realizada por *HPLC*, conforme já relatado. Coluna, volume injetado, fluxo empregado, temperatura da coluna, fase móvel, tempo de corrida e gradiente de eluição foram os mesmos descritos no item 2.6.1.

Para a identificação das moléculas foi empregada a técnica de espectrometria de massas - *mass spectrometry (MS)*. Para tal, foi utilizado um espectrometro de massa LTQ Orbitrap XL, equipado com sistema de ionização por *electrospray (ESI)* e controlado por software *LTQ Tune Plus 2.5.5* e *Xcalibur 2.1.0*. A temperatura e a voltagem do capilar de ionização foram ajustadas em 275°C e 2800 V, respectivamente. O gás de bainha (*sheath gas*) e a vazão do gás auxiliar (nitrogênio) foram ajustados para, respectivamente, 40 e 10 (unidade arbitrária conforme configurações do software). A voltagem do capilar foi de -28 V e a tensão de tubo de lente foi de -150 V. Os espectros foram obtidos na faixa de 100-1000 *m/z* e os dados coletados em modo de ionização negativo. Experiências de fragmentação através de colisão induzida foram realizadas no *iron trap* utilizando gás hélio. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros com os padrões (descritos no item 2.6.1) e com dados da literatura.

## 2.7 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Para determinar a capacidade antioxidante das amostras dois métodos foram utilizados, a fim de gerar informações complementares e, conseqüentemente, uma melhor compreensão deste parâmetro: o método DPPH, um ensaio em esquema não competitivo no qual o próprio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é o radical e a ação dos antioxidantes no sistema baseia-se na transferência de elétrons ou de um átomo de hidrogênio; e o método *ORAC* (*oxigen-radical absorbancy capacity*: capacidade de absorção do radical oxigênio), um método em esquema competitivo em que o radical peroxil é gerado no sistema e a ação dos antioxidantes baseia-se na transferência de um átomo de hidrogênio.

### 2.7.1 Método DPPH

Este método foi executado conforme descrito por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações. Inicialmente, ETE foram diluídos em metanol para, pelo menos, cinco concentrações de amostra. Em seguida, preparou-se uma solução metanólica do radical DPPH (Sigma-Aldrich), com absorvância entre 0,600-0,700, a 517 nm. Alíquotas de 1,5 mL da solução de DPPH foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 0,5 mL de extrato diluído. O meio foi homogeneizado em vortex por 2 s e, então, os tubos foram armazenados, à temperatura ambiente e abrigo da luz, por 30 min, para que ocorresse a reação entre antioxidantes e radical. O controle foi conduzido nas mesmas condições, porém com metanol, sem extrato; e o branco de cada amostra foi preparado com 0,5 mL da diluição em análise e 1,5 mL de metanol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu (UV 1650 PC) com absorvância em 517 nm, para observar o decréscimo na absorvância do meio em relação ao controle (mudança na cor de púrpura para amarelo), indicativo da desativação do radical pelo antioxidante. A temperatura de trabalho do equipamento foi de 20°C.

Diferentes diluições de cada ETE foram analisadas com objetivo de construir uma curva padrão de concentração (mg/mL de extrato)  $\times$  percentual de descoloração (%). Para cada extrato foram feitas diluições específicas de acordo com o teor de compostos antioxidantes na amostra. O percentual de descoloração (PD) foi calculado, segundo a fórmula de Mensor *et al.* (2001):

$$PD (\%) = \{1 - [Abs_{amostra} - Abs_{branco} / Abs_{controle}]\} \times 100$$

Onde:  $Abs_{amostra}$  = absorvância da amostra,  
 $Abs_{branco}$  = absorvância do branco, com amostra e metanol,  
 $Abs_{controle}$  = absorvância controle, com metanol e sem amostra.

Os resultados foram expressos em  $EC_{50}$  e em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich) por g de pólen apícola desidratado (ET/g), em base seca. A  $EC_{50}$  (*effective concentration 50*) é a concentração mínima de amostra (mg/mL de extrato) para reduzir 50% do radical. A partir da curva analítica de concentração  $x$  percentual de descoloração (%) determinou-se o  $EC_{50}$  de cada amostra. Para expressar os resultados em ET, soluções do padrão em metanol foram preparadas em diferentes concentrações (6,25 a 100  $\mu\text{M}$ ) para construção de uma curva analítica de concentração  $x$  percentual de descoloração e interpolação da absorvância das amostras.

### 2.7.2 Método ORAC

Para esta determinação foi adotado o método descrito por OU *et al.* (2001) e adaptado por Huang, Ou e Prior (2005), que utiliza a fluoresceína como sonda e o AAPH [2,2'-azobis(2-metilpropionamida)diidrocloreto] como gerador de radicais peroxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ). Foram feitas algumas modificações na metodologia.

Inicialmente, os ETE foram diluídos em tampão fosfato de sódio (reagentes Grau P.A., Synth) 75 mM pH 7,4 para, pelo menos, cinco concentrações de amostra. Em seguida, foram preparadas as soluções de Trolox, fluoresceína (Sigma-Aldrich) a  $40 \times 10^{-9}$  M e AAPH (Sigma-Aldrich) a 0,153 M, todas em tampão fosfato de sódio 75 mM pH 7,4. Soluções de Trolox em concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100  $\mu\text{M}$  foram preparadas para construção da curva analítica e, durante a análise das amostras, três destas soluções (12,5; 25; 50  $\mu\text{M}$ ) foram utilizadas como controle.

As análises foram realizadas em placas de 96 poços de fundo preto, próprias para leitora de microplacas Synergy HT (Bio Tek Instruments). Cada placa foi preenchida da seguinte maneira:

- Poços da primeira e última linha e poços da primeira e última coluna foram preenchidos com 300  $\mu\text{L}$  de água deionizada Milli-Q para manter o equilíbrio térmico nos demais poços;

- Nos três primeiros poços da segunda coluna foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 75 mM, pH 7,4 (branco);
- Nos três últimos poços da penúltima coluna foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  de soluções de Trolox (controle);
- Nos demais poços foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  das diluições da amostra em análise.

A placa foi inserida na leitora e o processo iniciado. Foram injetados, automaticamente, 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína em todos os poços, exceto naqueles preenchidos com água deionizada Milli-Q. Após 30 min, nestes mesmos poços, 25  $\mu\text{L}$  de solução de AAPH foram injetados, automaticamente, para o início da reação. A temperatura de trabalho do equipamento foi mantida em 37°C e o decaimento na fluorescência foi monitorado a cada minuto ( $\lambda_{\text{excitação}} = 485 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emissão}} = 520 \text{ nm}$ ) durante 1 h.

O valor relativo de ORAC foi calculado com base na equação de regressão linear entre a concentração de Trolox<sup>®</sup> e a área sob a curva de decaimento da fluorescência [área under the fluorescein decay curve (AUC)] do branco e das amostras. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol ET por g}$  de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.8 CAPACIDADE ANTIMICROBIANA

### 2.8.1 Micro-organismos

Para este estudo foram utilizados micro-organismos de importância clínica, isolados de fluidos biológicos no Centro Hospitalar do Nordeste, Bragança/Portugal, ou adquiridos de um distribuidor autorizado de cepas ATCC (LGC Standards S.L.U., Barcelona, Espanha). Os micro-organismos isolados foram identificados no LM da ESA-IPB e armazenados em meio Müeller-Hinton com 20% de glicerol, à temperatura de -70°C, até o momento das análises. Foram escolhidas bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922<sup>TM</sup>; *E. coli* ESA72; *Klebsiella* ATCC BAA1705<sup>TM</sup>; *Klebsiella* ESA61), bactérias Gram positivas (*Streptococcus pyogenes*

ATCC 12344™; *S. pyogenes* ESA12; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923™; *S. aureus* ESA54) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 60193™; *C. albicans* ESA109).

Previamente as análises, colônias de bactérias foram reativadas em caldo nutriente ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 24 h) e de leveduras em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 48h). Após incubação, os inóculos foram transferidos para *erlenmeyers* contendo cloreto de sódio a 0,85% e a concentração padronizada para turbidez 0,5 na escala MacFarland (que equivale a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, fez-se a leitura da suspensão em espectrofotômetro (Varian UV- Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan), com absorbância em 580 nm para bactérias e em 640 nm para leveduras, para confirmação da concentração de microorganismos. Por fim, a suspensão de células foi diluída para  $10^4$  UFC/mL, sendo esta adotada para todos nos ensaios.

### 2.8.2 Determinação da capacidade antimicrobiana

A determinação foi realizada pelo método de microdiluição em microplacas, conforme descrito por Morais *et al.* (2011). Inicialmente, os EME foram resuspendidos em dimetil sulfóxido (DMSO) para uma concentração de 50 mg/mL. Em microplacas estéreis, de 96 poços e fundo transparente, fez-se o preenchimento inicial da seguinte maneira:

- 200  $\mu\text{L}$  do extrato nos poços da coluna 1;
- 100  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente (bactérias) ou de caldo YNB (leveduras), nos poços das colunas 2-8 e 11-12;
- 100  $\mu\text{L}$  de extrato + 100  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente (bactérias) ou de caldo YNB (leveduras), nos poços da coluna 9;
- 200  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente ou caldo YNB, nos poços da coluna 10.

Foram retirados 100  $\mu\text{L}$  dos poços da coluna 1 para a coluna 2, da coluna 2 para a coluna 3 e assim sucessivamente até a coluna 8, de modo que a concentração de extrato nos poços fosse decrescente. 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de micro-organismos foram adicionados a cada um dos poços, exceto naqueles das colunas 1, 9 e 10. Nos poços da coluna 1 foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, sendo estes considerados como branco. Os poços da coluna 9 foram considerados o

controle negativo (extrato e meio de cultura). Os poços das colunas 10 (apenas meio) foram o controle da esterilidade do meio de cultura. Os poços da coluna 11 (meio de cultura e suspensão de micro-organismos) foram o controle da viabilidade microbiana. Os poços da coluna 12 foram o controle positivo, aos quais, além de meio de cultura e suspensão de micro-organismos, foram adicionados gentamicina (quando os micro-organismos em teste na placa eram bactérias) ou fluconazol (quando o teste envolveu leveduras).

As placas foram seladas com filme respirável (*sealing film* BF-4005) e incubadas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h, para as bactérias, ou  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h, para as leveduras. Após a incubação, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) a 1% a todos os poços, exceto na primeira coluna. As placas foram re-incubadas nas respectivas temperaturas, por 3 h, a fim de se observar visualmente a mudança de incolor para coloração vermelha, indicativa de redução do corante pelas enzimas microbianas. A capacidade antimicrobiana das amostras foi associada à concentração mínima inibitória (CMI), definida como a menor concentração de extrato de pólen apícola necessária para inibir o crescimento visível identificado pela adição da solução corante (TTC). Os resultados foram expressos em mg de pólen apícola desidratado, em base seca, por mL de extrato.

## 2.9 EXTRATO ETÉREO – TEOR DE LIPÍDEOS

O teor de lipídeos foi determinado por extração intermitente em Soxhlet (IAL, 2008; ALMEIDA-MURADIAN; ARRUDA; BARRETO, 2012). Inicialmente, balões de fundo chato foram aquecidos em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , por 1 h, e a massa aferida quando à temperatura ambiente. Cerca de 2 g de amostra foram medidas em papéis filtro em forma de cartucho, estes foram fechados e inseridos nos intermediários do aparelho de extração. Os balões foram acoplados na saída do intermediário e o sistema preenchido com cerca de 150 mL de éter etílico ou volume suficiente para preencher um intermediário e meio. O solvente foi aquecido até ebulição, sendo o vapor destinado ao condensador para liquefazer e gotejar (3 gotas/segundo) sobre os cartuchos, estabelecendo-se um sistema de refluxo. O solvente percorreu os cartuchos, levando consigo as substâncias solúveis em éter etílico, que acumularam nos balões.

Após 8 h de extração, os cartuchos foram retirados do sistema e o aquecimento foi mantido até que o éter etílico remanescente no condensador fosse vertido para o balão. O solvente foi recuperado e quando observado o mínimo de éter etílico nos balões estes foram submetidos à secagem em estufa a 105°C, por 1 h. A massa dos balões foi medida quando à temperatura ambiente. O percentual de lipídeos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Lipídeos} = 100 \times \frac{(M_f - M_B)}{M}$$

Onde:  $M_f$  = massa final (balão + resíduo de gordura) em g;

$M_B$  = peso do balão em g;

$M$  = massa da amostra em g.

Os resultados foram expressos em g de lipídeos por 100 g de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.10 NITROGÊNIO TOTAL – TEOR DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas foi determinado, a partir da concentração de nitrogênio total, pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005; ALMEIDA-MURADIAN; ARRUDA; BARRETO, 2012). 100 mg das amostras foram medidas em papel manteiga, embaladas e os pacotes colocados em tubos digestores contendo mistura catalisadora (2 g de sulfato de potássio e 0,05 g de sulfato de cobre pentahidratado). A cada um dos tubos foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e, então, os tubos foram submetidos a aquecimento em bloco digestor (Quimis), dentro de capela de exaustão, com aumento gradativo de temperatura até máxima de 350°C. A partir do momento em que a solução se tornou azul-esverdeada e a fumaça branca de dióxido de enxofre praticamente cessou, o sistema permaneceu a 350°C por mais 4 horas. O bloco digestor foi, então, desligado e os tubos deixados na capela para perder calor.

Os tubos foram conectados ao destilador (TE-0363, Tecnal) e a estes foram adicionados 15 mL de hidróxido de sódio a 40%, observando-se o aparecimento de precipitado pardo escuro de óxido cúprico. A ponta do condensador foi mergulhada em *erlenmeyer* contendo 5 mL de solução saturada de ácido bórico e três gotas do

indicador de Kjeldahl, onde foi recolhido a amônia liberada durante a destilação. Foram recolhidos 75 mL, que então foram titulados com ácido clorídrico padronizado (0,02 N). O teor de nitrogênio total foi calculado pela fórmula:

$$\%N = \frac{(V_a - V_b) \times 14,007}{M}$$

Onde:  $V_a$  = volume de ácido clorídrico usado na titulação da amostra (mL);  
 $V_b$  = volume de ácido clorídrico utilizado na titulação do branco (mL);  
 $M$  = massa da amostra em mg.

Para converter o teor de nitrogênio total em proteína bruta foi utilizado fator de correção de 6,25 para alimentos em geral (IAL, 2008). Os resultados expressos em g de proteínas por 100 g de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.11 RESÍDUO MINERAL FIXO – TEOR DE CINZAS

O teor de cinzas foi determinado conforme método descrito por Almeida-Muradian, Arruda e Barreto (2012). Inicialmente, cadinhos de porcelana foram aquecidos em estufa a 105°C, por 1 h, e a massa aferida quando à temperatura ambiente. 2 g de amostra foram medidas em cadinhos e estes aquecidos em chapa até que cessasse a liberação de fumaça branca. Em seguida, os cadinhos foram incinerados em mufla a 550°C por 8 h. Após este período, reduziu-se a temperatura da mufla para 105°C e, no momento em que o equipamento atingiu esta temperatura, os cadinhos foram retirados e colocados em dessecador com sílica por 1 h. Então, a massa dos cadinhos foi medida e o teor de cinzas foi calculado pela fórmula:

$$\text{Cinzas} = 100 \times \frac{(M_f - M_c)}{M}$$

Onde:  $M_f$  = massa final (cadinho e resíduo mineral), em g;  
 $M_B$  = massa do cadinho, em g;  
 $M$  = massa da amostra em g.

Os resultados foram expressos em g de cinzas por 100 g de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.12 TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS

Este conteúdo foi determinado por diferença, descontando-se de 100 os teores de proteínas, lipídeos e cinzas (AOAC, 2005). Os resultados foram expressos em g de carboidratos por 100 g de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.13 VALOR ENERGÉTICO

O valor energético, em quilocalorias, foi estimado pela fórmula (MERRILL; WATT, 1973):

$$\text{Valor Energético} = 4 \times (\text{prot} + \text{carb}) + 9 \times (\text{lip})$$

Onde: prot = teor de proteínas, em gramas por 100 g de amostra;  
carb = teor de carboidratos, em gramas por 100 g de amostra;  
lip = teor de lipídeos, em gramas por 100 g de amostra.

## 2.14 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

Os minerais ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco, manganês, sódio e potássio foram quantificados por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado - *inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)*, no Centro de Tecnologia Agrícola e Ambiental. 500 mg de amostra foram submetidas a digestão com 6 mL ácido nítrico e ácido perclórico (2:1, mL:mL) em sistema aberto (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Para esta análise foi utilizado um equipamento Ciros Vision EOP (ANEXO IV), operando com os seguintes parâmetros: potência aplicada de 1,45 kW; vazão do gás do plasma de 12 L/min; vazão do gás auxiliar de 1 L/min; vazão do gás de nebulização de 1 L/min e vazão de amostra de 2 mL/min. O comprimento de onda foi específico para cada elemento e uma curva de calibração foi preparada com, pelo menos, cinco diferentes concentrações de cada mineral. Os parâmetros das curvas de calibração foram fornecidos pela empresa (ANEXO V). Os resultados foram expressos em g ou mg de mineral por kg de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.15 PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR

Estes parâmetros foram determinados por refletância em ColorQuest XE (CQX 2329, Hunterlab) com Software Universal V4.10, operando na escala CIE  $L^*a^*b^*$  ( $L^*$ : 0 a 100,  $a^*$ : - a +, e  $b^*$ : - a +), com ângulo do observador em  $10^\circ$  e iluminante D65. Uma cubeta de quartzo de 50 mm foi preenchida com amostra e, então, alocada sobre o sensor óptico. Leituras foram realizadas em diferentes pontos da cubeta e os resultados expressos em valores das coordenadas  $L^*$ ,  $a^* b^*$  e  $C^*$ .

A coordenada  $L^*$  é um indicador de luminosidade e os resultados variam de 0 (preto) a 100 (branco). As coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  são indicadores de tonalidade, onde  $a^*$  varia de verde (-) a vermelho (+) e  $b^*$  de azul (-) a amarelo (+). O Chroma (C), que corresponde a saturação ou intensidade da cor, foi calculado pela fórmula:

$$C = \sqrt{(a^2+b^2)}$$

Onde: a = valor da coordenada  $a^*$ ;  
b = valor da coordenada  $b^*$ .

## 2.16 ANÁLISE POLÍNICA

As amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito por Barth *et al.* (2010). Os tipos polínicos foram identificados por comparação com informações catalogadas (BARTH, 1970a; BARTH, 1970b; BARTH, 1970c; BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002). Fez-se o cálculo das percentagens de cada tipo polínico na amostra e a classificação, conforme as classes de frequência (BARTH *et al.*, 2010). A análise polínica foi detalhada no Capítulo 2 (Material e Métodos, item 2.2).

## 2.17 TRATAMENTO DOS DADOS

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Previamente a comparação das médias, as amostras foram testadas formalmente para a igualdade das variâncias pelo teste de *Brown-Forsythe* ( $n \geq 3$  amostras) ou pelo teste *F* ( $n=2$  variâncias). Então, *one-way* ANOVA ou teste de

Welch-ANOVA ( $n \geq 3$  amostras), seguido de teste *LSD* de *Fisher* ou teste *t* de *Student* para amostras independentes ( $n=2$  grupos), foram utilizados para destacar as diferenças ao nível de significância de 5% (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014).

A Região e a origem botânica das amostras foram estudadas utilizando a análise de componentes principais - *principal component analysis* (*PCA*). Para tal, as médias foram auto-escaladas e a *PCA* realizada com base na análise de correlação, na qual variâncias foram calculadas como (soma dos quadrados)/ $n-1$ . As cargas dos fatores acima de 0,45 foram usadas para interpretar a projeção das amostras sobre o plano bidimensional (ZIELINSKI et al., 2014).

A análise de agrupamento hierárquico (*hierarchical cluster analysis* – *HCA*), com base no método Ward's e na medida das distâncias (coeficiente de correlação de Pearson-1), foi utilizada, também, para classificar as amostras de pólen apícola desidratado de acordo com as seguintes variáveis: teor de proteínas, ferro, quercetina, fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método *ORAC* e inibição de *Staphylococcus aureus* ESA54. Quatro grupos foram formados e comparados usando teste Student-t (2 grupos) e one-way ANOVA ( $\geq 3$  grupos) seguido de teste *LSD* Fisher's, quando aplicável.

Todas as análises foram realizados usando *software* Statistica 7 (Statsoft, USA) e Action 2.9 (Statcamp, Brasil).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados serão apresentados e discutidos conforme planeja-se enviá-los para publicação: (parte 1) caracterização físico-química e propriedades biológicas de 56 amostras monoflorais e heteroflorais, cuja identificação dos compostos fenólicos foi realizada por *HPLC* e (parte 2) caracterização de oito amostras monoflorais em que a identificação dos polifenóis foi realizada por *HPLC-MS*.

#### 3.1 PARTE 1

Os principais tipos polínicos nas amostras são apresentados no Quadro 1. 19 amostras foram classificadas como monoflorais e 37 como heteroflorais.

**Quadro 1.** Principais tipos polínicos nas 56 amostras de pólen apícola desidratado.

Amostra	Origem botânica: tipos polínicos <sup>1</sup>	Amostra	Origem botânica: tipos polínicos <sup>1</sup>
A1	M: Mc	K2	M: An
B1	H: Cn+Ms	K3	H: An+Ce
C1	M: B	K4	H: Ce+An+Se+E
C2	M: B	L1	H: Sc+I
C3	H: B+E	L3	M: M
D5	H: Ep+P	M1	M: A
E1	H: Cn+Mc+E	M2	M: F
E2	H: E+Mc	N1	M: B
E3	M: E	O1	M: B
E4	H: Mc+E	Q1	M: Cn
E5	H: E+C	R1	H: E+Mc+Cn
E6	H: C+Cn	S1	H: An+Cn
E7	M: R	S2	H: Al+Mc
F2	H: Ms+Mc	S3	M: Al
G1	H: S+Ep	S5	H: Al+Ve
G2	H: S+F	S6	M: Al
G3	M: A	U1	M: Mv
G4	H: Ep+S	V1	M: Cn
G5	M: M	X1	H: Cn+Ms
G6	H: P+Ce	Z1	H: F+An
G7	H: P+A	AA1	H: Ms+As
G8	H: Ce+M	AA2	H: Ac+F+Mv
G9	H: Ar+Ce	AB1	H: M+Ma
G10	H: Cn+Ce	AC1	M: As
G11	H: Ar+Mc+Ce	AC2	H: B+As
H1	H: Ms+B	AC3	H: B+Mo
I1	H: Mc+Ar+Ce	AD1	H: B+Mc
K1	H: An+E+Ce	AD2	H: Mc+M

<sup>1</sup>Classificação (M = monofloral; H = heterofloral); principais tipos polínicos (A: *Astrocaryum*; Ac: Anacardiaceae; Al: *Alternanthera*; An: *Anadenanthera*; Ar: Arecaceae; As: Asteraceae; B: *Brassica*; C: *Coffea*; Ce: *Cecropia*; Cn: *Cocos nucifera*; E: *Eucalyptus*; Ep: *Eupatorium*; F: Fabaceae; I: *Ilex*; M: *Myrcia*; Ma: *Machaerium*; Mc: *Mimosa caesalpiniaefolia*; Mo: *Montanoa*; Ms: *Mimosa scabrella*; Mv: *Mimosa verrucosa*; P: *Piper*; S: *Syagrus*; Sc: *Schinus*; Se: *Sebastiania*; Ve: *Vernonia*.

### 3.1.1 Composição centesimal e conteúdo de minerais

A composição centesimal e o valor energético das 56 amostras e os limites estabelecidos nas legislações brasileira, argentina e russa, para fins de verificação quanto a adequação, são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição centesimal de 56 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros e parâmetros estabelecidos pelas Legislações Brasileira, Argentina e Russa.

Amostra	Composição centesimal (g/100 g)				Valor Energético (kcal/100 g)
	CHO	Proteínas	Lipídeos	Cinzas	
A1	73,8 ± 0,6	17,3 ± 0,6	5,3 ± 0,0	3,6 ± 0,0	412 ± 0
B1	79,9 ± 0,2	11,3 ± 0,0	5,1 ± 0,2	3,6 ± 0,0	411 ± 1
C1	68,2 ± 0,5	15,2 ± 0,6	13,5 ± 0,3	2,9 ± 0,0	456 ± 2
C2	71,2 ± 0,2	14,5 ± 0,0	11,4 ± 0,2	2,9 ± 0,0	446 ± 1
C3	72,8 ± 0,1	14,2 ± 0,1	10,3 ± 0,1	2,7 ± 0,0	441 ± 1
D5	82,1 ± 0,4	8,6 ± 0,2	7,5 ± 0,4	1,9 ± 0,0	430 ± 2
E1	80,1 ± 0,6	10,9 ± 0,0	5,6 ± 0,5	3,3 ± 0,0	415 ± 2
E2	80,6 ± 0,1	12,6 ± 0,1	4,0 ± 0,2	2,8 ± 0,0	409 ± 1
E3	80,9 ± 0,3	12,5 ± 0,0	4,0 ± 0,3	2,6 ± 0,1	410 ± 2
E4	78,5 ± 0,2	13,3 ± 0,0	5,4 ± 0,2	2,8 ± 0,0	416 ± 1
E5	79,4 ± 0,2	11,8 ± 0,1	5,9 ± 0,2	2,9 ± 0,0	418 ± 1
E6	77,9 ± 0,3	12,9 ± 0,1	6,0 ± 0,4	3,2 ± 0,0	418 ± 2
E7	77,9 ± 0,6	11,1 ± 0,1	8,3 ± 0,5	2,7 ± 0,0	431 ± 3
F2	78,0 ± 0,2	11,6 ± 0,0	7,2 ± 0,2	3,2 ± 0,0	423 ± 1
G1	79,0 ± 0,8	10,6 ± 0,1	7,8 ± 0,8	2,6 ± 0,0	429 ± 4
G2	80,0 ± 0,2	11,1 ± 0,1	6,1 ± 0,1	2,8 ± 0,0	419 ± 1
G3	77,4 ± 0,3	11,1 ± 0,0	8,4 ± 0,4	3,0 ± 0,0	430 ± 2
G4	79,3 ± 0,7	9,5 ± 0,0	9,0 ± 0,7	2,2 ± 0,0	436 ± 3
G5	77,6 ± 0,1	12,5 ± 0,1	6,8 ± 0,2	3,0 ± 0,0	422 ± 1
G6	76,8 ± 0,3	12,8 ± 0,1	6,9 ± 0,2	3,5 ± 0,0	420 ± 1
G7	77,5 ± 0,1	13,1 ± 0,3	6,3 ± 0,4	3,1 ± 0,0	419 ± 2
G8	78,1 ± 0,3	12,7 ± 0,1	6,0 ± 0,3	3,2 ± 0,0	417 ± 1
G9	67,9 ± 1,0	21,5 ± 0,6	7,5 ± 0,6	3,1 ± 0,0	425 ± 3
G10	65,5 ± 0,6	22,7 ± 0,2	8,7 ± 0,4	3,1 ± 0,0	431 ± 2
G11	65,1 ± 0,2	24,8 ± 0,1	7,0 ± 0,1	3,1 ± 0,0	423 ± 0
H1	69,2 ± 0,2	16,7 ± 0,1	11,1 ± 0,3	3,1 ± 0,0	443 ± 2
I1	77,9 ± 0,4	12,0 ± 0,1	6,5 ± 0,5	3,5 ± 0,0	418 ± 2
K1	61,7 ± 0,1	30,4 ± 0,1	4,8 ± 0,1	3,1 ± 0,0	412 ± 0
K2	54,9 ± 1,0	32,2 ± 0,1	9,8 ± 0,9	3,1 ± 0,0	436 ± 5
K3	66,6 ± 0,5	24,1 ± 0,1	6,4 ± 0,5	2,8 ± 0,0	421 ± 2
K4	66,3 ± 0,2	23,9 ± 0,2	6,5 ± 0,4	3,0 ± 0,2	422 ± 3
L1	68,1 ± 0,1	20,9 ± 0,1	8,4 ± 0,1	2,7 ± 0,0	431 ± 0
L3	67,4 ± 0,5	22,5 ± 0,1	7,6 ± 0,5	2,5 ± 0,0	428 ± 2
M1	64,6 ± 0,5	23,8 ± 0,1	8,7 ± 0,4	2,9 ± 0,0	432 ± 2
M2	65,8 ± 0,1	23,6 ± 0,2	7,9 ± 0,2	2,7 ± 0,0	429 ± 1
N1	67,0 ± 0,4	20,2 ± 0,1	9,3 ± 0,2	3,4 ± 0,0	433 ± 1
O1	65,1 ± 0,1	23,2 ± 0,1	8,6 ± 0,0	3,2 ± 0,0	430 ± 0
Q1	72,0 ± 0,2	20,3 ± 0,0	4,6 ± 0,1	3,1 ± 0,0	411 ± 1
R1	66,8 ± 0,4	24,7 ± 0,1	5,0 ± 0,1	3,5 ± 0,0	411 ± 1
S1	65,5 ± 0,2	26,2 ± 0,2	5,2 ± 0,2	3,2 ± 0,0	413 ± 1
S2	71,3 ± 0,4	19,9 ± 0,1	5,9 ± 0,3	2,8 ± 0,0	418 ± 1
S3	82,8 ± 0,3	9,0 ± 0,2	5,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1	413 ± 1
S5	82,6 ± 0,3	7,9 ± 0,5	7,3 ± 0,5	2,2 ± 0,1	427 ± 3
S6	81,5 ± 1,1	8,8 ± 0,5	6,9 ± 0,6	2,8 ± 0,1	423 ± 2
U1	79,0 ± 0,1	11,6 ± 0,1	6,2 ± 0,0	3,2 ± 0,0	418 ± 0
V1	81,5 ± 0,3	10,3 ± 0,2	5,1 ± 0,1	3,0 ± 0,0	414 ± 1

(Continua)

Tabela 3. Continuação...

Amostra	Composição centesimal (g/100 g)				Valor Energético (kcal/100 g)
	CHO	Proteínas	Lipídeos	Cinzas	
X1	82,2 ± 0,3	9,8 ± 0,1	5,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	413 ± 1
Z1	78,9 ± 0,1	14,8 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,0 ± 0,0	404 ± 1
AA1	79,2 ± 0,4	9,8 ± 0,3	8,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1	435 ± 1
AA2	79,3 ± 0,4	12,1 ± 0,3	5,9 ± 0,3	2,7 ± 0,0	419 ± 2
AB1	80,5 ± 0,5	12,2 ± 0,0	4,5 ± 0,4	2,7 ± 0,1	412 ± 2
AC1	82,2 ± 0,4	9,4 ± 0,1	5,8 ± 0,5	2,5 ± 0,1	419 ± 2
AC2	79,2 ± 0,3	10,4 ± 0,1	7,9 ± 0,2	2,5 ± 0,1	430 ± 1
AC3	79,9 ± 0,1	10,0 ± 0,1	7,5 ± 0,0	2,5 ± 0,1	427 ± 0
AD1	79,7 ± 0,1	10,0 ± 0,1	7,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1	424 ± 1
AD2	80,7 ± 0,7	9,7 ± 0,2	6,7 ± 0,5	2,8 ± 0,0	422 ± 3
<b>Máximo</b>	<b>82,8 ± 0,3</b>	<b>32,2 ± 0,1</b>	<b>13,5 ± 0,3</b>	<b>3,6 ± 0,0</b>	<b>456 ± 2</b>
<b>Mínimo</b>	<b>54,9 ± 1,0</b>	<b>7,9 ± 0,1</b>	<b>3,2 ± 0,3</b>	<b>1,9 ± 0,0</b>	<b>404 ± 1</b>
<b>Legislação Brasileira</b>	-	Mín. 8	Mín. 1,8	Máx. 4	-
<b>Legislação Argentina</b>	45-55	15-28	-	Máx. 4	-
<b>Legislação Russa</b>	-	Mín. 21	-	Máx. 4	-

O valor energético das amostras variou de  $404 \pm 1,2$  a  $456 \pm 1,7$  kcal/ 100 g de pólen apícola desidratado (PAD), portanto, uma porção de 25 g fornece de 101 a 114 kcal, ou seja, supre cerca de 4% da necessidade diária de um indivíduo adulto (considerando-se a dieta de 2.500 kcal). O conteúdo de carboidratos variou de  $54,9 \pm 1,0$  g/100 g, em uma amostra coletada no Rio Grande do Sul (K2) classificada como monofloral de *Anadenanthera*, à  $82,8 \pm 0,3$  g/100 g, em uma amostra coletada no Estado de São Paulo (S3) monofloral de *Alternanthera*. De acordo com Bogdanov (2012a), glicose, frutose e sacarose são os principais carboidratos no PAD e podem representar até 90% dos açúcares de baixo peso molecular. Estes são, também, os principais carboidratos no mel (LEÓN-RUIZ *et al.*, 2011), outro importante produto apícola.

A legislação brasileira estabelece limites, apenas, para açúcares totais (BRASIL, 2001), enquanto a legislação argentina estabelece mínimo de 45 g e máximo de 55 g de carboidratos por 100 g de produto (ARGENTINA, 2010) e, neste caso, apenas uma amostra (K2:  $54,94 \pm 0,99$  g/100 g) estaria de acordo. Na Tabela 4 são apresentados os teores máximos e mínimos de carboidratos, bem como proteínas, lipídeos e cinzas, comparando-os com outros estudos com PAD.

**Tabela 4.** Conteúdo de proteínas, lipídeos e cinzas (g/100 g) nas 56 amostras de pólen apícola desidratado e comparação com dados de literatura.

Parâmetros		Presente Estudo	Dados em literatura						
			A	B	C	D	E	F	G
Carboidratos	Máx.	82,83	-	77,22	-	-	76,79	84,25	-
	Mín.	54,94	-	54,43	-	-	50,91	69,68	-
Proteínas	Máx.	33,90	22,80	40,53	27,69	28,28	44,44	25,15	25,11
	Mín.	7,94	20,10	15,79	15,04	19,98	15,39	12,50	22,15
Lipídeos	Máx.	13,53	5,10	5,56	6,47	5,69	6,55	3,33	6,13
	Mín.	3,18	2,20	0,19	3,72	4,46	1,78	2,35	4,57
Cinzas	Máx.	3,77	3,10	4,29	3,91	3,30	3,31	3,16	3,24
	Mín.	1,79	2,60	1,43	1,90	2,89	1,27	0,50	2,77

(A) Marchini, Reis e Moreti (2006), amostras de São Paulo;

(B) Modro *et al.*, (2007), amostras de Minas Gerais;

(C) Carpes (2008) amostras da Região Sul do Brasil;

(D) Melo *et al.*, (2009), amostras de Pariquera-Açu/SP;

(E) Modro *et al.* (2009), amostras de Minas Gerais;

(F) Nogueira *et al.*, (2012), amostras de Portugal;

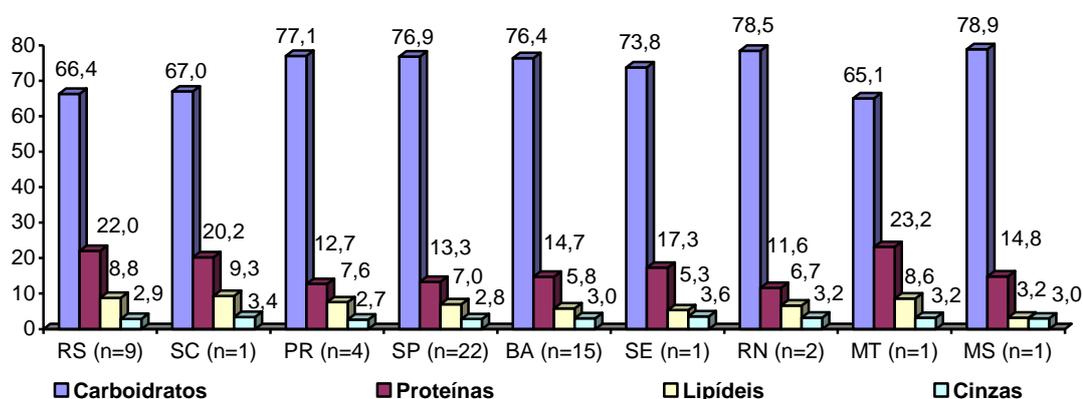
(G) Arruda *et al.*, (2013a), amostras de Pariquera-Açu/SP.

Com relação ao conteúdo de proteínas, uma amostra não estava em conformidade com o mínimo de 8 g/100 g, estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001). Em 34 amostras (49%), os valores estavam abaixo do mínimo apresentado na Tabela 4, porém, de acordo com Bogdanov (2012a), o conteúdo mínimo de proteínas em amostras de PAD pode ser de 2,5 g/100 g. O maior teor de proteínas (K2: 32,2 ± 0,1 g/100 g) foi observado na amostra com menor teor de carboidratos (Rio Grande do Sul, monofloral de *Anadenanthera*), enquanto o menor teor (S5: 7,9 ± 0,5 g/100 g) foi constatado em uma das amostra com o maior conteúdo de carboidratos (São Paulo, heterofloral com predominância de *Alternanthera* e *Vernonia*). Identificou-se forte correlação negativa entre proteínas e carboidratos ( $r=-0,9596$ ,  $p=0,000$ ), que podem ser considerados os dois principais macronutrientes no PAD.

Todas as amostras estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para lipídeos (mínimo 1,8 g/100 g) e cinzas (máximo 4 g/100 g) e, também, com os resultados de outros estudos (Tabela 4). O maior e o menor conteúdo de lipídeos foram encontrados em, respectivamente, uma amostra coletada no Rio Grande do Sul monofloral de *Brassica* (C1: 13,53 ± 0,34 g/100 g) e uma amostra oriunda do Mato Grosso do Sul heterofloral com predominância de Fabaceae e *Anadenanthera* (Z1: 3,24 ± 0,27 g/100 g). O maior teor de cinzas foi observado em uma amostra oriunda da Bahia, classificada como heterofloral, em que predominou *Cocos nucifera* e *Mimosa scabrella* (B1: 3,64 ± 0,01 g/100 g); já o menor teor foi

encontrado em uma amostra produzida em São Paulo, também heteroflora, porém com predominância de *Eupatorium* e *Piper* (D5:  $1,86 \pm 0,02$  g/100 g).

Considerando-se a média por Estado, há uma tendência a maiores valores de carboidratos nas amostras de Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Norte, enquanto o teor de proteínas tende a ser maior naquelas de Mato Grosso e Rio Grande do Sul. Nos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso pode-se encontrar PAD com maior conteúdo de lipídeos e nos Estados de Sergipe e Santa Catarina com maior conteúdo de cinzas (Figura 1).



**Figura 1.** Teor médio de carboidratos, proteínas, lipídeos e cinzas em amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Estados.

De acordo com Almeida-Muradian *et al.* (2005), Melo *et al.* (2009), Oliveira *et al.* (2009) e Nogueira *et al.* (2012), variações na composição centesimal do PAD estão relacionadas à origem botânica das amostras e a fatores que influenciem na produção do grão de pólen pelo vegetal, como as características do solo, condições climáticas, idade e estado nutricional da planta. Variações no perfil químico são observadas, também, ao longo do ano em amostras oriundas de um mesmo apiário, isto porque, durante cada período, há diferentes plantas em floração (PINTO; CAMPOS; BARRETO, 2012). Nas amostras de código G (G1-G11), que foram coletadas ao longo de cinco meses (setembro/12 a janeiro/13) no mesmo apiário, é possível ver que houve variação na composição centesimal.

Quanto aos minerais, potássio foi o composto em maior quantidade no PAD (em média, 61% dos minerais analisados), contudo, entre os microminerais o ferro predominou (em média 44% do total). Foi no teor de ferro que se observou a maior variação entre o conteúdo mínimo (X1:  $46 \pm 3,1$  mg/Kg) e o máximo (S6:  $1179 \pm 13$  mg/Kg). Todos os resultados são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Conteúdo de potássio, cálcio, magnésio, sódio, zinco, ferro, manganês e cobre em 56 amostras de pólen apícola desidratado.

Amostra	Composto*							
	K <sup>1</sup>	Ca <sup>1</sup>	Mg <sup>1</sup>	Na <sup>2</sup>	Zn <sup>2</sup>	Fe <sup>2</sup>	Mn <sup>2</sup>	Cu <sup>2</sup>
A1	8,8 ± 0,2	3,1 ± 0,0	1,6 ± 0,1	140,5 ± 3	87 ± 1,3	76 ± 2,7	67 ± 5,0	12 ± 0,6
B1	8,2 ± 0,1	3,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	170,2 ± 2	82 ± 3,3	53 ± 3,3	60 ± 1,7	11 ± 0,0
C1	6,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	89,9 ± 4	76 ± 2,3	303 ± 4,2	27 ± 1,1	13 ± 0,0
C2	5,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,0	91,3 ± 2	64 ± 3,8	217 ± 2,8	25 ± 0,0	14 ± 0,0
C3	5,4 ± 0,0	2,1 ± 0,1	1,3 ± 0,0	85,4 ± 2	80 ± 0,6	161 ± 4,3	39 ± 1,2	17 ± 0,6
D5	3,4 ± 0,1	1,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0	30,1 ± 3	71 ± 1,2	99 ± 1,6	34 ± 2,2	9 ± 0,6
E1	7,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	374,2 ± 2	79 ± 1,2	51 ± 2,1	106 ± 5,8	13 ± 0,6
E2	6,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	192,9 ± 3	96 ± 2,2	116 ± 2,8	45 ± 1,6	19 ± 1,1
E3	6,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,0	163,0 ± 3	101 ± 2,4	87 ± 3,8	50 ± 0,6	17 ± 0,6
E4	7,0 ± 0,1	1,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0	136,4 ± 2	91 ± 5,3	83 ± 1,8	66 ± 2,7	14 ± 0,6
E5	6,4 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,2 ± 0,0	166,9 ± 1	77 ± 3,1	76 ± 3,4	54 ± 2,7	13 ± 0,6
E6	7,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	109,1 ± 2	69 ± 2,2	133 ± 3,8	60 ± 3,3	19 ± 0,6
E7	6,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	1,2 ± 0,0	128,6 ± 1	59 ± 2,1	52 ± 1,6	73 ± 3,4	13 ± 0,0
F2	9,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	130,1 ± 2	64 ± 1,8	76 ± 1,6	51 ± 2,2	7 ± 0,0
G1	5,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	104,6 ± 1	67 ± 2,2	78 ± 4,2	205 ± 2,1	14 ± 0,0
G2	6,1 ± 0,0	2,9 ± 0,0	1,6 ± 0,0	151,1 ± 4	77 ± 4,4	77 ± 1,2	215 ± 6,3	17 ± 0,0
G3	6,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	106,4 ± 1	70 ± 2,2	116 ± 2,2	201 ± 7,0	17 ± 0,0
G4	4,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	30,8 ± 2	53 ± 1,8	59 ± 1,6	180 ± 3,2	10 ± 0,0
G5	6,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	69,5 ± 1	82 ± 4,2	68 ± 0,6	197 ± 4,2	15 ± 0,0
G6	7,5 ± 0,1	3,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1	52,3 ± 1	75 ± 3,6	104 ± 4,1	157 ± 3,3	20 ± 0,0
G7	6,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	1,7 ± 0,0	35,6 ± 2	78 ± 1,6	70 ± 2,2	214 ± 4,7	17 ± 0,0
G8	6,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	52,6 ± 2	88 ± 3,4	124 ± 2,8	202 ± 6,1	16 ± 0,6
G9	7,2 ± 0,1	3,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1	52,1 ± 2	98 ± 2,7	81 ± 1,8	198 ± 10	16 ± 0,6
G10	7,6 ± 0,2	2,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	60,1 ± 2	78 ± 3,4	91 ± 3,4	213 ± 6,8	16 ± 0,6
G11	7,6 ± 0,0	2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	42,2 ± 2	87 ± 4,2	126 ± 2,4	193 ± 3,7	17 ± 0,6
H1	6,6 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1	38,9 ± 1	56 ± 2,2	126 ± 0,6	82 ± 4,2	11 ± 0,6
I1	7,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	40,7 ± 1	76 ± 2,4	55 ± 1,6	78 ± 1,6	15 ± 0,6
K1	7,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	49,7 ± 2	84 ± 1,2	159 ± 5,4	104 ± 1,6	15 ± 0,0
K2	7,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	37,5 ± 1	84 ± 1,6	143 ± 2,8	109 ± 6,3	12 ± 0,6
K3	6,3 ± 0,2	2,0 ± 0,0	1,8 ± 0,1	65,1 ± 1	82 ± 3,7	144 ± 1,6	150 ± 2,6	10 ± 0,6
K4	5,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	59,4 ± 1	72 ± 3,7	134 ± 4,3	152 ± 6,8	12 ± 0,6
L1	6,5 ± 0,2	1,6 ± 0,0	1,2 ± 0,1	31,1 ± 1	57 ± 2,2	148 ± 2,8	60 ± 1,8	16 ± 0,6
L3	5,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	36,6 ± 1	70 ± 3,4	131 ± 2,2	54 ± 1,1	16 ± 0,6
M1	6,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	28,1 ± 1	54 ± 2,2	256 ± 0,6	28 ± 1,1	11 ± 1,1
M2	6,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	20,2 ± 1	72 ± 4,0	100 ± 1,1	86 ± 6,9	14 ± 0,6
N1	6,5 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	24,4 ± 2	73 ± 3,0	122 ± 2,1	67 ± 4,2	18 ± 0,6
O1	6,5 ± 0,2	2,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	23,5 ± 1	72 ± 2,3	225 ± 3,3	42 ± 3,8	12 ± 0,0
Q1	6,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	48,7 ± 1	72 ± 1,6	50 ± 2,7	162 ± 5,8	15 ± 0,0
R1	9,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	2,1 ± 0,0	32,7 ± 0	86 ± 3,8	57 ± 4,3	7 ± 3,3	14 ± 0,0
S1	7,0 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,0	45,8 ± 2	79 ± 1,1	243 ± 3,3	53 ± 3,2	11 ± 1,1
S2	6,5 ± 0,2	1,6 ± 0,0	1,3 ± 0,1	38,2 ± 1	57 ± 2,2	685 ± 7,6	49 ± 4,0	12 ± 0,0
S3	8,1 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,1	37,3 ± 1	61 ± 1,8	821 ± 9,1	57 ± 4,8	9 ± 0,0
S5	6,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1	50,9 ± 1	45 ± 1,1	698 ± 9,9	40 ± 3,7	14 ± 0,0
S6	7,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	42,9 ± 1	47 ± 3,2	1179 ± 13	39 ± 1,2	12 ± 1,0

(Continua)

Tabela 5. Continuação...

Amostra	Composto*							
	K <sup>1</sup>	Ca <sup>1</sup>	Mg <sup>1</sup>	Na <sup>2</sup>	Zn <sup>2</sup>	Fe <sup>2</sup>	Mn <sup>2</sup>	Cu <sup>2</sup>
U1	8,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	181,1 ± 0	71 ± 1,6	112 ± 1,6	55 ± 3,7	10 ± 0,6
V1	7,4 ± 0,2	3,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1	29,9 ± 2	78 ± 1,2	57 ± 3,4	128 ± 1,2	13 ± 0,6
X1	6,3 ± 0,0	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,0	31,1 ± 1	69 ± 3,6	46 ± 3,1	127 ± 7,4	12 ± 0,6
Z1	7,6 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1	38,5 ± 1	88 ± 3,3	165 ± 6,0	65 ± 1,9	12 ± 0,6
AA1	5,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	44,5 ± 0	59 ± 0,6	108 ± 6,3	94 ± 1,6	11 ± 0,6
AA2	7,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,0	42,8 ± 1	65 ± 2,1	138 ± 4,4	107 ± 5,9	20 ± 0,6
AB1	6,9 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,0	40,1 ± 1	55 ± 1,6	135 ± 4,3	48 ± 3,2	14 ± 0,6
AC1	5,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	36,4 ± 1	49 ± 1,1	196 ± 6,2	36 ± 2,8	12 ± 0,0
AC2	5,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	36,3 ± 2	41 ± 3,2	212 ± 4,9	27 ± 1,6	13 ± 0,0
AC3	5,1 ± 0,2	1,5 ± 0,0	1,2 ± 0,1	45,7 ± 2	30 ± 1,6	197 ± 5,6	26 ± 0,6	13 ± 0,0
AD1	6,3 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,1	40,6 ± 1	40 ± 1,6	280 ± 6,1	71 ± 4,3	11 ± 0,6
AD2	5,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,4 ± 0,1	57,6 ± 2	33 ± 3,3	183 ± 3,2	56 ± 4,7	11 ± 0,6
<b>Máx.</b>	<b>9,8 ± 0,1</b>	<b>4,1 ± 0,1</b>	<b>2,4 ± 0,1</b>	<b>374,2 ± 2</b>	<b>106 ± 3,6</b>	<b>1179 ± 13</b>	<b>215 ± 6,3</b>	<b>20 ± 0,6</b>
<b>Mín.</b>	<b>3,4 ± 0,1</b>	<b>0,9 ± 0,0</b>	<b>0,6 ± 0,0</b>	<b>20,2 ± 1</b>	<b>30 ± 1,6</b>	<b>46 ± 3,1</b>	<b>21 ± 0,6</b>	<b>7 ± 0,0</b>

\*K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Na: sódio; Zn: zinco; Fe: ferro; Mn: manganês; Cu: cobre.

<sup>1</sup> resultados em g/Kg, em base seca; <sup>2</sup> resultados em mg/Kg, em base seca.

Teores variáveis de potássio (1,4-20 g/Kg), cálcio (0,2-4,7 g/Kg), magnésio (0,2-3,6 g/Kg), sódio (<0,004-1466 mg/Kg), zinco (30-250 mg/Kg), ferro (11-552 mg/Kg), manganês (12-211 mg/Kg) e cobre (2-25 mg/Kg) foram observados em PAD coletado em diferentes países (FUNARI *et al.*, 2003; CARPES *et al.*, 2009; BOGDANOV, 2012a; MORGANO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013). Os resultados do presente estudo estão de acordo com a literatura consultada, exceto os conteúdos de manganês (três amostras com teor acima de 211 mg/Kg) e, principalmente, de ferro (quatro amostras com teor acima de 552 mg/Kg). Morgano *et al.* (2012) identificaram variações no conteúdo de minerais, de acordo com o local onde o PAD foi produzido, bem como com a estação do ano em que ocorreu a coleta. Yang *et al.* (2013) afirmaram que o teor de minerais nos grãos de pólen pode variar conforme a espécie vegetal, origem geográfica e composição do solo.

Com base na ingestão diária recomendada (IDR) de magnésio, ferro, zinco, manganês e cobre, para adultos, considerando uma porção de 25 g de PAD, algumas amostras foram classificadas como “fonte”, isto é, fornecem pelo menos 15% da IDR, e outras como “alto conteúdo”, visto que fornecem acima de 30% da IDR de referência por porção (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012). Na Tabela 6 é apresentado o percentual de amostras que podem ser consideradas “fonte” ou “alto conteúdo” dos cinco minerais mencionados.

**Tabela 6.** Percentual das 56 amostras de pólen apícola desidratado consideradas “fonte” ou “alto conteúdo”, para adultos, de magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e cobre (Cu), em uma porção de 25 g.

	<b>Mg (260 mg)</b>	<b>Fe (14 mg)</b>	<b>Zn (7 mg)</b>	<b>Mn (2,3 mg)</b>	<b>Cu (0,9 mg)</b>
Fonte (acima de 15%)	54%	68%	93%	98%	100%
Alto conteúdo (acima de 30%)	-	25%	20%	91%	89%

Em quatro amostras, o conteúdo de ferro foi tão significativo que uma porção de 25 g supre 100% da necessidade diária de um indivíduo adulto (S2: 17 mg; S3: 21 mg, S5: 17 mg, S6: 29 mg/porção). Estas amostras foram coletadas no mesmo apiário, localizado em São Paulo, durante o outono e inverno de 2013 (entre os meses de maio a agosto). Nestas amostras predominou o tipo polínico *Alternanthera* (S2: 43,2%; S3: 93,3%; S5: 78,9%; S6: 94%), que ocorreu apenas nestes quatro produtos.

Com relação aos teores de cobre, manganês e zinco, um grande número de amostras (100%, 98% e 93%, respectivamente) continha acima de 15% da IDR para adultos, portanto, a inclusão de PAD na dieta poderia contribuir como uma importante fonte destes compostos, especialmente de manganês e zinco, cuja deficiência é mais comum. Os produtos de origem animal, principalmente as carnes vermelhas, são as principais fontes de zinco na dieta dos brasileiros (PEREIRA; HESSEL, 2009), de modo que a ingestão insuficiente deste mineral pode ocorrer em vegetarianos, para os quais a inclusão de PAD como alimento seria interessante. Quanto ao manganês, as leguminosas, especialmente o feijão, e o café são as principais fontes deste mineral na dieta da população no Brasil, porém, estima-se que o consumo deste mineral esteja abaixo do recomendado, especialmente em mulheres (PANZIERA *et al.*, 2011), sendo o PAD um alimento que poderia contribuir para uma ingestão adequada deste composto.

A legislação brasileira não determina a IDR de potássio, porém, estima-se que no Brasil a prevalência de ingestão inadequada deste mineral é alta, considerando-se o que a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece 3,51 g/dia como o ideal (ARAUJO *et al.*, 2013; WHO, 2012). Uma porção de 25 g das amostras de PAD em estudo fornece de 3 a 7% do recomendado de potássio. Quanto ao teor de sódio, atualmente, há uma preocupação com a ingestão acima do

ideal, muitas vezes relacionada ao consumo de alimentos processados e industrializados. Uma porção de 25 g das amostras de PAD analisadas fornece, apenas, de 0,03 a 0,5% da ingestão máxima de 2 g/dia de sódio recomendada pela OMS (WHO, 2012).

### 3.1.2 Indicadores de potencial biológico

Na Tabela 7 são apresentados os teores de fenólicos totais e flavonoides totais das amostras, e na Tabela 8 é apresentada uma comparação destes resultados com a literatura consultada, pela qual se pode ver que os dados são, de maneira geral, similares. Embora o método de Folin-Ciocalteu não seja específico para compostos fenólicos, visto que certas substâncias como ácido ascórbico, aminas, carboidratos e compostos contendo enxofre também reagem com os ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco (HUANG; OU; PRIOR, 2005), este método tem sido amplamente utilizado para sinalizar o teor de fenólicos totais em amostras de alimentos, assim, os valores encontrados foram tratados como tal.

**Tabela 7.** Teor de fenólicos totais e flavonoides totais de 56 amostras de pólen apícola desidratado produzidas em nove Estados brasileiros.

Amostra	Fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)
A1	12,15 ± 0,16	1,98 ± 0,07
B1	8,89 ± 0,08	2,02 ± 0,01
C1	25,14 ± 0,08	4,62 ± 0,06
C2	20,19 ± 0,13	4,07 ± 0,10
C3	19,18 ± 0,19	5,82 ± 0,05
D5	9,28 ± 0,01	3,66 ± 0,06
E1	6,71 ± 0,13	1,59 ± 0,05
E2	19,01 ± 0,25	8,66 ± 0,15
E3	19,04 ± 0,75	9,44 ± 0,46
E4	14,50 ± 0,33	4,92 ± 0,16
E5	12,96 ± 0,19	6,25 ± 0,06
E6	8,13 ± 0,13	2,62 ± 0,13
E7	12,78 ± 0,17	1,69 ± 0,03
F2	6,98 ± 0,04	2,24 ± 0,01
G1	7,28 ± 0,28	1,99 ± 0,04
G2	6,48 ± 0,17	0,93 ± 0,03
G3	8,45 ± 0,32	1,27 ± 0,01
G4	7,11 ± 0,10	1,90 ± 0,06
G5	8,56 ± 0,13	3,71 ± 0,04

(Continua)

Tabela 7. Continuação...

Amostra	Fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)
G6	14,87 ± 0,35	3,87 ± 0,06
G7	7,05 ± 0,20	1,06 ± 0,02
G8	8,12 ± 0,20	1,30 ± 0,06
G9	7,39 ± 0,04	2,61 ± 0,08
G10	8,68 ± 0,33	4,30 ± 0,14
G11	9,62 ± 0,17	2,54 ± 0,09
H1	13,36 ± 0,60	1,29 ± 0,04
I1	14,34 ± 0,07	4,01 ± 0,20
K1	11,37 ± 0,43	3,31 ± 0,12
K2	9,62 ± 0,03	2,22 ± 0,09
K3	10,05 ± 0,12	2,12 ± 0,04
K4	10,80 ± 0,27	3,32 ± 0,05
L1	13,07 ± 0,19	1,88 ± 0,02
L3	29,24 ± 0,31	17,49 ± 0,12
M1	16,89 ± 0,33	1,15 ± 0,07
M2	19,10 ± 0,33	3,14 ± 0,22
N1	10,27 ± 0,36	4,01 ± 0,14
O1	12,91 ± 0,80	4,18 ± 0,30
Q1	11,56 ± 0,16	3,42 ± 0,26
R1	15,24 ± 0,61	10,73 ± 0,66
S1	15,88 ± 0,16	1,58 ± 0,07
S2	15,40 ± 0,25	1,66 ± 0,11
S3	13,78 ± 0,23	0,98 ± 0,07
S5	12,82 ± 0,07	0,35 ± 0,01
S6	14,04 ± 0,19	1,80 ± 0,01
U1	7,68 ± 0,17	5,50 ± 0,24
V1	10,32 ± 0,09	1,38 ± 0,01
X1	11,04 ± 0,01	1,97 ± 0,11
Z1	16,67 ± 0,25	1,30 ± 0,12
AA1	14,97 ± 0,42	4,37 ± 0,13
AA2	19,32 ± 0,41	7,12 ± 0,15
AB1	20,85 ± 0,20	6,83 ± 0,13
AC1	18,37 ± 0,26	4,53 ± 0,07
AC2	18,55 ± 0,43	4,79 ± 0,09
AC3	18,74 ± 0,44	4,84 ± 0,10
AD1	20,48 ± 0,29	4,25 ± 0,03
AD2	18,20 ± 0,45	3,84 ± 0,08
<b>Máximo</b>	<b>29,24 ± 0,31</b>	<b>17,49 ± 0,12</b>
<b>Mínimo</b>	<b>6,48 ± 0,17</b>	<b>0,35 ± 0,01</b>

A contribuição dos flavonoides no teor de fenólicos totais variou, consideravelmente, entre as amostras, de 3%, em um PAD coletado em São Paulo (S5: heterofloral com predominância de *Alternanthera* e *Vernonia*); a 72%, em um

produto oriundo do Rio Grande do Norte (U1: monofloral de *Mimosa verrucosa*). Em média, o conteúdo de flavonoides representou 27% do teor de fenólicos totais das amostras.

**Tabela 8.** Teor de fenólicos totais (mg EAG/g) e de flavonoides totais (mg EQ/g) em amostras de pólen apícola desidratado produzidas em diferentes Estados brasileiros e comparação com a literatura.

Parâmetro		Presente estudo	Referências						
			A	B	C	D	E	F	G
Fenólicos totais	Máx.	29,24	13,78	36,71	132,39	45,95	16,80	19,80	24,60
	Mín.	6,48	6,90	5,36	14,31	16,08	10,50	12,90	13,76
	Média	13,35	9,00	15,77	44,28	-	12,88	16,40	19,66
Flavonoides totais	Máx.	17,49	6,87	27,22	-	-	-	7,10	6,90
	Mín.	0,35	3,46	0,63	-	-	-	4,50	2,52
	Média	3,64	4,99	7,88	-	-	-	5,80	4,40

(A) Neves *et al.* (2009), amostras de Contagem/MG, Saúde/BA, São Cristóvão/SE e Maceió/AL;

(B) Vecchia *et al.* (2009), amostras de Mandirituba/PR;

(C) Menezes (2010), amostras de Alagoinhas/BA;

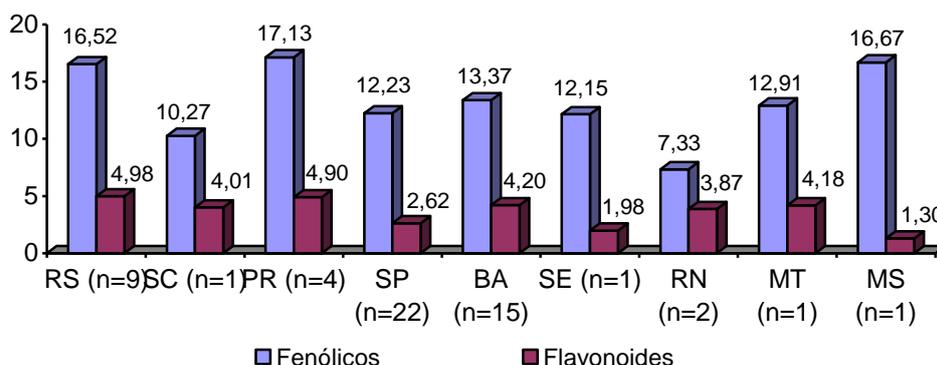
(D) Nogueira *et al.* (2012), amostras de Portugal;

(E) Morais *et al.* (2011), amostras de Portugal;

(F) Féas *et al.* (2012), amostras de Portugal;

(G) Arruda *et al.* (2013b), amostras da Região Nordeste.

Considerando-se o conteúdo médio por Estados, há uma tendência a maiores valores de fenólicos totais em amostras do Paraná, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, sendo que o maior teor destes compostos (L3: 29,24 ± 0,31 mg EAG/g) foi encontrado em uma das amostras coletadas no Estado do Rio Grande do Sul. Quanto ao teor de flavonoides totais, a tendência é que os maiores valores sejam encontrados em PAD do Rio Grande do Sul e Paraná. Na Figura 2 é apresentado o teor médio de compostos por Estados brasileiros.

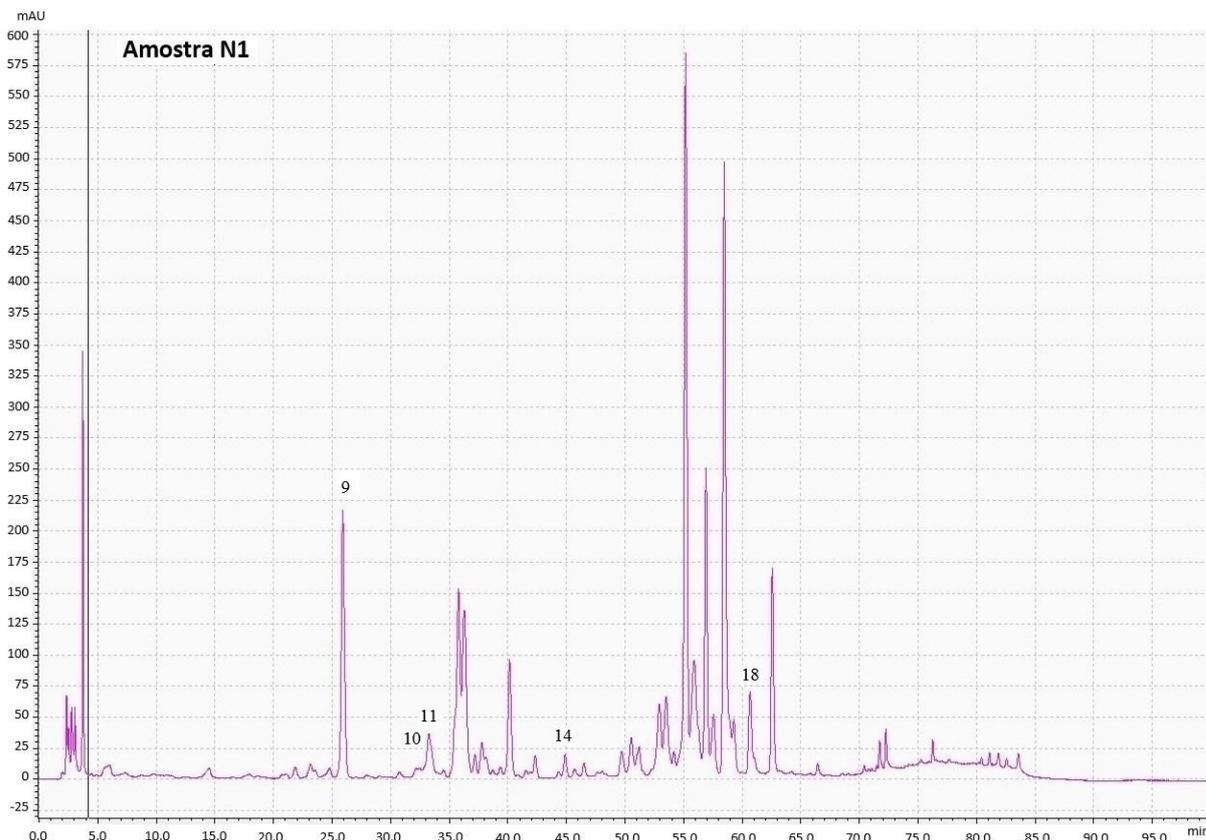


**Figura 2.** Teor médio de fenólicos totais e flavonoides totais em amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Estados.

Nas amostras coletadas na Região Sul, os valores de fenólicos totais ficaram abaixo do observado por Carpes *et al.* (2008), em 36 amostras (19,28 a 48,90 mg EAG/g), e por Arruda (2013), em 13 amostras (24,55 a 70,04 mg EAG/g), ambos os trabalhos com PAD coletado na Região Sul. Porém, quanto ao teor de flavonoides totais, os resultados deste estudo estão dentro do constado pelos autores, de 2,10 a 28,33 mg EQ/g (CARPES *et al.*, 2008) e de 3,60 a 36,85 mg EQ/g (ARRUDA, 2013). As diferenças observadas entre amostras coletadas no mesmo Estado ou Região podem estar relacionadas a origem botânica, bem como com as condições climáticas no momento da produção do grão de pólen pelo vegetal (ALMARAZ-ABARCA *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2011).

Os compostos quantificados por *HPLC-DAD* representaram de 0,5 a 42% do teor de fenólicos totais, sendo que apenas os flavonoides identificados por cromatografia representaram de 0,3 a 26% do teor de fenólicos (Tabela 9, Tabela 10). Uma análise geral dos cromatogramas sinaliza uma predominância de flavonoides em relação a outros compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos, isto porque a maioria dos picos ocorreu entre 30 e 40 min e, principalmente, após 50 min, quando a composição da fase móvel favoreceu a eluição de compostos de menor polaridade. No gradiente utilizado, quanto mais polar o composto, mais rápida a eluição, e sabe-se que os ácidos fenólicos têm alta polaridade, enquanto os flavonoides têm, em relação a estes, menor polaridade (ANGELO; JORGE, 2007; CARPES, 2008). Na Figura 3 é apresentado um cromatograma da amostra N1, o qual representa o perfil cromatográfico complexo observado em todas as amostras.

A rutina foi o principal composto nas amostras, presente em 68% destas. O maior teor de rutina foi observado em um PAD heterofloral com predominância de *Eupatorium* e *Piper*, coletado no Estado de São Paulo (D5: 236,93 ± 1,3 mg/100 g). A quercetina foi o segundo composto de maior ocorrência (66%), seguido do ácido vanílico, que estava presente em 59% dos produtos analisados. O ácido caféico foi o polifenol que menos ocorreu nas amostras, sendo identificado em apenas 3,6% dos produtos. O ácido β-resorcílico foi o composto em maior quantidade em uma única amostra (N1: 381,5 ± 5,69 mg/100 g, Santa Catarina, monofloral de *Brassica*) enquanto os menores valores foram observados para o ácido sinápico, cujo conteúdo máximo foi de 0,21 ± 0,01 mg/100 g (G8, São Paulo, heterofloral com predominância de *Cecropia* e *Myrcia*). Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados os flavonoides e demais polifenóis identificados e quantificados nas 56 amostras PAD.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico de uma das replicatas da amostra de pólen apícola desidratado de código N1.

- (9), ácido  $\beta$ -resorcílico UV  $\lambda_{\text{máx}}$  293 nm, TR = 25,9 min;  
 (10), ácido *p*-cumárico  $\lambda_{\text{máx}}$  310 nm, TR = 32,3 min;  
 (11), ácido ferúlico  $\lambda_{\text{máx}}$  323 nm, TR = 33,4 min;  
 (14), rutina  $\lambda_{\text{máx}}$  356 nm, TR = 45,1 min;  
 (18), campferol  $\lambda_{\text{máx}}$  362 nm, TR = 61,6 min.

**Tabela 9.** Flavonóides identificados e quantificados (mg/100 g de amostra) por HPLC-DAD, com base nos padrões.

Amostra	Cat	Epi	Nar	Rut	Nrg	Que	Kae
A1	4,07 $\pm$ 0,3	0,52 $\pm$ 0,0	-	-	-	5,11 $\pm$ 0,1	-
B1	-	-	-	5,79 $\pm$ 0,1	-	-	1,33 $\pm$ 0,0
C1	-	1,29 $\pm$ 0,1	2,02 $\pm$ 0,1	-	-	-	3,66 $\pm$ 0,3
C2	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-
D5	0,69 $\pm$ 0,1	2,87 $\pm$ 0,0	-	236,93 $\pm$ 1,3	-	-	-
E1	-	-	-	4,63 $\pm$ 0,3	-	7,06 $\pm$ 0,8	5,32 $\pm$ 0,4
E2	-	-	-	8,51 $\pm$ 0,7	-	53,73 $\pm$ 2,4	1,50 $\pm$ 0,0
E3	-	-	0,75 $\pm$ 0,0	-	3,50 $\pm$ 0,3	59,13 $\pm$ 3,4	1,66 $\pm$ 0,1
E4	-	-	-	4,05 $\pm$ 0,3	18,61 $\pm$ 0,7	30,04 $\pm$ 1,3	-
E5	6,61 $\pm$ 0,2	-	-	-	-	18,35 $\pm$ 0,8	8,86 $\pm$ 0,4
E6	-	-	-	4,99 $\pm$ 0,0	4,30 $\pm$ 0,1	5,84 $\pm$ 0,2	4,88 $\pm$ 0,3
E7	-	-	-	-	-	5,39 $\pm$ 0,2	-
F2	-	-	-	10,24 $\pm$ 0,1	13,21 $\pm$ 0,2	8,62 $\pm$ 0,1	39,60 $\pm$ 2,6

(Continua)

Tabela 9. Continuação...

Amostra	Cat	Epi	Nar	Rut	Nrg	Que	Kae
G1	-	-	-	11,31 ± 0,2	142,72 ± 0,5	2,93 ± 0,0	-
G2	-	-	-	-	5,89 ± 0,6	2,94 ± 0,2	-
G3	-	-	-	3,72 ± 0,1	4,60 ± 0,2	-	1,80 ± 0,1
G4	-	-	-	3,70 ± 0,1	23,90 ± 1,9	2,83 ± 0,0	-
G5	-	-	-	-	-	15,47 ± 0,2	-
G6	2,91 ± 0,3	-	10,14 ± 1,7	-	11,83 ± 0,1	5,45 ± 0,1	-
G7	-	1,52 ± 0,0	-	18,85 ± 0,6	10,68 ± 0,0	4,45 ± 0,1	3,40 ± 0,1
G8	-	-	-	36,06 ± 0,5	7,96 ± 0,4	-	2,23 ± 0,2
G9	-	-	-	-	14,02 ± 0,5	7,24 ± 0,5	3,13 ± 0,1
G10	1,49 ± 0,1	1,99 ± 0,0	-	35,09 ± 1,1	13,76 ± 0,6	11,83 ± 1,0	2,89 ± 0,2
G11	-	1,15 ± 0,0	-	54,13 ± 0,5	10,50 ± 0,4	10,76 ± 0,7	2,44 ± 0,1
H1	-	-	1,64 ± 0,0	-	11,46 ± 0,2	-	-
I1	-	-	-	6,37 ± 0,0	1,01 ± 0,1	7,96 ± 0,2	-
K1	1,27 ± 0,0	-	6,71 ± 0,3	-	4,20 ± 0,4	4,37 ± 0,2	-
K2	-	0,89 ± 0,1	-	49,12 ± 0,7	5,54 ± 0,2	4,29 ± 0,2	2,78 ± 0,1
K3	1,95 ± 0,1	-	3,17 ± 0,1	18,58 ± 0,3	4,49 ± 0,1	2,79 ± 0,2	-
K4	20,05 ± 0,2	-	7,51 ± 0,1	3,00 ± 0,1	7,39 ± 0,2	6,19 ± 0,5	-
L1	-	-	0,36 ± 0,0	-	-	15,64 ± 0,3	-
L3	1,90 ± 0,1	-	-	-	88,62 ± 3,6	63,31 ± 2,5	101,51 ± 2,0
M1	-	-	-	-	-	-	-
M2	12,82 ± 0,1	1,84 ± 0,0	-	13,87 ± 0,3	-	5,81 ± 0,1	-
N1	-	-	-	29,25 ± 0,2	-	-	1,92 ± 0,2
O1	-	-	-	8,03 ± 0,2	-	2,71 ± 0,0	-
Q1	-	-	-	5,04 ± 0,1	3,05 ± 0,3	2,66 ± 0,1	-
R1	-	0,44 ± 0,0	-	8,03 ± 0,1	-	16,22 ± 0,9	-
S1	-	0,78 ± 0,0	-	9,40 ± 0,5	5,12 ± 0,0	-	5,74 ± 0,3
S2	4,97 ± 0,4	-	-	13,51 ± 0,1	-	-	-
S3	-	-	1,82 ± 0,1	6,93 ± 0,1	29,18 ± 2,1	3,73 ± 0,3	-
S5	1,79 ± 0,0	-	-	3,73 ± 0,0	7,25 ± 0,9	-	-
S6	3,11 ± 0,2	-	-	13,51 ± 0,0	94,20 ± 2,0	5,85 ± 0,1	-
U1	-	-	-	9,76 ± 0,7	7,28 ± 0,0	-	15,79 ± 1,3
V1	-	-	-	4,31 ± 0,0	2,19 ± 0,1	1,54 ± 0,0	-
X1	-	-	-	5,25 ± 0,0	-	-	-
Z1	2,49 ± 0,0	-	-	63,66 ± 0,7	1,98 ± 0,2	-	-
AA1	-	-	-	23,13 ± 0,7	-	5,71 ± 0,5	-
AA2	-	1,09 ± 0,0	-	-	-	4,81 ± 0,3	2,21 ± 0,0
AB1	-	0,98 ± 0,0	-	-	-	2,75 ± 0,0	2,86 ± 0,1
AC1	-	-	-	26,49 ± 0,4	99,20 ± 0,9	-	-
AC2	-	-	-	21,97 ± 0,4	-	2,10 ± 0,0	-
AC3	-	-	-	22,32 ± 0,1	66,08 ± 2,0	-	-
AD1	-	-	-	28,52 ± 0,3	-	-	2,89 ± 0,2
AD2	-	-	-	34,68 ± 3,1	-	2,62 ± 0,1	-
<b>Mín.</b>	<b>0,69 ± 0,1</b>	<b>0,44 ± 0,0</b>	<b>0,36 ± 0,0</b>	<b>3,00 ± 0,1</b>	<b>1,01 ± 0,1</b>	<b>1,54 ± 0,0</b>	<b>1,33 ± 0,0</b>
<b>Máx.</b>	<b>20,05 ± 0,2</b>	<b>2,87 ± 0,0</b>	<b>10,14 ± 1,7</b>	<b>236,93 ± 1,3</b>	<b>142,72 ± 0,5</b>	<b>63,31 ± 2,5</b>	<b>101,51 ± 2,0</b>

Cat: catequina; Epi: epicatequina; Nar: naringina; Rut: rutina; Nrg: naringenina; Que: quercetina; Kae: kaempferol.

**Tabela 10.** Compostos fenólicos derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico identificados e quantificados (mg/100 g) por HPLC-DAD, com base nos padrões.

Amostra	AG	AP	ACI	AV	ACa	AbR	ASi	ApC	AF	ASn	ACi
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	8,91 ± 0,10	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	-	-	-	-	-	194,4 ± 11,2	-	7,46 ± 0,23	-	-	3,58 ± 0,15
C2	-	-	-	-	-	-	0,86 ± 0,00	8,50 ± 0,36	-	-	-
C3	-	-	-	1,10 ± 0,03	-	8,19 ± 0,07	5,69 ± 0,06	0,41 ± 0,01	-	-	-
D5	-	2,11 ± 0,02	1,70 ± 0,01	0,65 ± 0,02	-	5,41 ± 0,08	1,63 ± 0,04	-	2,10 ± 0,03	-	-
E1	-	-	3,88 ± 0,16	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	-	1,21 ± 0,00	-	1,10 ± 0,04	-	5,48 ± 0,39	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	24,43 ± 3,12	-	0,31 ± 0,02	-	-	-
E4	-	-	-	0,94 ± 0,07	-	-	2,29 ± 0,04	-	1,28 ± 0,03	-	-
E5	-	-	-	-	-	61,92 ± 0,48	-	-	1,14 ± 0,07	-	-
E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E7	-	-	-	-	-	10,60 ± 0,28	4,58 ± 0,18	-	-	-	-
F2	-	-	4,35 ± 0,12	1,94 ± 0,07	-	-	-	-	-	-	-
G1	-	-	-	-	-	-	-	0,99 ± 0,03	-	-	-
G2	-	-	1,28 ± 0,09	1,23 ± 0,03	-	-	-	1,89 ± 0,06	-	-	-
G3	-	-	-	-	-	-	-	3,59 ± 0,06	-	-	-
G4	-	-	-	1,65 ± 0,07	-	-	-	0,70 ± 0,02	-	-	-
G5	-	-	-	-	-	-	-	5,26 ± 0,25	-	0,09 ± 0,00	-
G6	-	-	-	2,20 ± 0,11	-	-	-	4,41 ± 0,06	-	-	-
G7	-	1,14 ± 0,00	4,94 ± 0,07	0,87 ± 0,02	-	-	-	9,42 ± 0,17	-	-	-
G8	-	-	4,27 ± 0,21	-	-	70,52 ± 0,53	3,48 ± 0,08	7,11 ± 0,25	-	0,21 ± 0,01	-
G9	-	-	6,73 ± 0,05	2,90 ± 0,07	-	95,78 ± 9,69	-	11,51 ± 0,08	-	-	0,69 ± 0,02
G10	-	1,25 ± 0,02	5,92 ± 0,17	1,23 ± 0,03	-	2,71 ± 0,05	-	9,29 ± 0,19	-	-	9,04 ± 0,08
G11	-	-	4,92 ± 0,07	0,99 ± 0,02	1,03 ± 0,03	-	-	8,07 ± 0,14	-	-	12,28 ± 0,11
H1	-	-	-	-	-	-	-	9,28 ± 0,09	-	-	-
I1	-	-	3,82 ± 0,10	0,82 ± 0,03	-	-	-	-	-	-	-
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,86 ± 0,18
K2	-	-	-	0,66 ± 0,00	-	-	-	-	-	-	21,12 ± 0,16

(Continua)

Tabela 10. Continuação...

Amostra	AG	AP	ACI	AV	ACa	AbR	ASi	ApC	AF	ASn	ACi
K3	2,14 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,46 ± 0,05
K4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,20 ± 0,14
L1	-	2,05 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3	-	-	-	3,07 ± 0,04	-	4,19 ± 0,07	-	6,68 ± 0,11	1,91 ± 0,01	-	-
M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,77 ± 0,38
M2	-	-	-	6,55 ± 0,06	-	-	14,84 ± 0,22	0,46 ± 0,02	-	-	-
N1	-	-	-	-	-	381,5 ± 5,69	-	1,61 ± 0,06	18,98 ± 0,01	-	-
O1	-	-	3,43 ± 0,11	-	-	-	-	0,65 ± 0,06	-	-	-
Q1	-	-	3,13 ± 0,06	1,61 ± 0,05	-	-	-	-	-	0,06 ± 0,00	-
R1	-	-	-	0,90 ± 0,07	-	-	1,60 ± 0,11	-	1,27 ± 0,01	0,18 ± 0,04	-
S1	-	-	-	1,08 ± 0,05	-	-	-	-	0,87 ± 0,02	-	-
S2	1,50 ± 0,1	-	-	3,68 ± 0,01	-	7,60 ± 0,11	-	0,96 ± 0,04	-	-	-
S3	-	-	-	7,77 ± 0,12	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	2,08 ± 0,03	-	7,68 ± 0,14	-	-	-	-	-
S6	-	3,15 ± 0,09	-	4,09 ± 0,08	-	-	-	-	-	-	-
U1	-	-	4,27 ± 0,10	1,64 ± 0,07	-	-	-	-	-	-	-
V1	-	-	3,25 ± 0,06	1,63 ± 0,03	-	-	-	-	-	-	-
X1	-	-	2,60 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
Z1	-	-	-	1,64 ± 0,02	-	-	-	1,22 ± 0,01	-	-	7,61 ± 0,31
AA1	-	-	-	0,61 ± 0,01	-	-	-	0,68 ± 0,08	0,90 ± 0,03	-	-
AA2	-	-	-	2,03 ± 0,03	5,17 ± 0,5	11,78 ± 0,12	-	0,32 ± 0,05	-	-	-
AB1	-	-	-	3,46 ± 0,11	-	-	3,42 ± 0,06	-	-	-	-
AC1	-	1,22 ± 0,03	-	-	-	14,75 ± 0,18	-	0,60 ± 0,00	0,74 ± 0,05	-	-
AC2	-	1,14 ± 0,03	-	0,64 ± 0,04	-	17,70 ± 0,14	-	1,33 ± 0,03	-	-	-
AC3	-	1,57 ± 0,02	-	5,92 ± 0,18	-	11,83 ± 0,17	-	-	-	-	-
AD1	-	-	-	5,23 ± 0,23	0,85 ± 0,1	16,24 ± 1,37	-	1,12 ± 0,03	1,65 ± 0,09	-	-
AD2	-	1,55 ± 0,03	-	0,66 ± 0,01	-	11,25 ± 0,41	-	0,67 ± 0,00	-	-	-
<b>Mín.</b>	<b>1,50 ± 0,1</b>	<b>1,14 ± 0,00</b>	<b>1,28 ± 0,09</b>	<b>0,61 ± 0,01</b>	<b>0,85 ± 0,1</b>	<b>2,71 ± 0,05</b>	<b>0,86 ± 0,00</b>	<b>0,31 ± 0,02</b>	<b>0,74 ± 0,05</b>	<b>0,06 ± 0,00</b>	<b>0,69 ± 0,02</b>
<b>Máx.</b>	<b>2,14 ± 0,1</b>	<b>3,15 ± 0,09</b>	<b>8,91 ± 0,10</b>	<b>7,77 ± 0,12</b>	<b>5,17 ± 0,5</b>	<b>381,5 ± 5,69</b>	<b>14,84 ± 0,22</b>	<b>11,5 ± 0,08</b>	<b>18,98 ± 0,01</b>	<b>0,21 ± 0,01</b>	<b>21,12 ± 0,16</b>

AG: ácido gálico; AP: ácido protocatéiquico; ACI: ácido clorogênico; AV: ácido vanílico; ACa: ácido caféico; AbR: ácido β-resorcílico; ASi: ácido siríngico; ApC: ácido p-cumárico; AF: ácido ferúlico; ASn: ácido sinápico; ACi: ácido cinâmico.

Ulusoy e Kolayli (2014), em trinta amostras de PAD produzidas na Turquia, identificaram os ácidos gálico, protocatéquico, clorogênico, vanílico, caféico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico e *trans*-cinâmico, em quantidades que variaram de 4,73 a 259,53  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de PAD, além dos flavonoides epicatequina, rutina e quercetina, cujas concentrações variaram de 25,59 a 692,85  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de amostra. Os autores sugerem que certos compostos fenólicos poderiam servir como marcadores para determinar a origem botânica do PAD, algo que, de acordo com Kaskoniené e Venskutonis (2010), já é feito com o mel. Mas, para tal, é necessário identificar compostos específicos, pois alguns polifenóis são comuns a muitas espécies vegetais. Freire *et al.* (2012) pesquisaram a ocorrência de certos flavonoides em 25 amostras de PAD coletadas na Bahia e concluíram que os compostos isoquercetina, quercetina e isoramnetina não poderiam ser considerados marcadores taxonômicos, pois estavam presentes em mais de 90% das amostras de diferentes origens botânicas.

Fanali, Dugo e Rocco (2013) analisaram amostras heteroflorais de PAD e identificaram nove compostos fenólicos: ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, miricetina, quercetina, naringenina, hesperidina e campferol. Negri *et al.* (2011) analisaram amostras heteroflorais produzidas no município de Pindamonhangaba/SP e identificaram flavonóis glicosídeos derivados de quercetina, campferol e isoramnetina, uma chalcona e derivados de ácido cinâmico. Tavidishvili *et al.* (2014) analisaram amostras de PAD produzidas nos EUA e identificaram os compostos naringina, rutina e quercetina, cujo montante representou 20% do conteúdo de flavonóides nas amostras. No presente estudo, os flavonoides identificados por *HPLC-DAD* representaram de 1 a 79% do teor de flavonoides totais por espectrometria.

Lv *et al.*, (2015) analisaram uma amostra de PAD monofloral de *Brassica campestris* L. e identificaram os compostos quercetina e campferol em teores de 0,97 a 23,44 mg/g de amostra. Ketkar *et al.* (2014), em estudo realizado com PAD monofloral de *Brassica juncea*, confirmaram a presença de quercetina e campferol, mas em menor quantidade: 0,05 e 0,06 mg/g de PAD, respectivamente. No presente estudo foram analisadas cinco amostras monoflorais do gênero *Brassica* (C1, C2, C3, N1, O1), em duas delas o campferol estava presente (C1: 3,66 mg/g; N1: 1,92 mg/g) e em apenas uma a quercetina foi identificada (O1: 2,71 mg/g). É possível que as espécies do gênero *Brassica*, nas amostras do presente estudo, sejam diferentes

das citadas acima, o que poderia explicar a presença ou não desses flavonoides. Ademais, mesmo se alguma das espécies nas amostras C1, C2, C3, N1 e O1 fosse a mesma dos trabalhos acima, deve-se considerar que, em uma espécie vegetal, determinado polifenol pode ou não estar presente a certa altura, uma vez que a síntese de um metabólito secundário pode ocorrer apenas em resposta a algum estímulo (FREIRE *et al.*, 2012).

### 3.1.2.1 Capacidade antioxidante do extrato etanólico de PAD

Na Tabela 11 é apresentada a capacidade antioxidante das amostras por ambos os métodos (método DPPH em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/g e em  $\text{EC}_{50}$ ).

**Tabela 11.** Capacidade antioxidante pelo método DPPH e pelo método ORAC de 56 amostras de pólen apícola desidratado.

Amostra	Capacidade antioxidante		
	DPPH		ORAC
	$\mu\text{mol ET/g}$	$\text{EC}_{50}$	$\mu\text{mol ET/g}$
A1	29,44 ± 0,56	2,42 ± 0,07	222,49 ± 9,59
B1	17,17 ± 0,84	4,64 ± 0,11	166,71 ± 2,82
C1	150,95 ± 1,48	0,42 ± 0,00	388,06 ± 13,7
C2	114,47 ± 1,34	0,54 ± 0,01	306,24 ± 3,26
C3	94,78 ± 1,26	0,64 ± 0,01	342,56 ± 10,5
D5	33,15 ± 0,50	1,86 ± 0,02	305,55 ± 9,94
E1	19,10 ± 0,75	3,57 ± 0,06	174,55 ± 7,53
E2	139,70 ± 4,53	0,45 ± 0,01	562,98 ± 15,4
E3	133,33 ± 4,16	0,48 ± 0,01	525,44 ± 8,48
E4	88,17 ± 1,23	0,77 ± 0,00	329,55 ± 2,14
E5	53,50 ± 1,86	1,17 ± 0,02	324,10 ± 6,35
E6	36,19 ± 0,83	1,80 ± 0,05	249,55 ± 3,63
E7	54,39 ± 1,35	1,13 ± 0,03	375,65 ± 10,4
F2	24,50 ± 1,11	3,28 ± 0,08	257,32 ± 14,9
G1	16,41 ± 0,73	4,32 ± 0,18	221,53 ± 9,09
G2	22,40 ± 1,10	2,70 ± 0,04	208,98 ± 1,60
G3	39,93 ± 0,63	1,58 ± 0,02	233,82 ± 13,6
G4	14,11 ± 0,25	4,94 ± 0,08	279,78 ± 4,15
G5	30,85 ± 0,28	2,08 ± 0,03	257,07 ± 13,9
G6	39,10 ± 0,39	1,59 ± 0,02	197,28 ± 3,72
G7	33,28 ± 0,44	2,03 ± 0,07	228,75 ± 6,89
G8	28,86 ± 0,68	2,36 ± 0,06	246,15 ± 10,3
G9	23,24 ± 0,12	3,00 ± 0,04	200,20 ± 5,99
G10	29,20 ± 0,31	2,27 ± 0,10	214,25 ± 3,33
G11	38,99 ± 0,16	1,60 ± 0,03	196,04 ± 6,30
H1	154,73 ± 4,53	0,38 ± 0,02	285,82 ± 16,5
I1	19,54 ± 0,30	3,29 ± 0,05	195,61 ± 3,95
K1	42,17 ± 0,83	1,57 ± 0,02	330,88 ± 7,97
K2	40,06 ± 0,79	1,98 ± 0,02	280,02 ± 10,6

(Continua)

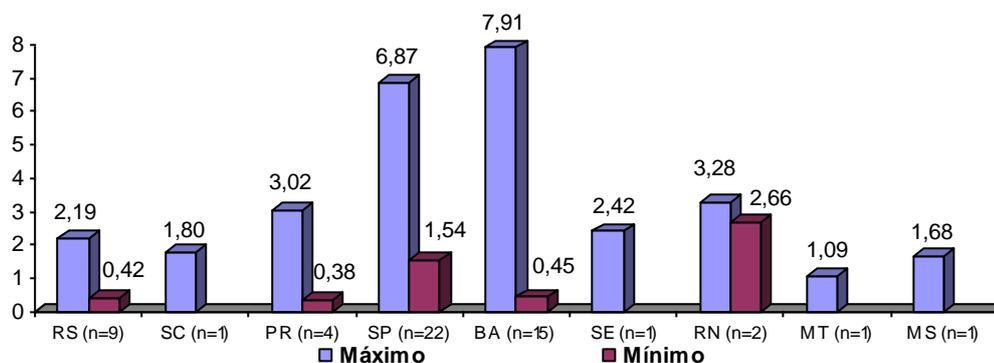
Tabela 11. Continuação...

Amostra	Capacidade antioxidante		
	DPPH		ORAC
	$\mu\text{mol ET/g}$	$\text{EC}_{50}$	$\mu\text{mol ET/g}$
K3	31,52 ± 0,81	2,19 ± 0,05	268,28 ± 6,34
K4	45,24 ± 0,58	1,53 ± 0,02	288,49 ± 16,9
L1	53,83 ± 1,60	1,10 ± 0,02	325,46 ± 8,25
L3	102,71 ± 0,42	0,60 ± 0,00	545,93 ± 29,5
M1	63,77 ± 1,30	0,97 ± 0,02	205,66 ± 9,38
M2	31,09 ± 0,98	1,97 ± 0,06	237,46 ± 2,19
N1	36,09 ± 1,60	1,80 ± 0,05	249,95 ± 13,6
O1	57,35 ± 4,35	1,09 ± 0,10	231,09 ± 12,4
Q1	20,76 ± 0,58	3,02 ± 0,18	144,47 ± 9,63
R1	32,88 ± 0,28	1,95 ± 0,14	182,97 ± 14,4
S1	19,88 ± 0,31	3,21 ± 0,07	228,62 ± 12,5
S2	41,13 ± 0,53	1,54 ± 0,02	243,24 ± 3,70
S3	18,38 ± 0,34	3,79 ± 0,14	161,89 ± 5,18
S5	10,14 ± 0,16	6,87 ± 0,30	228,33 ± 4,95
S6	12,75 ± 1,15	5,01 ± 0,42	207,40 ± 1,49
U1	26,31 ± 1,12	2,66 ± 0,11	247,38 ± 13,9
V1	9,43 ± 0,37	7,91 ± 0,04	133,15 ± 2,38
X1	11,38 ± 0,41	6,14 ± 0,05	152,98 ± 1,59
Z1	36,17 ± 0,18	1,68 ± 0,09	355,92 ± 6,20
AA1	20,85 ± 0,79	3,02 ± 0,12	249,14 ± 4,47
AA2	58,04 ± 1,78	1,04 ± 0,06	346,63 ± 14,9
AB1	81,23 ± 1,59	0,73 ± 0,04	375,11 ± 3,22
AC1	24,48 ± 0,78	2,61 ± 0,09	365,05 ± 11,5
AC2	35,04 ± 0,27	1,77 ± 0,01	320,86 ± 8,47
AC3	35,64 ± 0,42	1,74 ± 0,03	311,17 ± 10,8
AD1	31,18 ± 0,23	1,99 ± 0,02	295,04 ± 5,36
AD2	26,29 ± 1,19	2,35 ± 0,09	279,85 ± 15,9
<b>Máximo</b>	<b>154,73 ± 4,53</b>	<b>7,91 ± 0,04</b>	<b>562,98 ± 15,4</b>
<b>Mínimo</b>	<b>9,43 ± 0,37</b>	<b>0,38 ± 0,02</b>	<b>133,15 ± 2,38</b>

A amostra com maior capacidade antioxidante, pelo método DPPH, foi uma heterofloral com predominância de *Mimosa scabrella* e *Brassica*, produzida no Paraná (H1); enquanto a amostra com a menor capacidade foi coletada na Bahia e classificada como monofloral de *Cocos nucifera* (V1). Também na amostra V1 foi observada a menor capacidade antioxidante pelo método ORAC, já o maior valor foi constatado em uma amostra oriunda da Bahia e classificada como heterofloral, com predominância de *Eucalyptus* e *Mimosa caesalpiniaefolia* (E2). Variações entre os métodos podem estar relacionadas às diferentes espécies reativas (DPPH: DPPH•; ORAC: radical peroxila) e esquemas (DPPH: não competitivo; ORAC: competitivo). Cada antioxidante possui uma capacidade intrínseca de desativar ou não as espécies reativas, relacionada a características físico-químicas da molécula e ao meio onde ocorre a reação (CAMPOS *et al.*, 2008; OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Em estudo realizado por Freire *et al.* (2012), a capacidade antioxidante, em  $EC_{50}$ , de 25 amostras de PAD coletadas no Estado da Bahia variou de 10,7 a 209,1 mg/mL pelo método DPPH, de modo que estes valores são superiores ao observado no presente estudo nas amostras coletadas neste mesmo Estado ( $0,45 \pm 0,01$  a  $7,91 \pm 0,04$  mg/mL). É importante considerar que, quanto maior o valor de  $EC_{50}$ , menor a eficiência da amostra em desativar o radical, portanto, as amostras deste estudo possuem capacidade antioxidante bastante superior ao observado por Freire *et al.* Por outro lado, em PAD coletado na Bahia, Arruda (2013) constatou  $EC_{50}$  entre 1,30 e 5,74 mg/mL, de modo que os dados deste estudo estão mais próximos aos observados por esta autora.

Arruda (2013) analisou amostras coletadas no Estado de Sergipe (1,38 a 6,24 mg/mL), Rio Grande do Norte (4,25 e 8,08 mg/mL), São Paulo (0,70 a 4,61 mg/mL), Mato Grosso (8,68 a 13,42 mg/mL), Santa Catarina (1,41 a 2,28 mg/mL) e Rio Grande do Sul (0,40 a 2,21 mg/mL). Na Figura 4 é possível observar que para alguns Estados (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Bahia e Sergipe) os valores deste estudo foram semelhantes aos observados por Arruda (2013), enquanto para outros os valores divergiram (Rio Grande do Norte e Mato Grosso).



**Figura 4.** Valor máximo e mínimo da capacidade antioxidante pelo método DPPH em amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Estados

Os maiores valores pelo método *ORAC* ( $E2: 562,98 \pm 15,4$ ;  $E3: 525,44 \pm 8,48$ ;  $L3: 545,93 \pm 29,5$   $\mu\text{mol ET/g}$ ) foram observados nas duas amostras com acima de 60% de pólen de *Eucalyptus* em sua composição ( $E2$  e  $E3$ ) e na amostra com elevada participação do gênero *Myrcia* ( $L3: 92,5\%$ ). Estes resultados sinalizam a necessidade de um estudo mais aprofundado de amostras monoflorais destes tipos polínicos com vistas à produção de PAD de elevada capacidade antioxidante. Os

três menores valores ( $133,15 \pm 2,38$  a  $152,98 \pm 1,59$   $\mu\text{mol ET/g}$ ) foram observados em amostras com predominância de pólen de *Cocos nucifera* (V1, Q1, X1). Arruda *et al.* (2013b), em amostras de PAD com predominância de *Cocos nucifera*, constataram capacidade antioxidante de 195,15 a 294,69  $\mu\text{mol ET/g}$ .

A média dos valores observados pelo método ORAC (273  $\mu\text{mol ET/g}$ ) foi maior que o de frutas *in natura*, como o morango (43,02  $\mu\text{mol ET/g}$ ) e a maçã (30,49  $\mu\text{mol ET/g}$ ), e das "berries", como a framboesa-preta (*raspberry*) (192,20  $\mu\text{mol ET/g}$ ), o mirtilo (*blueberry*) (96,21  $\mu\text{mol ET/g}$ ) e o oxicoco ou mirtilo-vermelho (*cranberries*) (90,90  $\mu\text{mol ET/g}$ ) (USDA, 2010). Gonçalves (2008) analisou 16 frutas nativas do Brasil e observou valores de 82 a 790  $\mu\text{mol ET/g}$ , sendo o maior na camu-camu (*Myrciaria dubia*) e o menor no buriti (*Mauritia flexuosa*), enquanto *Astrocaryum aculeatum* (tucumã), *Passiflora ligularis* Juss (granadilha) e *Solanum sessiliflorum* (maná-cubiu) apresentaram, respectivamente, 215, 218 e 320  $\mu\text{mol ET/g}$ , dos quais a média do presente estudo se aproxima.

A análise de correlação de Pearson indicou que entre a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos totais há média ou forte correlação (DPPH:  $r=0,5692$ ,  $p=0,000$ ; ORAC:  $r=0,6144$ ,  $p=0,000$ ) e com o teor de flavonoides totais a correlação, também, é média ou forte (DPPH:  $r=0,4656$ ,  $p=0,000$ ; ORAC:  $r=0,6405$ ,  $p=0,000$ ). Os resultados corroboram com estudos em que se identificou correlação positiva entre o teor de fenólicos, especialmente de flavonoides, e a capacidade antioxidante do PAD (LEBLANC *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2011; MOHDALY *et al.*, 2015).

Dos polifenóis identificados, apenas a quercetina parece ter influenciado de maneira positiva na capacidade antioxidante do PAD. Houve forte correlação deste composto com os valores do método ORAC ( $r=0,6570$ ,  $p=0,000$ ) e correlação média com os resultados do DPPH ( $r=0,4873$ ,  $p=0,000$ ). A ação antioxidante dos flavonoides depende do arranjo dos grupos funcionais e do número de grupos hidroxila (OH) na molécula (PIETTA, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). A quercetina é um pentahidroxi flavonol com um dos grupos OH na posição 3, uma dupla ligação entre as posições 2,3 em conjugação com a função 4-oxo no anel pirano e um grupo 3',4'-catecol no anel B, o que confere, em relação a moléculas sem essa configuração, maior capacidade para desativar espécies reativas, como o radical peróxido utilizado no método ORAC (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Quanto aos demais resultados, houve apenas uma correlação fraca entre a capacidade antioxidante pelo método *ORAC* e a naringina ( $r=0,2360$ ,  $p=0,080$ ) e com o ácido protocatéquico ( $r=0,1276$ ,  $p=0,349$ ), e entre a capacidade antioxidante pelo método *DPPH* e o ácido *p*-cumárico ( $r=0,2897$ ,  $p=0,030$ ), a naringina ( $r=0,2453$ ,  $p=0,068$ ), o campferol ( $r=0,1725$ ,  $p=0,204$ ) e com o ácido  $\beta$ -resorcílico ( $r=0,1434$ ,  $p=0,292$ ). Estes dados indicam que outros compostos fenólicos tenham papel importante na capacidade antioxidante do PAD.

Esperava-se uma maior correlação entre a capacidade antioxidante das amostras e os compostos identificados, especialmente a rutina, cujo elevado potencial antioxidante já foi reportado (YANG; GUO; YUAN, 2008). Estudos mais aprofundados são necessários para identificar um maior número de compostos, avaliar o comportamento dos compostos antioxidantes na matriz alimentícia PAD e determinar possíveis interferentes. Embora existam registros de ácidos fenólicos e flavonoides que possuem ação antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007; DAI; MUMPER, 2010), uma correlação nem sempre ocorre quando analisa-se um alimento. Ulusoy e Kolayli (2014) identificaram em amostras de PAD nove compostos fenólicos (seis dos quais foram constatados no presente estudo) e capacidade antioxidante, em  $EC_{50}$ , de 0,65 a 8,20 mg/mL, porém apenas o ácido *p*-cumárico teve alguma correlação com os valores do *DPPH*.

### 3.1.2.2 Capacidade antimicrobiana do extrato metanólico de PAD

Com relação à capacidade antimicrobiana, as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis que as bactérias Gram negativas (Tabela 12). Cabrera e Montenegro (2013), ao analisarem PAD coletado no Chile, também observaram maior resistência das bactérias Gram negativas, o que, segundo Morais *et al.* (2011), pode estar relacionado a membrana externa que envolve a célula, ausente nas bactérias Gram positivas, cuja estrutura química pode restringir a passagem de agentes antimicrobianos. Com relação às leveduras, estas foram mais resistentes que as bactérias, fato também observado por Graikou *et al.* (2011) ao analisarem extratos de PAD produzido na Grécia. Os autores associaram a capacidade antimicrobiana das amostras à ação de certos flavonoides. A capacidade antimicrobiana das 56 amostras de PAD em estudo frente aos 10 micro-organismos testados é apresentada a seguir.

**Tabela 12.** Concentração mínima inibitória (mg/mL) de amostra capaz de inibir o crescimento visível de *Streptococcus pyogenes* (Sp), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec), *Klebsiella* (K) e *Candida albicans* (Ca).

Amostra	Sp ESA12	Sp 12344	Sa ESA 54	Sa 25923	Ec ESA 72	Ec 25922	K spp	K 1705	Ca ESA109	Ca 60193
A1	4,2 ± 0,7	3,3 ± 0,3	5,0 ± 0,9	3,1 ± 0,8	6,0 ± 0,7	4,5 ± 0,4	6,7 ± 0,4	4,6 ± 0,2	26,2 ± 1,3	21,8 ± 1,5
B1	2,1 ± 0,8	1,7 ± 0,7	2,8 ± 0,4	2,2 ± 0,4	4,0 ± 0,6	2,8 ± 0,7	4,2 ± 0,4	3,0 ± 0,4	17,1 ± 1,5	13,8 ± 2,2
C1	4,3 ± 0,4	3,4 ± 0,3	5,7 ± 0,5	4,3 ± 0,6	5,8 ± 1,1	3,6 ± 0,2	6,8 ± 0,7	4,2 ± 0,6	28,8 ± 2,5	20,6 ± 2,1
C2	4,4 ± 0,9	3,2 ± 0,9	5,4 ± 0,4	3,7 ± 0,2	6,0 ± 0,4	4,0 ± 0,5	7,4 ± 1,1	4,1 ± 0,7	28,9 ± 3,6	20,7 ± 2,8
C3	4,4 ± 0,9	3,0 ± 0,5	5,5 ± 0,1	3,2 ± 0,3	5,8 ± 0,8	4,2 ± 0,6	7,2 ± 0,8	3,6 ± 0,5	26,1 ± 2,1	20,4 ± 3,5
D5	2,4 ± 0,3	1,4 ± 0,0	2,8 ± 0,2	2,4 ± 0,5	4,4 ± 0,4	3,2 ± 0,4	4,1 ± 0,0	3,1 ± 0,2	20,5 ± 3,5	16,5 ± 0,4
E1	3,1 ± 0,3	1,9 ± 0,5	3,6 ± 0,7	2,3 ± 0,4	5,2 ± 0,2	4,0 ± 0,2	5,7 ± 0,5	4,4 ± 0,4	14,2 ± 2,5	12,7 ± 1,3
E2	3,2 ± 0,7	2,5 ± 0,7	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,7	5,1 ± 0,8	3,5 ± 0,6	6,1 ± 0,4	3,9 ± 0,1	16,6 ± 2,4	14,2 ± 2,4
E3	2,0 ± 0,6	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,8	2,5 ± 0,6	3,3 ± 0,5	2,6 ± 0,4	4,1 ± 0,4	3,1 ± 0,2	11,9 ± 2,4	10,3 ± 1,4
E4	3,4 ± 0,5	2,0 ± 0,3	3,7 ± 0,1	4,5 ± 0,6	5,5 ± 0,4	3,9 ± 0,3	6,2 ± 0,4	4,6 ± 0,8	14,9 ± 3,6	12,6 ± 3,6
E5	2,9 ± 0,6	1,7 ± 0,6	4,0 ± 0,7	3,8 ± 0,2	5,5 ± 0,8	4,2 ± 0,4	6,2 ± 0,6	4,8 ± 0,1	16,7 ± 0,9	12,6 ± 1,4
E6	2,1 ± 0,4	1,3 ± 0,1	3,8 ± 0,5	3,2 ± 0,3	5,4 ± 0,2	4,6 ± 0,4	5,8 ± 0,4	4,6 ± 0,6	15,1 ± 3,5	12,4 ± 3,3
E7	3,2 ± 0,4	1,5 ± 0,4	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,4	4,7 ± 0,5	3,2 ± 0,5	4,9 ± 0,7	3,4 ± 0,8	14,2 ± 2,4	11,1 ± 1,4
F2	3,5 ± 0,7	2,2 ± 0,3	5,6 ± 0,9	4,6 ± 0,3	6,2 ± 0,6	5,4 ± 0,3	7,2 ± 0,9	5,5 ± 0,7	19,1 ± 2,1	13,8 ± 0,5
G1	3,5 ± 1,1	2,6 ± 0,7	5,2 ± 0,4	4,1 ± 0,2	5,6 ± 0,3	4,5 ± 0,3	6,2 ± 1,0	5,1 ± 1,0	13,6 ± 1,4	10,4 ± 1,4
G2	4,1 ± 1,2	2,4 ± 0,5	5,8 ± 0,3	4,0 ± 0,5	5,6 ± 0,5	4,1 ± 1,0	6,7 ± 0,5	4,9 ± 0,3	12,7 ± 1,5	9,9 ± 0,9
G3	3,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	4,9 ± 0,3	3,8 ± 0,5	5,0 ± 0,8	4,1 ± 1,1	5,9 ± 0,6	4,3 ± 0,5	13,4 ± 1,0	10,2 ± 0,7
G4	4,2 ± 1,0	2,3 ± 0,3	4,7 ± 0,4	3,4 ± 0,5	5,3 ± 0,4	3,8 ± 0,8	6,4 ± 0,7	4,3 ± 0,9	13,0 ± 1,7	9,5 ± 0,5
G5	4,2 ± 0,8	2,5 ± 0,7	4,5 ± 0,2	3,6 ± 0,2	5,4 ± 0,3	4,2 ± 0,6	6,2 ± 0,6	4,1 ± 0,6	12,1 ± 2,6	9,7 ± 0,7
G6	3,9 ± 0,5	2,4 ± 0,5	4,3 ± 0,5	3,0 ± 0,1	5,0 ± 0,3	3,9 ± 0,4	6,0 ± 0,7	3,9 ± 0,5	12,4 ± 2,7	9,8 ± 0,3
G7	4,7 ± 1,0	4,3 ± 0,5	6,2 ± 0,8	5,1 ± 1,0	6,9 ± 0,5	5,8 ± 0,6	7,8 ± 0,3	6,5 ± 0,5	21,1 ± 1,7	15,5 ± 1,2
G8	5,9 ± 0,7	4,3 ± 0,0	7,2 ± 0,5	5,9 ± 1,1	7,8 ± 0,7	6,0 ± 0,7	8,7 ± 0,7	6,4 ± 0,6	21,5 ± 2,4	15,9 ± 1,4
G9	4,8 ± 0,4	3,0 ± 0,5	5,3 ± 1,0	4,1 ± 0,7	5,5 ± 0,7	3,9 ± 0,5	5,7 ± 0,9	4,6 ± 0,3	12,6 ± 1,4	10,1 ± 1,5
G10	3,6 ± 0,5	2,2 ± 0,5	5,0 ± 0,6	3,5 ± 0,1	5,1 ± 0,3	3,3 ± 0,5	5,8 ± 0,4	4,4 ± 0,7	11,1 ± 1,4	9,8 ± 1,4
G11	3,3 ± 0,5	1,8 ± 0,3	4,3 ± 0,5	3,2 ± 0,3	4,4 ± 0,7	3,3 ± 1,0	5,2 ± 1,0	4,0 ± 0,3	10,3 ± 1,4	8,7 ± 1,2
H1	1,7 ± 0,6	1,1 ± 0,3	2,9 ± 0,5	2,0 ± 0,4	3,6 ± 0,6	2,9 ± 0,5	4,9 ± 0,5	2,7 ± 0,3	10,6 ± 1,0	12,1 ± 0,3
I1	2,9 ± 0,5	2,0 ± 0,4	3,3 ± 0,6	3,0 ± 0,6	4,5 ± 0,7	3,2 ± 0,7	5,6 ± 0,6	3,4 ± 0,6	12,0 ± 0,8	13,2 ± 1,2
K1	2,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	3,7 ± 0,5	2,4 ± 0,5	4,2 ± 0,8	2,7 ± 0,8	4,7 ± 0,7	3,7 ± 0,4	10,0 ± 1,1	8,5 ± 0,4

(Continua)

Tabela 12. Continuação...

Amostra	Sp ESA12	Sp 12344	Sa ESA 54	Sa 25923	Ec ESA 72	Ec 25922	K spp	K 1705	Ca ESA109	Ca 60193
K2	2,3 ± 0,5	1,6 ± 0,1	3,6 ± 0,2	2,5 ± 0,7	4,0 ± 0,5	2,7 ± 0,3	4,6 ± 0,7	3,5 ± 0,7	10,2 ± 0,6	8,1 ± 1,3
K3	2,3 ± 0,6	1,6 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,3 ± 0,4	5,4 ± 0,4	4,5 ± 0,3	11,1 ± 1,0	9,0 ± 1,0
K4	3,3 ± 0,4	2,1 ± 0,1	4,2 ± 0,6	3,4 ± 0,3	4,7 ± 0,4	3,8 ± 0,4	5,9 ± 0,4	4,9 ± 0,4	12,2 ± 0,3	10,4 ± 1,3
L1	3,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2	4,9 ± 0,2	3,7 ± 0,4	6,3 ± 0,6	4,7 ± 0,7	6,7 ± 0,6	5,6 ± 0,5	12,3 ± 0,7	10,3 ± 0,5
L3	4,5 ± 0,5	3,2 ± 0,8	5,7 ± 0,1	4,5 ± 0,8	6,1 ± 0,7	4,8 ± 0,3	6,6 ± 0,5	5,5 ± 0,7	12,6 ± 0,8	10,6 ± 1,4
M1	5,2 ± 0,4	3,9 ± 0,6	6,7 ± 0,6	5,7 ± 0,3	7,5 ± 0,5	6,3 ± 0,9	8,6 ± 0,5	6,8 ± 0,2	14,4 ± 1,8	12,6 ± 1,3
M2	5,7 ± 0,5	4,3 ± 0,4	6,7 ± 0,6	5,4 ± 0,5	7,4 ± 1,0	6,2 ± 0,5	8,3 ± 0,1	6,8 ± 0,7	14,6 ± 1,7	12,3 ± 1,4
N1	2,6 ± 0,9	1,6 ± 0,0	3,2 ± 0,4	1,9 ± 0,5	3,6 ± 0,4	2,2 ± 0,2	4,5 ± 0,6	2,8 ± 0,7	10,3 ± 0,8	7,8 ± 0,7
O1	2,0 ± 0,1	1,3 ± 0,5	2,7 ± 0,6	1,6 ± 0,2	2,9 ± 0,5	1,9 ± 0,4	3,6 ± 0,4	2,4 ± 0,1	9,4 ± 1,0	7,2 ± 1,0
Q1	2,2 ± 0,4	1,7 ± 0,2	3,2 ± 0,4	2,6 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,0 ± 0,5	4,0 ± 0,2	3,1 ± 0,4	10,6 ± 1,1	8,0 ± 0,8
R1	5,2 ± 0,4	3,4 ± 0,3	5,8 ± 0,5	4,2 ± 0,5	6,2 ± 0,7	4,8 ± 0,3	6,6 ± 0,5	5,5 ± 0,1	15,4 ± 0,9	11,8 ± 0,1
S1	4,3 ± 0,3	2,5 ± 0,7	5,0 ± 0,4	3,9 ± 0,2	5,4 ± 0,3	4,3 ± 0,3	6,0 ± 0,9	4,9 ± 1,0	13,1 ± 1,3	9,7 ± 1,7
S2	5,4 ± 0,2	3,8 ± 0,5	5,7 ± 0,4	4,7 ± 0,5	6,1 ± 1,0	4,9 ± 0,5	7,5 ± 0,5	5,0 ± 0,5	13,4 ± 2,7	9,9 ± 1,7
S3	3,5 ± 0,2	2,3 ± 0,5	4,9 ± 0,7	4,1 ± 0,5	5,2 ± 0,5	4,4 ± 0,7	6,5 ± 0,7	4,6 ± 0,4	12,4 ± 1,6	9,4 ± 2,0
S5	4,1 ± 0,6	3,1 ± 0,7	5,0 ± 0,5	3,8 ± 0,5	5,2 ± 0,5	4,0 ± 0,8	5,9 ± 0,9	4,1 ± 0,8	10,8 ± 0,8	8,5 ± 0,9
S6	4,2 ± 0,3	3,4 ± 0,8	5,2 ± 0,5	3,7 ± 0,7	5,6 ± 0,7	4,4 ± 0,8	6,9 ± 1,0	5,3 ± 1,1	14,0 ± 3,8	9,2 ± 1,9
U1	3,2 ± 0,9	1,9 ± 0,5	6,0 ± 0,2	3,5 ± 0,5	6,3 ± 0,6	4,1 ± 1,0	6,9 ± 0,7	5,5 ± 0,9	18,5 ± 1,0	14,6 ± 1,2
V1	3,3 ± 0,5	2,2 ± 0,4	4,4 ± 0,4	3,1 ± 0,7	5,4 ± 0,5	4,3 ± 0,7	6,0 ± 0,5	5,4 ± 0,2	13,5 ± 1,2	10,4 ± 1,2
X1	4,1 ± 1,2	2,4 ± 0,5	5,8 ± 0,3	4,1 ± 0,5	5,6 ± 0,6	4,1 ± 1,0	6,7 ± 0,5	4,9 ± 0,3	12,7 ± 1,5	8,6 ± 1,4
Z1	5,9 ± 0,4	4,9 ± 0,7	6,3 ± 0,7	5,2 ± 0,6	6,5 ± 0,9	5,9 ± 0,7	7,6 ± 1,4	6,2 ± 0,6	20,3 ± 1,7	15,7 ± 1,8
AA1	2,8 ± 0,8	1,7 ± 0,4	3,6 ± 0,4	2,9 ± 0,2	4,6 ± 0,5	3,7 ± 0,3	5,4 ± 0,3	4,6 ± 0,3	11,0 ± 1,4	8,6 ± 0,8
AA2	5,3 ± 0,6	4,4 ± 0,7	6,4 ± 1,1	5,5 ± 0,2	8,1 ± 0,7	6,0 ± 0,5	8,9 ± 0,9	7,1 ± 0,3	21,2 ± 2,4	15,7 ± 1,4
AB1	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,7	3,4 ± 0,5	2,3 ± 0,2	4,7 ± 0,8	3,5 ± 0,6	4,8 ± 0,6	4,1 ± 1,2	14,7 ± 2,9	12,5 ± 1,5
AC1	4,1 ± 0,7	2,4 ± 0,8	5,4 ± 0,2	3,7 ± 0,5	5,0 ± 0,5	3,7 ± 0,8	6,2 ± 0,6	4,6 ± 0,6	11,0 ± 1,4	9,7 ± 1,4
AC2	3,1 ± 0,6	2,0 ± 0,4	5,6 ± 0,7	3,8 ± 0,4	6,8 ± 1,0	4,3 ± 1,0	6,5 ± 0,5	5,7 ± 0,6	19,2 ± 2,0	14,8 ± 0,7
AC3	4,2 ± 0,8	3,1 ± 0,5	5,5 ± 1,4	4,5 ± 0,2	5,8 ± 0,5	3,4 ± 1,1	6,1 ± 0,9	4,5 ± 0,3	14,4 ± 2,1	11,1 ± 0,7
AD1	4,9 ± 0,6	3,7 ± 0,5	5,5 ± 0,5	4,1 ± 1,1	6,5 ± 0,3	5,6 ± 0,5	7,2 ± 0,3	5,9 ± 0,7	15,3 ± 1,0	11,8 ± 2,1
AD2	6,5 ± 0,3	5,1 ± 0,8	7,2 ± 0,8	5,3 ± 1,0	8,0 ± 0,5	6,0 ± 0,6	9,2 ± 0,7	6,9 ± 1,2	21,0 ± 2,3	16,5 ± 2,1
<b>Mínimo</b>	<b>1,7 ± 0,6</b>	<b>1,1 ± 0,3</b>	<b>2,7 ± 0,6</b>	<b>1,6 ± 0,2</b>	<b>2,9 ± 0,5</b>	<b>1,9 ± 0,4</b>	<b>3,6 ± 0,4</b>	<b>2,4 ± 0,1</b>	<b>9,4 ± 1,0</b>	<b>7,2 ± 1,0</b>
<b>Máximo</b>	<b>6,5 ± 0,3</b>	<b>5,1 ± 0,8</b>	<b>7,2 ± 0,8</b>	<b>5,9 ± 1,1</b>	<b>8,1 ± 0,7</b>	<b>6,3 ± 0,9</b>	<b>9,2 ± 0,7</b>	<b>7,1 ± 0,3</b>	<b>28,9 ± 3,6</b>	<b>21,8 ± 1,5</b>

De maneira geral, a amostra O1, que foi coletada em Mato Grosso e classificada como monofloral do gênero *Brassica*, mostrou a maior ação contra todos os micro-organismos testados. Por outro lado, a amostra AD2, um PAD heterofloral com predominância de *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Myrcia* produzido em São Paulo, apresentou a menor capacidade antimicrobiana contra bactérias, enquanto a amostra C1, monofloral de *Brassica* oriunda do Rio Grande do Sul, a menor capacidade contra leveduras. Nota-se que a capacidade antimicrobiana do PAD com predominância do gênero *Brassica* variou entre estes dois Estados, o que pode ter correlação com compostos fenólicos presentes nas amostras.

Arruda (2013) determinou a CIM de extratos metanólicos de PAD contra *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* e *Candida albicans*. O trabalho desta autora foi o único encontrado com amostras provenientes dos mesmos Estados e analisadas, também, por microdiluição em placas, assim, uma comparação dos resultados é apresentada na Tabela 13. Notam-se dados semelhantes, sendo que as diferenças podem ser atribuídas a origem botânica das amostras.

**Tabela 13.** Concentração mínima inibitória (mg/mL) das 56 amostras de pólen apícola desidratado em estudo em comparação com os resultados publicados por Arruda (2013)<sup>1</sup>.

Origem		Bactérias Gram +			Bactérias Gram -			Leveduras		
		Se <sup>1</sup>	Sa ESA54	Sa 25923	Ec <sup>1</sup>	Ec ESA72	Ec 25922	Ca <sup>1</sup>	Ca ESA109	Ca 60193
RS	Máx.	2,50	5,73	4,53	6,53	6,27	4,76	18,83	28,94	20,71
	Mín.	1,30	3,56	2,37	4,00	3,96	2,69	10,23	10,03	8,07
SC	Máx.	2,53	3,17	1,90	6,40	3,56	2,15	18,33	10,28	7,76
	Mín.	1,05	-	-	2,60	-	-	10,40	-	-
SP	Máx.	2,87	7,25	5,88	7,48	8,03	6,04	19,03	21,45	16,53
	Mín.	1,04	2,84	2,41	2,53	4,39	3,21	10,23	10,33	8,45
BA	Máx.	2,50	6,73	5,71	6,50	7,53	6,32	18,67	17,14	14,23
	Mín.	0,98	2,69	2,21	1,89	3,26	2,62	10,54	10,59	7,98
SE	Máx.	2,57	5,01	3,14	7,23	6,00	4,46	18,33	26,22	21,76
	Mín.	1,03	-	-	2,27	-	-	10,63	-	-
RN	Máx.	2,70	5,96	4,59	7,07	6,28	5,38	18,60	19,14	14,56
	Mín.	1,13	5,57	3,52	3,93	6,22	4,14	10,58	18,48	13,76
MT	Máx.	2,67	2,69	1,61	7,00	2,92	1,92	17,67	9,38	7,22
	Mín.	1,24	-	-	4,60	-	-	11,33	-	-

Se: *Staphylococcus epidermidis*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; K: *Klebsiella*; Ca: *Candida albicans*.

RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; BA: Bahia; SE: Sergipe; RN: Rio Grande do Norte; MT: Mato Grosso.

Pascoal *et al.* (2014), que testaram oito extratos metanólicos de PAD na inibição de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *C. glabrata*, constataram que as cepas de *S. aureus* foram as mais sensíveis aos extratos, com valores de CIM entre 1,81 e 4,28 mg/mL. Para os demais micro-organismos, os autores observaram 3,71 a 6,96 mg/mL (*P. aeruginosa*), 4,08 a 9,42 mg/mL (*E. coli*) e 16,00 a 33,92 mg/mL (*C. glabrata*).

Pela análise de correlação de *Pearson*, o teor de fenólicos totais não influenciou positivamente na capacidade antimicrobiana das amostras. Campos *et al.*, (2008), Carpes *et al.* (2008), Morais *et al.* (2011) e Pascoal *et al.* (2014) descreveram que a capacidade antimicrobiana de extratos metanólicos de PAD parece relacionada não ao todo, mas sim a compostos fenólicos específicos.

Considerando os polifenóis identificados por *HPLC-DAD*, houve correlação, embora fraca ou média, entre os compostos naringina, quercetina e ácido ferúlico e a inibição dos micro-organismos. Houve fraca correlação com ácido cinâmico e naringenina apenas na ação contra as leveduras, e do ácido  $\beta$ -resorcílico na ação contra duas cepas Gram negativas (*E. coli* 25922 e *Klebsiella* BAA1705). Com os demais compostos não houve correlação, ou houve correlação positiva de fraca a média. Uma vez que, quanto menor a CIM, maior a capacidade antimicrobiana da amostra; correlações positivas indicam que, quanto maior o teor de composto, maior a CIM e, conseqüentemente, menor a capacidade antimicrobiana. Estes resultados sugerem que compostos diferentes daqueles identificados por *HPLC-DAD* foram os principais responsáveis pela inibição dos micro-organismos.

### 3.1.3 Parâmetros instrumentais de cor

Além de caracterizar as amostras, buscou-se correlacionar os parâmetros instrumentais de cor com as outras variáveis na tentativa de propor um método rápido para sugerir a presença de compostos de interesse, como proteínas, minerais e flavonoides. Houve variação nos valores de  $L^*$  (48,07 a 72,35),  $a^*$  (1,03 a 16,90),  $b^*$  (31,72 a 63,18) e Chroma (31,74 a 64,26). Os parâmetros instrumentais de cor de todas as amostras são apresentados no Apêndice I.

Com relação à composição centesimal, a análise de correlação de *Pearson* indicou correlação média entre  $L^*a^*b^*$  e Chroma e os valores de cinzas e entre  $b^*$  e Chroma e o teor de lipídeos. Com relação aos minerais, houve correlação forte entre

todos os parâmetros de cor e o conteúdo de cálcio e entre o parâmetro L\* e os valores de magnésio e ferro. Uma correlação média foi observada entre todos os parâmetros de cor e o conteúdo de potássio, zinco e manganês. Os valores de L\*a\*b\* e Chroma são, portanto, fortes indicativos da presença de cálcio, magnésio e ferro no PAD, sugerindo, também, o teor de lipídeos, cinzas, potássio, zinco e manganês nas amostras, embora para estes últimos os parâmetros possam ser utilizados para sugerir, mas não para selecionar amostras. Na Tabela 14 é apresentada a correlação entre os valores de L\*a\*b\* e Chroma e a composição centesimal e conteúdo de minerais.

**Tabela 14.** Valores de correlação os parâmetros instrumentais de cor e a composição centesimal e de minerais de 56 amostras de pólen apícola desidratado.

Variáveis	Parâmetros instrumentais de cor			
	L*	a*	b*	Chroma
<b>Carboidratos</b>	-0,2097 p=0,121	0,1947 p=0,150	0,0171 p=0,900	0,0284 p=0,836
<b>Proteínas</b>	0,2617 p=0,051	-0,2480 p=0,065	-0,1182 p=0,385	-0,1273 p=0,350
<b>Lipídeos</b>	-0,1883 p=0,165	0,1947 p=0,151	0,3990 p=0,002	0,3899 p=0,003
<b>Cinzas</b>	0,4960 p=0,000	-0,4843 p=0,000	-0,4815 p=0,000	-0,4876 p=0,000
<b>Cálcio</b>	0,6658 p=0,000	-0,6175 p=0,000	-0,6270 p=0,000	-0,6330 p=0,000
<b>Potássio</b>	0,3508 p=0,008	-0,3969 p=0,002	-0,4806 p=0,000	-0,4798 p=0,000
<b>Magnésio</b>	0,6827 p=0,000	-0,6082 p=0,000	-0,5046 p=0,000	-0,5162 p=0,000
<b>Sódio</b>	0,2977 p=0,026	-0,3347 p=0,012	-0,3085 p=0,021	-0,3140 p=0,018
<b>Zinco</b>	0,5933 p=0,000	-0,5721 p=0,000	-0,3967 p=0,002	-0,4125 p=0,002
<b>Ferro</b>	-0,6636 p=0,000	0,4407 p=0,001	0,2154 p=0,111	0,2317 p=0,086
<b>Manganês</b>	0,5799 p=0,000	-0,4756 p=0,000	-0,4094 p=0,002	-0,4166 p=0,001
<b>Cobre</b>	0,2592 p=0,054	-0,2006 p=0,138	0,0074 p=0,957	-0,0054 p=0,969

Com relação às propriedades biológicas das amostras, houve correlação média positiva entre os parâmetros b\* e Chroma e o teor de fenólicos totais e correlação média negativa entre os valores de L\* e esse mesmo teor. Os valores de b\* indicam tonalidade amarela em todas as amostras, portanto, pode-se sugerir a presença de compostos fenólicos desta cor, não necessariamente flavonoides, visto

que a correlação entre os parâmetros de cor e o teor de flavonoides totais foi fraca. Identificou-se correlação média entre os valores de  $b^*$  e Chroma e a capacidade antioxidante do PAD, de modo que os polifenóis correlacionados com estes parâmetros podem ser, também, alguns dos compostos responsáveis pela capacidade antioxidante das amostras. Os valores destas correlações são apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Valores de correlação os parâmetros instrumentais de cor e o teor de fenólicos totais, DPPH, ORAC, ácido protocatéquico, ácido clorogênico e rutina de 56 amostras de pólen apícola desidratado.

Variáveis	Parâmetros instrumentais de cor			
	L*	a*	b*	Chroma
<b>Teor de fenólicos totais</b>	-0,4297 p=0,001	0,3706 p=0,005	0,4716 p=0,000	0,4681 p=0,000
<b>DPPH</b>	-0,0713 p=0,602	0,0230 p=0,867	0,3358 p=0,011	0,3179 p=0,017
<b>ORAC</b>	-0,2442 p=0,070	0,2394 p=0,076	0,4095 p=0,002	0,4014 p=0,002
<b>Ácido protocatéquico</b>	-0,5043 p=0,000	0,5420 p=0,000	0,3466 p=0,009	0,3662 p=0,006
<b>Ácido clorogênico</b>	0,4317 p=0,001	-0,4161 p=0,001	-0,5096 p=0,000	-0,5080 p=0,000
<b>Ácido vanílico</b>	-0,3535 p=0,008	0,2263 p=0,094	0,0806 p=0,555	0,0915 p=0,502
<b>Naringenina</b>	-0,3869 p=0,003	0,1909 p=0,159	-0,0090 p=0,948	0,0029 p=0,983
<b>Rutina</b>	-0,2780 p=0,038	0,3166 p=0,017	0,2540 p=0,059	0,2616 p=0,051

Entre os ácidos protocatéquico e clorogênico houve correlação média com todos os parâmetros de cor. Ácido vanílico e naringenina estavam correlacionados com os valores de  $L^*$  e rutina com o valor de  $a^*$ , sempre numa correlação média. Por fim, não houve correlação, ou esta foi fraca, entre os parâmetros de cor e a inibição dos micro-organismos.

### 3.1.4 Análise multivariada

Diante da grande variação entre amostras, estas foram agrupadas e analisadas estatisticamente quanto a Região brasileira em que foram coletadas (SE: Sudeste, SU: Sul, NE: Nordeste), a origem botânica (M: monofloral, H: heterofloral) e os tipos polínicos e, ainda, classificadas quanto a alguns parâmetros. As médias dos parâmetros por Regiões e a comparação entre estas são apresentadas no Apêndice

II, enquanto as médias por origem botânica e a comparação entre estes dados são apresentadas no Apêndice III.

Na comparação entre as médias, a Região Sul destacou-se das demais por apresentar maiores teores ( $p < 0,05$ ) de proteínas, lipídeos, fenólicos totais e ácido cinâmico, maiores valores ( $p < 0,05$ ) dos parâmetros  $b^*$  e Chroma e, também, a maior ( $p < 0,05$ ) capacidade antioxidante por ambos os métodos. Uma análise das médias de ácido  $\beta$ -resorcílico (SU: 42,86; SE: 11,88; NE: 5,75 mg/100 g) e campferol (SU: 8,21; NE: 4,39; SE: 1,11 mg/100 g) indica que há uma clara tendência a maiores teores destes compostos nesta Região, embora não tenha se observado diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as médias.

Quanto a Região SE, esta sobressaiu quanto ao maior conteúdo ( $p < 0,05$ ) de manganês. Os teores de ferro (SE: 263,08; SU: 154,79; NE: 85,22 mg/Kg), rutina (SE: 26,40; SU: 8,79; NE: 6,23 mg/100 g) e naringenina (SE: 24,86; SU: 8,69; NE: 2,84 mg/100 g) tendem a ser maiores nesta Região, embora a análise estatística tenha indicado igualdade entre as médias ( $p > 0,05$ ). A Região NE destacou-se quanto ao maior conteúdo ( $p < 0,05$ ) de cálcio, potássio, sódio e ácido clorogênico e quanto aos maiores valores ( $p < 0,05$ ) do parâmetro  $L^*$ .

Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos monofloral e heterofloral, porém a diferença relativa entre as médias indica que há uma tendência das amostras monoflorais terem maiores teores de ferro (M: 226,87; H: 150,50 mg/Kg), ácido  $\beta$ -resorcílico (M: 33,21; H: 9,03 mg/100 g), ácido siríngico (M: 1,07; H: 0,49 mg/100 g), ácido ferúlico (M: 1,14; H: 0,25 mg/100 g), naringenina (M: 17,65; H: 10,44 mg/100 g), quercetina (M: 9,20; H: 6,58 mg/100 g) e campferol (M: 6,80; H: 2,41 mg/100 g) e maior capacidade antioxidante pelo método DPPH (M: 52,45; H: 41,59  $\mu\text{mol ET/g}$ ). Em contrapartida, nota-se que as amostras heteroflorais tendem a ter maiores teores de manganês (H: 100,99; M: 79,12 mg/Kg), ácido clorogênico (H: 1,44; M: 0,74 mg/100 g) e rutina (H: 19,40; M: 8,95 mg/100 g).

Aplicando-se a *PCA* foi possível avaliar o comportamento das amostras e grupos (monofloral  $\times$  heterofloral, regiões brasileiras e tipos polínicos) com base na análise de correlação. Na Tabela 16 são apresentados os fatores de carregamento da *PCA*. Nota-se que três componentes principais explicam 67,98% das variações no conjunto de dados, porém, 53,92% da variabilidade já é explicada em uma projeção bi-dimensional, assim, fez-se uma apresentação gráfica em duas dimensões e a discussão dos componentes principais 1 e 2.

**Tabela 16.** Fatores de carregamento obtidos pela análise de componentes principais.

Variáveis	Componente principal 1*	Componente principal 2*	Componente principal 3*
Cinzas	0,305	<b>0,629</b>	-0,106
Cálcio	0,424	<b>0,697</b>	-0,084
Magnésio	0,256	<b>0,722</b>	-0,080
Zinco	0,416	0,356	<b>-0,488</b>
Cobre	0,050	0,060	<b>-0,520</b>
L*	0,342	<b>0,742</b>	-0,351
a*	-0,311	<b>-0,760</b>	0,397
b*	-0,266	<b>-0,816</b>	0,193
Chroma	-0,272	<b>-0,820</b>	0,210
<i>Streptococcus pyogenes</i> ESA12	<b>-0,866</b>	0,314	-0,024
<i>S. pyogenes</i> 12344	<b>-0,881</b>	0,251	-0,037
<i>Staphylococcus aureus</i> ESA 54	<b>-0,875</b>	0,368	0,016
<i>S. aureus</i> 25923	<b>-0,873</b>	0,337	-0,092
<i>Escherichia coli</i> ESA 72	<b>-0,914</b>	0,313	-0,033
<i>E. coli</i> 25922	<b>-0,863</b>	0,380	-0,005
<i>Klebsiella</i> spp	<b>-0,919</b>	0,305	-0,030
<i>Klebsiella</i> BAA1705	<b>-0,851</b>	0,351	0,002
<i>Candida albicans</i> ESA109	<b>-0,507</b>	0,046	-0,100
DPPH	-0,001	<b>-0,451</b>	<b>-0,628</b>
ORAC	-0,185	<b>-0,624</b>	<b>-0,638</b>
Fenólicos totais	<b>-0,463</b>	<b>-0,507</b>	-0,445
Flavonóides totais	-0,090	-0,333	<b>-0,778</b>
Ácido clorogênico	0,343	<b>0,576</b>	0,057
Rutina	0,001	-0,255	0,323
Quercetina	0,070	-0,229	<b>-0,837</b>
Campferol	-0,148	-0,068	<b>-0,569</b>
Autovalores	7,73	6,29	3,66
Varição total explicada (%)	29,75	53,92	67,98

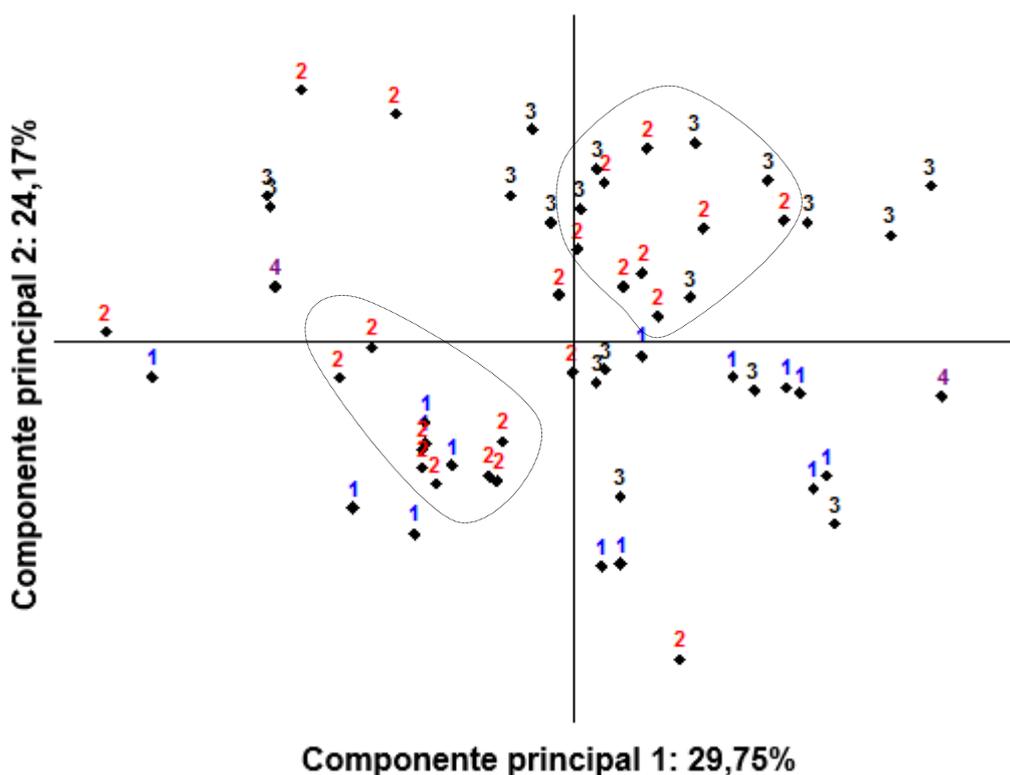
\*Em destaque os valores de correlação acima de 0,45, mínimo estipulado para a análise dos dados.

O componente principal 1 (29,75%) discriminou as amostras quanto as variáveis: teor de fenólicos totais e capacidade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas (*Streptococcus pyogenes* ESA12, *S. pyogenes* 12344, *Staphylococcus aureus* ESA 54, *S. aureus* 25923), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* ESA 72, *E. coli* 25922, *Klebsiella* spp, *Klebsiella* BAA1705) e a levedura *C. albicans* ESA109. No eixo x, quanto mais à esquerda, maior o teor de fenólicos totais e menor a inibição dos micro-organismos (correlação negativa com o componente principal, porém deve-se considerar o conceito de concentração mínima inibitória).

O componente principal 2 (24,17%), representado no eixo y, deslocou para os quadrantes superiores as amostras com maiores valores de cinzas, cálcio,

magnésio, parâmetro  $L^*$  de cor e ácido clorogênico, e para os quadrantes inferiores as amostras com maiores valores de fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH e ORAC),  $a^*$ ,  $b^*$ , Chroma. Nota-se, portanto, que o teor de fenólicos totais está correlacionado tanto no eixo x quanto no eixo y, assim, quanto mais para baixo e para a esquerda, maior o teor de fenólicos totais na amostra.

Nos gráficos abaixo, a proximidade entre amostras no plano bi-dimensional indica comportamento similar quanto aos componentes principais. Na Figura 5 observa-se que todas as amostras da Região Sul encontram-se nos quadrantes inferiores, havendo uma tendência a maiores valores de fenólicos totais e capacidade antioxidante e menores valores de cinzas, cálcio, magnésio, ácido clorogênico e parâmetro  $L^*$  de cor no PAD coletado nesta Região, em relação as demais. As amostras coletadas no Sudeste do país aglomeram-se, principalmente, em dois quadrantes (em destaque na Figura 5): inferior esquerdo, onde nota-se uma concentração de amostras desta Região e da Região Sul que contém o tipo polínico *Brassica* (B) em sua composição; e no quadrante superior direito, onde há uma concentração de amostras, tanto da Região Sudeste quanto da Região Nordeste, com o tipo polínico *Cocos nucifera* (Cn) em sua composição (Figura 6).

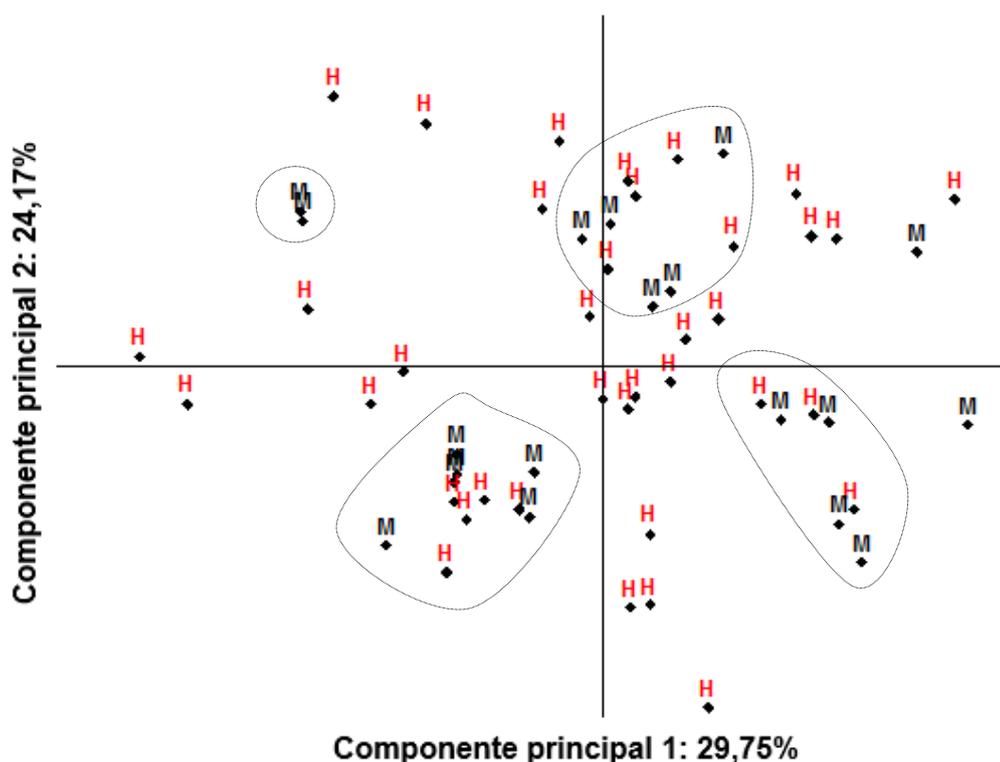


**Figura 5.** Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a Região brasileira de origem.

1: Sul; 2: Sudeste; 3: Nordeste; 4: Centro-Oeste. Em destaque os agrupamentos da Região Sudeste.



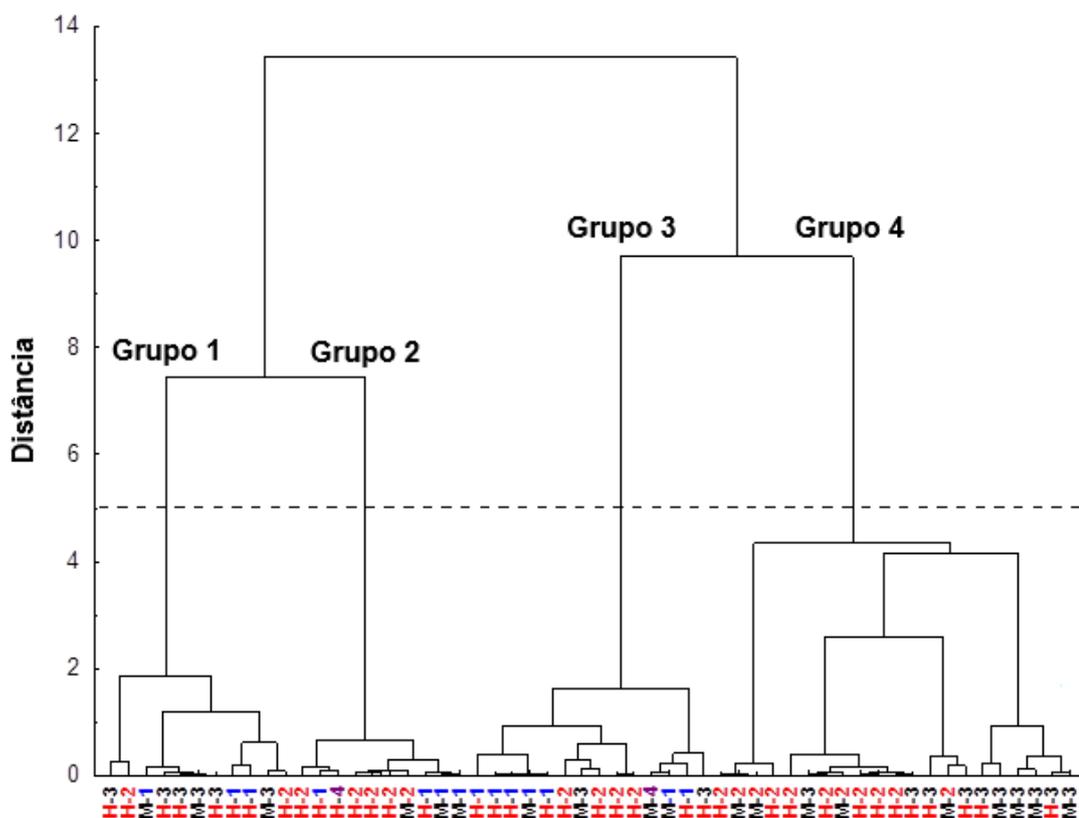
todos os produtos analisados; e da amostra D5 (*Eupatorium* + *Piper*), isolada no quadrante inferior direito em razão de altos valores de capacidade antioxidante (DPPH e ORAC),  $a^*$ ,  $b^*$  e Chroma em conjunto com baixos valores de cinzas, cálcio, magnésio, ácido clorogênico e parâmetro  $L^*$ . De maneira geral, há uma maior dispersão das amostras heteroflorais pelos quadrantes, enquanto as amostras monoflorais agruparam-se (áreas demarcadas na Figura 7), indicando que, embora de origens botânicas diferentes, algumas amostras monoflorais tem características semelhantes com relação aos componentes principais.



**Figura 7.** Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a origem botânica.

M: monofloral; H: heterofloral. Em destaque os grupos de amostras monoflorais.

No geral, com o resultado na *PCA*, foi possível avaliar o comportamento das amostras com base nos componentes principais e identificar características relacionadas a conjuntos de dados. Numa tentativa de classificar os grupos formados com a *PCA*, utilizou-se a análise de agrupamentos hierárquicos (*HCA*) para identificar conjuntos de amostras similares, utilizando como base seis variáveis escolhidas como indicadores do valor nutricional e biológico do PAD: conteúdo de proteínas, ferro, quercetina, fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método ORAC e capacidade antimicrobina contra *S. aureus* ESA 54. Quatro grupos foram formados, como pode ser visto no dendograma apresentado na Figura 8.



**Figura 8.** Classificação das amostras de pólen apícola desidratado utilizando a análise de agrupamento hierárquico com base no teor de proteínas, ferro, quercetina, fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método ORAC e inibição de *S. aureus* ESA54.

H: heterofloral; M: monofloral; 1: Sul; 2: Sudeste; 3: Nordeste; 4: Centro-Oeste.

Uma vez que quatro grupos foram formados, os valores médios de cada variável foram comparados estatisticamente e, ainda, fez-se o levantamento do número de amostras monoflorais e heteroflorais, bem como do número de amostras de cada Região de origem, em cada grupo (Tabela 17).

**Tabela 17.** Comparação entre os grupos classificados de acordo com o teor de proteínas, ferro, quercetina, fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método ORAC e inibição de *S. aureus* ESA54.

Variável	Grupo 1 (n=11)	Grupo 2 (n=10)	Grupo 3 (n=14)	Grupo 4 (n=21)
Proteínas	12,65 <sup>b</sup>	12,07 <sup>b</sup>	22,74 <sup>a</sup>	13,48 <sup>b</sup>
Lipídeos	6,31	7,96	7,38	6,56
Cinzas	2,74 <sup>b</sup>	2,75 <sup>b</sup>	3,11 <sup>a</sup>	2,97 <sup>ab</sup>
Carboidratos	78,31 <sup>a</sup>	77,21 <sup>a</sup>	66,76 <sup>b</sup>	76,99 <sup>a</sup>
Cálcio	2,10 <sup>ab</sup>	1,76 <sup>b</sup>	2,35 <sup>a</sup>	2,36 <sup>a</sup>
Potássio	6,25 <sup>ab</sup>	5,90 <sup>b</sup>	6,95 <sup>a</sup>	6,98 <sup>a</sup>
Magnésio	1,28 <sup>b</sup>	1,50 <sup>ab</sup>	1,76 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>
Sódio	93,83	56,43	53,47	85,57
Zinco	75,46 <sup>a</sup>	56,52 <sup>b</sup>	76,89 <sup>a</sup>	69,18 <sup>a</sup>

(Continua)

Tabela 17. Continuação...

Variável	Grupo 1 (n=11)	Grupo 2 (n=10)	Grupo 3 (n=14)	Grupo 4 (n=21)
Ferro	94,95	205,09	131,79	235,17
Manganês	68,55 <sup>b</sup>	47,77 <sup>b</sup>	117,37 <sup>a</sup>	112,61 <sup>a</sup>
Cobre	14,69	13,54	13,73	13,12
L*	63,80 <sup>ab</sup>	58,94 <sup>b</sup>	65,61 <sup>a</sup>	65,78 <sup>a</sup>
a*	5,83 <sup>ab</sup>	8,05 <sup>a</sup>	4,86 <sup>b</sup>	3,63 <sup>b</sup>
b*	46,83 <sup>ab</sup>	51,54 <sup>a</sup>	43,54 <sup>b</sup>	38,57 <sup>c</sup>
Chroma	47,25 <sup>ab</sup>	52,21 <sup>a</sup>	43,90 <sup>b</sup>	38,82 <sup>c</sup>
Sp <sup>1</sup> ESA12	3,07 <sup>b</sup>	4,70 <sup>a</sup>	2,91 <sup>b</sup>	4,14 <sup>a</sup>
Sp <sup>1</sup> 12344	2,00 <sup>c</sup>	3,51 <sup>a</sup>	1,89 <sup>c</sup>	2,85 <sup>b</sup>
Sa <sup>1</sup> ESA 54	3,60 <sup>b</sup>	5,85 <sup>a</sup>	3,89 <sup>b</sup>	5,36 <sup>a</sup>
Sa <sup>1</sup> 25923	3,13 <sup>b</sup>	4,33 <sup>a</sup>	2,86 <sup>b</sup>	4,06 <sup>a</sup>
Ec <sup>1</sup> ESA 72	4,85 <sup>b</sup>	6,43 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>	5,94 <sup>a</sup>
Ec <sup>1</sup> 25922	3,61 <sup>b</sup>	4,67 <sup>a</sup>	3,19 <sup>b</sup>	4,70 <sup>a</sup>
K <sup>1</sup> spp	5,46 <sup>b</sup>	7,31 <sup>a</sup>	5,08 <sup>b</sup>	6,82 <sup>a</sup>
K <sup>1</sup> BAA1705	4,03 <sup>b</sup>	5,30 <sup>a</sup>	3,86 <sup>b</sup>	5,17 <sup>a</sup>
Ca <sup>1</sup> ESA109	14,33 <sup>bc</sup>	20,62 <sup>a</sup>	11,50 <sup>c</sup>	15,32 <sup>b</sup>
Ca <sup>1</sup> 60193	12,00 <sup>b</sup>	15,72 <sup>a</sup>	9,54 <sup>c</sup>	11,86 <sup>b</sup>
DPPH	69,61 <sup>a</sup>	60,70 <sup>a</sup>	43,59 <sup>ab</sup>	26,30 <sup>b</sup>
ORAC	362,39 <sup>a</sup>	331,14 <sup>a</sup>	243,56 <sup>b</sup>	218,11 <sup>b</sup>
Fenólicos totais	16,53 <sup>a</sup>	19,48 <sup>a</sup>	10,96 <sup>b</sup>	10,63 <sup>b</sup>
Flavonoides totais	6,47 <sup>a</sup>	4,52 <sup>ab</sup>	2,77 <sup>bc</sup>	2,35 <sup>c</sup>
Ácido gálico	0,00	0,00	0,15	0,07
Ácido protocatéquico	0,30	0,55	0,24	0,20
Catequina	1,10	0,25	1,77	1,27
Ácido clorogênico	0,50 <sup>b</sup>	0,00	2,36 <sup>a</sup>	1,37 <sup>ab</sup>
Ácido vanílico	1,17	1,72	0,60	1,62
Ácido caféico	0,00	0,60	0,07	0,00
Epicatequina	0,09	0,24	0,34	0,21
Ácido β-resorcílico	10,29	28,62	34,28	4,09
Ácido siríngico	1,08	0,66	0,00	0,95
Ácido p-cumárico	1,10	2,16	2,89	1,45
Ácido ferúlico	0,67	0,24	1,42	0,06
Ácido sinápico	0,00	0,00	0,00	0,02
Naringina	1,56 <sup>a</sup>	0,20 <sup>b</sup>	1,38 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>
Rutina	27,30	19,76	15,53	8,21
Ácido cinâmico	0,00	1,12 <sup>b</sup>	5,76 <sup>a</sup>	0,56 <sup>b</sup>
Naringenina	11,05	16,73	5,68	29,46
Quercetina	22,89 <sup>a</sup>	0,95 <sup>b</sup>	4,89 <sup>b</sup>	4,21 <sup>b</sup>
Kaempferol	10,58	0,88	1,45	3,48
Classificação botânica				
Monofloral	3B	3B	4B	9A
Hetofloral	8A	7A	10A	12A
Região de origem				
Sul	3 <sup>A</sup>	4 <sup>A</sup>	7 <sup>A</sup>	0
Sudeste	2 <sup>B</sup>	5 <sup>A</sup>	4 <sup>B</sup>	11 <sup>A</sup>
Nordeste	6 <sup>AB</sup>	0	2 <sup>b</sup>	10 <sup>A</sup>
Centro-Oeste	0	1	1	0

<sup>1</sup>Sp: *Streptococcus pyogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; K: *Klebsiella*; Ca: *Candida albicans*.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas (p<0,05) pelo teste de *LSD Fisher*. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas (p<0,05) pelo teste-Z.

Com base na diferença estatística entre as médias, o maior teor de quercetina permitiu classificar o grupo 1; o maior conteúdo de zinco e os menores valores de capacidade antimicrobiana contra os micro-organismos *S. pyogenes* 12344, *C. albicans* ESA109 e *C. albicans* 60193 permitiram discriminar o grupo 2 dos demais. O teor de proteínas, carboidratos e ácido cinâmico e maior inibição da *C. albicans* 60193 possibilitaram classificar o grupo 3; enquanto com os valores intermediários de capacidade antimicrobiana contra *S. pyogenes* 12344 e os com menores valores de  $b^*$  e Chroma foi possível discriminar o grupo 4.

A proporção de amostras monoflorais semelhantes entre si foi maior no grupo 4, ao passo que as amostras heteroflorais estavam proporcionalmente distribuídas por todos os grupos. Considerando-se a Região brasileira onde o PAD foi coletado, nota-se que nenhuma amostra da Região Sul foi classificada no grupo 4, sugerindo que o PAD, se oriundo desta Região, não apresentará as características deste grupo, mas sim, características que podem estar relacionadas aos grupos 1, 2 ou 3. As amostras da Região Sudeste estão distribuídas por todos os grupos, embora 73% delas façam parte dos grupos 2 ou 4, sugerindo uma tendência maior das amostras desta Região de apresentarem características relacionadas a estes dois grupos. Quanto aos produtos oriundos na Região Nordeste, nota-se que nenhum foi classificado no grupo 2 e a maioria das amostras (55%) foram classificadas no grupo 4, de modo que este parece ser o grupo que mais representa as amostras desta Região.

Com os resultados das análises multivariadas, tem-se que, no geral, o teor de fenólicos totais, a capacidade antimicrobiana, a capacidade antioxidante e os parâmetros instrumentais de cor são variáveis que discriminam as amostras, porém, não são suficientes para classificar as amostras de acordo com a origem botânica e a Região brasileira onde ocorreu a coleta, portanto, para tal, outros parâmetros devem ser investigados.

### 3.2 PARTE 2

Entre as amostras monoflorais em estudo, oito eram compostas, basicamente, por um único tipo polínico (Tabela 18), de modo que foram selecionadas para, além das determinações propostas, serem analisadas por *HPLC-*

MS para identificação dos polifenóis presentes em cada produto. Três destas amostras foram classificadas como monoflorais de *Mimosa scabrella*, porém coletadas em diferentes Estados brasileiros, de modo que foram escolhidas, intencionalmente, para investigar se haveria variação no perfil físico-químico e propriedades biológicas de acordo com o Estado onde ocorreu a coleta.

Na Tabela 19 são apresentados os parâmetros instrumentais de cor, na Tabela 20 as variáveis consideradas como indicadores das propriedades biológicas e na Tabela 21 a composição química das oito amostras monoflorais de PAD em estudo.

**Tabela 18.** Percentagem dos tipos polínicos identificados em oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado.

Amostra	Origem	Tipos Polínicos e Frequência
Al	São Paulo	<i>Alternanthera</i> (94,2%)
An	São Paulo	<i>Anadenanthera</i> (95%); <i>Schinus</i> (3,4%)
Cn	Bahia	<i>Cocos nucifera</i> (97,5%)
Mc	Sergipe	<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (96,3%); <i>Cocos nucifera</i> (3,7%)
My	Rio Grande do Sul	<i>Myrcia</i> (99,5%)
Ms (SC)	Santa Catarina	<i>Mimosa scabrella</i> (95,5%)
Ms (RN)	Rio Grande do Norte	<i>Mimosa scabrella</i> (98,7%)
Ms (MT)	Mato Grosso	<i>Mimosa scabrella</i> (100%)

**Tabela 19.** Parâmetros instrumentais de cor (L\*, a\*, b\* e Chroma) de oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado.

Parâmetro <sup>1</sup>	Tipo polínico <sup>2</sup>							
	Al	An	Cn	Mc	My	Ms (SC)	Ms (RN)	Ms (MT)
L*	51,58 <sup>h</sup>	66,81 <sup>c</sup>	71,69 <sup>a</sup>	67,99 <sup>b</sup>	62,68 <sup>e</sup>	59,79 <sup>f</sup>	65,01 <sup>d</sup>	58,59 <sup>g</sup>
a*	9,05 <sup>b</sup>	2,80 <sup>f</sup>	1,14 <sup>g</sup>	4,07 <sup>d</sup>	5,86 <sup>c</sup>	9,11 <sup>b</sup>	3,71 <sup>e</sup>	10,03 <sup>a</sup>
b*	48,79 <sup>b</sup>	41,17 <sup>c</sup>	31,51 <sup>g</sup>	35,37 <sup>f</sup>	48,26 <sup>b</sup>	54,49 <sup>a</sup>	36,93 <sup>e</sup>	39,05 <sup>d</sup>
Chroma	49,62 <sup>b</sup>	41,27 <sup>c</sup>	31,53 <sup>g</sup>	35,61 <sup>f</sup>	48,62 <sup>b</sup>	55,25 <sup>a</sup>	37,12 <sup>e</sup>	40,32 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>L\*: 0 (preto) a 100 (branco), a\*: - (verde) a + (vermelho); b\*: - (azul) a + (amarelo); C: Chroma (intensidade da cor)

<sup>2</sup>Al: *Alternanthera*; An: *Anadenanthera*; Cn: *Cocos nucifera*; M: *Myrcia*; Mc: *Mimosa caesalpiniaefolia*; Ms: *Mimosa scabrella*.

Letras diferentes na mesma linha dos resultados representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *LSD Fisher*.

**Tabela 20.** Indicadores de bioatividade de oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado.

Parâmetro	Tipo polínico <sup>1</sup>							
	Al	An	Cn	Mc	My	Ms (SC)	Ms (RN)	Ms (MT)
<b>Fenólicos totais</b> (mg/g)	16,07 <sup>b</sup>	11,16 <sup>e</sup>	5,56 <sup>g</sup>	12,67 <sup>c</sup>	29,74 <sup>a</sup>	11,26 <sup>d,e</sup>	7,38 <sup>f</sup>	12,55 <sup>c,d</sup>
<b>Flavonoides totais</b> (mg/g)	1,32 <sup>c</sup>	1,04 <sup>d</sup>	1,15 <sup>d</sup>	1,26 <sup>c,d</sup>	18,96 <sup>a</sup>	1,55 <sup>c</sup>	4,13 <sup>b</sup>	0,31 <sup>e</sup>
<b>Capacidade antioxidante (DPPH)</b> ( $\mu$ mol ET/g)	26,81 <sup>d</sup>	15,55 <sup>e</sup>	9,97 <sup>f</sup>	25,61 <sup>d</sup>	110,85 <sup>a</sup>	71,57 <sup>b</sup>	31,60 <sup>c</sup>	15,95 <sup>e</sup>
<b>Capacidade antioxidante (ORAC)</b> ( $\mu$ mol ET/g)	299,6 <sup>b</sup>	178,3 <sup>d</sup>	156,9 <sup>d,e</sup>	224,1 <sup>c</sup>	542,0 <sup>a</sup>	313,3 <sup>b</sup>	232,9 <sup>c</sup>	133,7 <sup>e</sup>
<b>CIM – Sp ESA12</b> (mg/mL)	4,58 <sup>b,c</sup>	5,19 <sup>a,b</sup>	5,29 <sup>a,b</sup>	4,25 <sup>b,c</sup>	4,69 <sup>a,b</sup>	1,40 <sup>e</sup>	2,83 <sup>d</sup>	3,96 <sup>c</sup>
<b>CIM – Sp 12344</b> (mg/mL)	2,56 <sup>b,c</sup>	3,93 <sup>a</sup>	4,28 <sup>a</sup>	2,40 <sup>b,c</sup>	3,03 <sup>a,b</sup>	1,09 <sup>d</sup>	2,26 <sup>c</sup>	3,08 <sup>a,b</sup>
<b>CIM – Sa ESA54</b> (mg/mL)	4,98 <sup>c,d</sup>	6,44 <sup>a,b</sup>	6,81 <sup>a</sup>	5,26 <sup>b,c,d</sup>	5,61 <sup>b,c</sup>	2,25 <sup>e</sup>	5,59 <sup>b,c,d</sup>	4,80 <sup>d</sup>
<b>CIM – Sa 25923</b> (mg/mL)	3,49 <sup>c</sup>	5,03 <sup>a,b</sup>	5,66 <sup>a</sup>	3,33 <sup>c</sup>	4,27 <sup>a,b,c</sup>	1,63 <sup>d</sup>	4,17 <sup>a,b,c</sup>	3,56 <sup>b,c</sup>
<b>CIM – Ec ESA72</b> (mg/mL)	5,43 <sup>b,c</sup>	6,84 <sup>a,b</sup>	8,40 <sup>a</sup>	5,41 <sup>b,c</sup>	6,62 <sup>b,c</sup>	2,87 <sup>d</sup>	6,71 <sup>b,c</sup>	5,26 <sup>c</sup>
<b>CIM – Ec 25922</b> (mg/mL)	3,96 <sup>b</sup>	5,58 <sup>a</sup>	5,66 <sup>a</sup>	3,87 <sup>b,c</sup>	5,20 <sup>a,b</sup>	2,25 <sup>c</sup>	4,96 <sup>a,b</sup>	4,33 <sup>a,b</sup>
<b>CIM – K spp</b> (mg/mL)	6,52 <sup>b</sup>	7,31 <sup>b</sup>	9,35 <sup>a</sup>	6,26 <sup>b</sup>	7,21 <sup>b</sup>	3,96 <sup>c</sup>	6,87 <sup>b</sup>	6,10 <sup>b</sup>
<b>CIM – K BAA1705</b> (mg/mL)	4,13 <sup>d,e</sup>	6,13 <sup>a,b</sup>	7,37 <sup>a</sup>	4,64 <sup>c,d</sup>	5,82 <sup>b,c</sup>	2,87 <sup>e</sup>	6,00 <sup>a,b,c</sup>	4,95 <sup>b,c</sup>
<b>CIM – Ca ESA109</b> (mg/mL)	12,6 <sup>d</sup>	18,9 <sup>b</sup>	22,2 <sup>b</sup>	28,1 <sup>a</sup>	13,3 <sup>c,d</sup>	9,3 <sup>d</sup>	18,3 <sup>b,c</sup>	12,8 <sup>d</sup>
<b>CIM – Ca 60193</b> (mg/mL)	9,0 <sup>e</sup>	13,4 <sup>b,c,d</sup>	16,2 <sup>b</sup>	20,6 <sup>a</sup>	11,5 <sup>c,d,e</sup>	8,2 <sup>e</sup>	13,7 <sup>b,c</sup>	10,1 <sup>d,e</sup>

Al: *Alternanthera*; An: *Anadenanthera*; Cn: *Cocos nucifera*; M: *Myrcia*; Mc: *Mimosa caesalpiniaefolia*; Ms: *Mimosa scabrella*.

CIM: concentração inibitória mínima. Sp: *Streptococcus pyogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; K: *Klebsiella*; Ca: *Candida albicans*.

Letras diferentes na mesma linha dos resultados representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *LSD Fisher*.

**Tabela 21.** Composição química de oito amostras monoflorais de pólen apícola desidratado.

Parâmetro	Tipo polínico <sup>1</sup>							
	Al	An	Cn	Mc	My	Ms (SC)	Ms (RN)	Ms (MT)
<b>Proteínas</b> (g/100 g)	10,63 <sup>g</sup>	15,99 <sup>d</sup>	11,83 <sup>f</sup>	17,56 <sup>c</sup>	22,24 <sup>b</sup>	14,42 <sup>e</sup>	11,69 <sup>f</sup>	33,9 <sup>a</sup>
<b>Lipídeos</b> (g/100 g)	6,33 <sup>c</sup>	3,18 <sup>e</sup>	8,34 <sup>a</sup>	4,92 <sup>d</sup>	7,79 <sup>a,b</sup>	7,02 <sup>b,c</sup>	6,84 <sup>b,c</sup>	5,10 <sup>d</sup>
<b>Cinzas</b> (g/100 g)	3,09 <sup>d</sup>	3,02 <sup>d,e</sup>	3,54 <sup>b</sup>	3,77 <sup>a</sup>	2,65 <sup>f</sup>	2,82 <sup>e</sup>	3,22 <sup>c,d</sup>	3,36 <sup>b,c</sup>
<b>Carb.*</b> (g/100 g)	79,95 <sup>a</sup>	77,80 <sup>b</sup>	76,29 <sup>c</sup>	73,74 <sup>d</sup>	67,32 <sup>e</sup>	75,75 <sup>c</sup>	78,24 <sup>b</sup>	57,65 <sup>f</sup>
<b>Cálcio</b> (g/kg)	0,89 <sup>e</sup>	0,85 <sup>e</sup>	3,86 <sup>a</sup>	3,16 <sup>b</sup>	1,05 <sup>e</sup>	1,75 <sup>c</sup>	1,45 <sup>d</sup>	1,40 <sup>d</sup>
<b>Potássio</b> (g/kg)	8,77 <sup>b</sup>	7,46 <sup>c</sup>	7,43 <sup>c</sup>	9,12 <sup>a</sup>	5,71 <sup>e</sup>	6,58 <sup>d</sup>	9,07 <sup>a</sup>	7,57 <sup>c</sup>
<b>Magnésio</b> (g/kg)	0,86 <sup>e</sup>	1,52 <sup>c,d</sup>	2,31 <sup>a</sup>	1,62 <sup>b,c</sup>	1,32 <sup>d</sup>	1,32 <sup>d</sup>	0,92 <sup>e</sup>	1,79 <sup>b</sup>
<b>Sódio</b> (mg/kg)	41,37 <sup>e</sup>	40,80 <sup>e</sup>	52,27 <sup>d</sup>	148,53 <sup>c</sup>	43,87 <sup>e</sup>	38,00 <sup>e</sup>	98,12 <sup>c</sup>	279,32 <sup>a</sup>
<b>Zinco</b> (mg/kg)	50,82 <sup>d</sup>	99,00 <sup>a</sup>	72,57 <sup>c</sup>	88,72 <sup>b</sup>	67,59 <sup>c</sup>	72,57 <sup>c</sup>	65,62 <sup>c</sup>	72,49 <sup>c</sup>
<b>Ferro</b> (mg/kg)	1017,5 <sup>a</sup>	466,34 <sup>b</sup>	109,03 <sup>e</sup>	79,38 <sup>g</sup>	142,2 <sup>d</sup>	187,69 <sup>c</sup>	94,55 <sup>f</sup>	78,95 <sup>g</sup>
<b>Manganês</b> (mg/kg)	50,82 <sup>e</sup>	89,10 <sup>c</sup>	94,66 <sup>c</sup>	69,32 <sup>d</sup>	43,55 <sup>e</sup>	112,26 <sup>b</sup>	86,44 <sup>c</sup>	314,03 <sup>a</sup>
<b>Cobre</b> (mg/kg)	10,02 <sup>e</sup>	11,31 <sup>b,c,d</sup>	11,57 <sup>b,c</sup>	10,8 <sup>b,c,d,e</sup>	17,07 <sup>a</sup>	11,80 <sup>b</sup>	10,23 <sup>c,d,e</sup>	11,48 <sup>b,c</sup>

<sup>1</sup>Al: *Alternanthera*; An: *Anadenanthera*; Cn: *Cocos nucifera*; M: *Myrcia*; Mc: *Mimosa caesalpiniaefolia*; Ms: *Mimosa scabrella*.

\*Carb.: carboidratos

Letras diferentes na mesma linha dos resultados representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *LSD Fisher*.

No PAD de *Alternanthera* observaram-se os maiores valores de carboidratos totais e ferro ( $p < 0,05$ ) e o menor valor de zinco ( $p < 0,05$ ). O conteúdo de ferro, nesta amostra (1017,5 mg/kg) foi duas vezes maior que o constatado no PAD com o segundo maior teor (*Anadenanthera*: 466,34 mg/kg) e doze vezes maior que o observado no PAD com o menor conteúdo deste mineral entre as amostras (*Mimosa scabrella* coletado em Mato Grosso: 78,95 mg/kg). Apenas as duas amostras com o menor conteúdo de ferro (*Mimosa scabrella* de Mato Grosso e *Myrcia*) não puderam ser consideradas “fonte” deste mineral, todas as outras forneceram, pelo menos, 15% da IDR para adultos (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012).

No PAD de *Anadenanthera* foi constatado o maior conteúdo de zinco ( $p < 0,05$ ) e o menor teor de lipídeos ( $p < 0,05$ ). Na amostra composta pela espécie

*Cocos nucifera* foram observados os maiores valores de cálcio, magnésio e L\* ( $p < 0,05$ ); os menores valores de fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método DPPH, a\*, b\* e Chroma ( $p < 0,05$ ); e um dos menores valores de capacidade antimicrobiana contra bactérias. Essa amostra reflete a tendência observada pela análise multivariada - PCA, discutida no item anterior, de que o PAD com este tipo polínico tem valores elevados de cálcio, magnésio e parâmetro L\* e também baixos valores de fenólicos totais, capacidade antioxidante e demais parâmetros instrumentais de cor.

No PAD de *Mimosa caesalpiniaefolia* foi observado o maior teor de cinzas ( $p < 0,05$ ) e, ainda, a menor capacidade antimicrobiana contra leveduras ( $p < 0,05$ ). A amostra monofloral do gênero *Myrcia* foi a que apresentou os maiores valores de fenólicos totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante ( $p < 0,05$ ), além de ser uma das amostras com maior capacidade antimicrobiana contra leveduras, de modo que este produto pode ser considerado o de maior potencial biológico entre os oito analisados. Além disso, esta amostra diferenciou das demais quanto ao menor conteúdo de cinzas, cálcio e manganês ( $p < 0,05$ ) e maior conteúdo de cobre ( $p < 0,05$ ).

Entre as amostras monoflorais de *Mimosa scabrella*, o valor nutricional e biológico variou entre as regiões de coleta. A principal variação foi observada no teor de flavonoides totais que, na amostra coletada em Mato Grosso, foi treze vezes maior que o observado na amostra coletada em Santa Catarina, respectivamente 0,31 e 1,55 mg EQ/g. Com estes resultados, pode-se dizer que não é possível estabelecer um perfil físico-químico que seja característico do PAD monofloral deste tipo polínico, possivelmente porque a composição do pólen das plantas desta espécie é inconstante.

Souza (2014), em amostras monoflorais de *Mimosa scabrella*, observou conteúdo médio de proteínas de 23,69 g/100 g, lipídeos de 5,45 g/100 g e cinzas 2,29 g/100 g. Arruda (2013) analisou um PAD desta mesma espécie e observou conteúdo de proteínas de 18,54 g/100 g, lipídeos de 5,83 g/100 g e cinzas de 2,97 g/100 g. As autoras analisaram amostras coletadas, respectivamente, no Rio Grande do Sul e na Bahia, o que explicaria as diferenças observadas em relação ao presente estudo. LeBlanc *et al.* (2009) analisaram PAD do gênero *Mimosa* coletado em Tucson/USA e observaram teor de fenólicos totais de 34,85 mg EAG/g, valor superior ao máximo de 12,55 mg EAG/g constatado neste trabalho.

### 3.2.1 Identificação dos compostos por espectrometria de massas

Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram identificados por *HPLC-MS* por comparação dos espectros com os padrões e com base na literatura consultada. Na Tabela 22 são apresentados os dados gerados pela análise dos padrões.

**Tabela 22.** Tempo de retenção ( $t_R$ ) e principais fragmentos dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides analisados.

Composto	$t_R$ (min)	$M_w$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)*	MS <sup>2</sup> (m/z)*	MS <sup>3</sup> (m/z)*
Ácido gálico	6,9	170	169	125	125, 97, 81
Ácido protocatéquico	11,6	154	153	109	109
Catequina	16,2	290	289	245, 205, 179	227, 203, 187, 161
Ácido clorogênico	19,2	354	353	191	173, 127, 111, 93, 85
Ácido vanílico	20,6	168	167	153,123	108
Ácido caféico	22,4	180	179	135	135
Epicatequina	22,9	290	289		
Ácido $\beta$ -resorcílico	23,2	154	153	109	109, 65
Ácido siríngico	23,7	198	197	182,166	153
Ácido <i>p</i> -cumárico	30,3	164	163	119	119
Ácido ferúlico	32,1	194	193	178, 149, 134	134
Ácido sinápico	32,7	224	223	208, 179, 164	193, 164, 149
Naringina	40,1	580	579	459, 313, 271, 235	441, 357, 339, 271, 235
Rutina	43,5	610	609	301	273, 179, 151
Ácido cinâmico	48,3	148	147		
Naringenina	52,6	272	271	177, 151	107
Quercetina	53,6	302	301	273, 179, 151	151
Kaempferol	58,8	286	285	229, 151	185

\*relação massa/carga.

A análise por espectrometria de massas de extratos de vegetais indica a presença de uma grande variedade de substâncias bioativas (BENAVIDES *et al.*, 2006; CHISTÉ *et al.*, 2011; KAJDZANOSKA *et al.*, 2010; LV *et al.*, 2015). Os flavonoides são encontrados, frequentemente, sob a forma de *O*- ou *C*-glicosídeos, com unidades de açúcar ligadas diretamente ao grupo hidroxila ou a um dos átomos de carbono da aglicona (XIAO; CHEN; CAO, 2014; LV *et al.*, 2015). Flavonoides como a quercetina-3-*O*- $\beta$ -D-glicosil-(2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -glicosídeo, o campferol-3,4'-di-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo e o campferol 3-*O*- $\beta$ -D-glicosil-(2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glicosídeo já foram identificados em amostras monoflorais de PAD (ZHOU *et al.*, 2015). Na Tabela 23 são apresentados os dados gerados a partir da análise de oito amostras monoflorais de PAD, bem como a identidade proposta para os polifenóis.

**Tabela 23.** Tempo de retenção ( $t_R$ ), comprimento de onda de máxima absorção e principais fragmentos dos polifenóis detectados no extrato etanólico do pólen apícola desidratado, propostas de identificação e referências utilizadas.

Amostra: <i>Alternanthera</i>							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	6,6	265	326	236, 278, 164	164	NI	
2	7,6	234, 264, 278	199	125, 153, 171	79	NI	
3	11,1	234, 265, 275	117	71		NI	
4	15,8	278	289	245, 205, 179	227, 203, 186, 161	catequina	padrão
5	20,9	289	436	316	273	4-metil-sulfonil-butyl glicosinolato (glucorafanina)	Phenol-Explorer, 2015
6	21,6	286	342	222, 164	147, 74, 164	pinobanksina-3-O-butirato ( <b>ou</b> isômero)	Keckes <i>et al.</i> (2013)
7	21,7	278	131	85	69	NI	
8	22,6	279	197	182,166	153	ácido siríngico	padrão
9	23,8	289	436	316	119, 273	4-metil-sulfonil-butyl glicosinolato (glucorafanina)	Phenol-Explorer, 2015
10	30,6	308	163	119	93	ácido <i>p</i> -cumárico	padrão
11	34,9	275, 298, 307	639	519, 399, 315	399	isoramnetina-3-O-diglicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011), Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
12	38,1	264, 351	595	301	255	quercetina-3-O-glicosil-6-O-pentosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
13	38,9	265, 330, 347	609	429, 285	339, 309, 297	quercetina-3-O-rutinosídeo	Keckes <i>et al.</i> (2013)
14	40,4	265, 348	755	593, 285	285	campferol-3-O-glicosil-rutinosídeo	Bresciani <i>et al.</i> (2015)
15	40,9	301, 255, 354	623	459, 314, 299	299	isoramnetina-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
16	43,3	264, 300, 350	579	429, 284, 255	255	NI	
17	43,7	254, 352	609	301	151	rutina	padrão
18	45,1	271, 289, 356	723	678	659 338, 225	1-sinapoil-2-feruloil gentiobiose	Phenol-Explorer, 2015
19	49,3	307	478	358	315, 145, 119	petunidina-3-O-galactosídeo	Phenol-Explorer, 2015
20	50,2	321	630	494, 468	332, 296	NI	
21	51,6	292	950	904	886, 678, 565, 451	NI	
22	52,2	289	582	462, 342	342	tri- <i>p</i> -cumaril-espermidina (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
23	53,3	265,299,326,337	489	285	267, 257, 229, 213	luteolina-7-O-6"-acetil-glicosídeo	Lin <i>et al.</i> (2010)
24	53,8	371	301	179, 151	151	quercetina	padrão
25	54,1	310	785	665, 545	545, 291	NI	
26	56,7	292, 308	582	462, 342	342	tri- <i>p</i> -cumaril-espermidina ( <b>ou</b> isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Anadenanthera</i>							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	7,0	261	323	211, 280	97, 77, 193, 139	NI	
2	16,2	283	289	245, 205	203, 227, 187	catequina	padrão
3	20,5		167	153,123	108	ácido vanílico	padrão
4	22,1	290	319	193	165	ampeloptina	Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015)
5	23,0	280	153	109	109, 65	ácido $\beta$ -resorcílico	padrão
6	23,6	271, 280	440	253, 272, 422	179, 210, 171	NI	
8	27,8	286, 330	602	512, 440	422, 272, 254	NI	
9	32,6	288	303	285	241, 199, 175	NI	
10	32,2	316	193	149, 178, 134	134	ácido ferúlico	padrão
11	34,5	256, 354	625	445, 301	265	quercetina diglicosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
12	35,2	255, 354	433	271	179, 151	quercetina-3-O-arabinosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
13	35,7	271	639	315, 299	476	isoramnetina-3-O-diglicosídeo ou patuletina-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011), Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
14	37,0	351	609	300, 271	271, 255	quercetina rutinosídeo (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
15	37,5	255, 301, 354	623	459, 314, 299	299	isoramnetina-3-O- ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
16	38,9	266, 347	609	429, 285	151	quercetina-3-O-rutinosídeo	Keckes <i>et al.</i> (2013)
17	40,3	291, 269, 328	287	269	125	eriodictiol	Keckes <i>et al.</i> (2013)
18	40,9	265, 351	623	459, 314, 299	299	isoramnetina-3-O- ramnosil-glicosídeo (isômero)	Negri <i>et al.</i> (2011)
19	43,7	254, 352	609	301	151	rutina	padrão
20	45,2	271	723	678	659, 338, 225	1-sinapoil-2-feruloil gentiobiose	Phenol-Explorer, 2015
21	47,2	328, 377, 389	433	271	151	naringenina hexosídeo	Bystrom <i>et al.</i> (2008)
22	48,4	251	147			ácido cinâmico	padrão
23	49,1	268, 292, 315	837	791	773, 564, 451	NI	
24	49,6	289	582	462	342	tri- <i>p</i> -cumaryl-espermidina	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
25	50,2	297, 320	630	494, 468	332	NI	
26	51,6	265,393	301	255, 229	211, 185	ácido elágico	
27	52,9	290	271	151, 177	107	naringenina	padrão
28	53,8	371	301	179, 151	151	quercetina	padrão

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Anadenanthera</i> (continuação)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
29	56,6	266, 284, 294	582	462, 342	342	tri- <i>p</i> -cumaril-espermidina (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
30	57,3	297, 309	672	536, 522	479, 372	N', N'', N'''-tris- <i>p</i> -feruloil-espermidina	Negri <i>et al.</i> (2011)
31	60,6	294, 308	785	665, 545	545	NI	
32	62,3	290	596	476	433	NI	
Amostra: <i>Cocos nucifera</i>							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	11,8	264, 353	606	403, 273, 323	272,97	NI	
2	19,3	323	353	191	172, 85, 93	ácido clorogênico	padrão
3	32,1		193	149, 178, 134	133	ácido ferúlico	padrão
4	32,9		223	208, 179, 164	164, 150	ácido sinápico	padrão
5	36,4	259, 354	609	477, 315	300	isoramnetina rutinosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
6	39,6	255, 354	623	314, 459, 299	299	isoramnetina-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
7	43,5	235, 289, 353	187	125	97	NI	
8	43,7	254, 352	609	301	151	rutina	padrão
9	45,3	271, 356	723	678, 577	660, 225, 338, 451	1-sinapoil-2-feruloil gentiobiose	Phenol-Explorer, 2015
10	47,3	254, 355	709	665	501, 314, 299, 623	NI	
11	49,2	292, 316	837	791	773, 565, 452, 338	NI	
12	51,7	294, 320	950	904	886, 565, 451, 678	NI	
13	53,8	371	301	179, 151	150,88	quercetina	padrão
14	54,4	299, 310	623	315, 300	300	isoramnetina-3-O-ramnosil-glicosídeo (isômero)	Negri <i>et al.</i> (2011)
15	56,6	295	582	462, 342	342	N',N'',N'''-tris- <i>p</i> -cumaroil espermidina	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
16	57,1	296, 330	672	522, 536	479, 372	N',N'',N'''-tris- <i>p</i> -feruloil-espermidina	Negri <i>et al.</i> (2011)
17	61,1	280	327	309, 291, 229, 211, 171	211, 209	pinobanksina-5-metil-éter-3-O-acetato	Falcão <i>et al.</i> (2013)
18	61,9	282	695	677,651,569, 551	551, 525	NI	

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Cocos nucifera</i> (continuação)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
19	62,5	282	785	623	615, 295	isoramnetina-3-O-rutinosídeo-7-O-glicosídeo	Truchado <i>et al.</i> (2009)
20	63,4	283	607	589, 481, 463, 437	463, 437	NI	
21	63,9	280	329	311, 229	211, 209	quercetina bi-metilada	Keckes <i>et al.</i> (2013)
22	64,7	282	529	511, 297, 271	251, 185	NI	
Amostra: <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	15,8	278	289	245, 205, 179	227,203,187,161	catequina	padrão
2	18,8	326	353	191	93, 85	ácido clorogênico	padrão
3	22,0	323	179	135	107	ácido caféico	padrão
4	22,6	279	197	182,166	153	ácido siríngico	padrão
5	28,2	298, 309	436	316	273, 145	4-metil-sulfonil-butiril glicosinolato (glucorafanina)	Phenol-Explorer, 2015
6	29,7	265, 347	593	285	155	campferol-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
7	32,6	270, 344	639	476, 313	341, 298	isoramnetina-3-O-diglicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011), Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
8	36,5	267, 330, 346	785	639, 623, 605	315	isoramnetina-3-O-rutinosídeo-7-O-glicosídeo	Truchado <i>et al.</i> (2009)
9	39,1	255, 301, 354	623	459, 314, 299	299	isoramnetina-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
10	43,3	254, 352	609	301	151	rutina	padrão
11	44,3	265, 366	447	285	151	campferol-3-O-glicosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
12	45,3	271, 289, 356	723	678	660, 451, 338, 225	1-sinapoil-2-feruloil gentiobiose	Phenol-Explorer, 2015
13	47,4	253, 355	709	665	314	NI	
14	49,3	308	477	357	314	isoramnetina-3-O-glicosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
15	50,5	305, 320, 398	762	596,582,556, 402	567, 539, 402, 387	NI	
16	51,4		949	904	885, 677, 564, 451	NI	
17	53,9	371	301	179, 151	151	quercetina	padrão
18	56,1	315, 337	762	596,582,556, 402	402, 387, 376, 205	NI	

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (continuação)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
19	58,2	319	489	442, 309	185	campferol-3-O-acetil-glicosídeo	Kajdzoska <i>et al.</i> (2010)
20	59,2	265, 364	285	229, 151	185	campferol	padrão
21	59,9	236, 319	315	300	271, 255, 151	quercetina-3-metil éter	Keckes <i>et al.</i> (2013)
22	61,2	289	327	239	183, 155, 125	pinobanksina-5-metil-éter-3-O-acetato	Falcão <i>et al.</i> (2013)
23	64,0	285	329	311, 293	211, 209, 155, 130	quercetina bi-metilada	Keckes <i>et al.</i> (2013)
24	66,2	284, 373	605	587, 461, 443	425, 399, 381	NI	
25	70,3	314	505	487, 469, 443	469, 443, 425, 373	isoramnetina-3-O-metil-hexurOnide	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
26	73,3	312	449	417	373, 163, 145	diidroquercetina-3-O-ramnosídeo	Phenol-Explorer, 2015
Amostra: <i>Myrcia</i>							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	20,5	260	167	153,123	108	ácido vanílico	padrão
2	20,6	296	389	345,209,165,121	183,165,143,121	NI	
3	29,8	297	403	371, 223, 179	165, 121	NI	
4	30,6	308	163	119	119	ácido <i>p</i> -cumárico	padrão
5	32,8	320	223	208, 179, 164	164, 149	ácido sinápico	padrão
6	34,6	265, 294	625	463, 445, 300, 505	271, 255	quercetina diglicosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
7	37,1	266, 294	609	300, 271	271, 255	quercetina rutinosídeo (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
8	37,5	290	303	151	107	NI	
9	38,1	266, 297, 307	595	449	287	cianidina-3-rutinosídeo	Koolen <i>et al.</i> (2013)
10	38,8	255	610	564	547, 225	NI	
11	39,5	270, 297	639	519	476	isoramnetina-3-O-diglicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011), Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
12	41,2	256, 350, 400	463	316	287, 271	miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo	Saldanha <i>et al.</i> (2013)
13	41,9	284, 327	403	271	151	pinobanksina-3-O-fenilpropionato	Falcão <i>et al.</i> (2013)

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Myrcia</i> (continuação)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
14	43,3	265, 347	579	429, 327	255	orientina-2''-O-xyloside	Sakalem <i>et al.</i> (2012)
15	43,7	254, 352	609	301	151	rutina	padrão
16	45,2	270	723	678	660, 451, 338, 225	1-sinapoil-2-feruloil gentiobiose	Phenol-Explorer, 2015
17	46,1	327	641	479	317	miricetina-3,7-di-O-glicosídeo	Truchado <i>et al.</i> (2009)
18	47,8	264, 306, 326, 390, 399	317	179, 151	151	miricetina	Bresciani <i>et al.</i> (2015)
19	48,2	253, 344	447	301, 285	283, 179, 151	campferol-3-O-glicosídeo	
20	49,1	273, 294	837	791	772,565,451,338	NI	
21	50,6	252, 271, 315, 377, 387	625	477, 315	151	isoramnetina rutinosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
22	51,5	265, 345	301	255, 229	211, 185	ácido elágico	
23	52,7	271, 319	609	463, 301	301	quercetina rutinosídeo (isômero)	
24	52,3	265, 324	489	285	267, 257, 229, 213	luteolina-7-O-6''-acetil-glicosídeo	Lin <i>et al.</i> (2010)
25	53,8	371	301	179, 151	151	quercetina	padrão
26	54,9	327	639	315, 301	300	isoramnetina-3-O-diglicosídeo (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
27	56,5	299, 308	593	447, 285	241, 217, 199, 175	campferol-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
28	57,4	254, 360	623	323, 299, 285	241, 217, 199, 175	isoramnetina-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
29	58,5	266, 314	593	285	241, 217, 175, 151	campferol-3-O-rutinosídeo	Bresciani <i>et al.</i> (2015)
30	59,7	271, 313	609	301	151	quercetina rutinosídeo (isômero)	
31	60,3	267, 320, 347	269	225,201,149,151	197, 181, 169	apigenina	Brito <i>et al.</i> (2014)
32	60,7	299, 309	785	665, 545	545	NI	
33	61,3	238, 272, 314	593	285	241, 217, 199, 175	campferol rutinosídeo (isômero)	Truchado <i>et al.</i> (2009)
34	61,7	289	615	597, 251, 277	231,223,209,125,169	NI	
35	62,6	252, 326, 364	583	301	179, 151	NI	
36	63,5	265, 330, 339	567	285	241, 217, 199, 175	NI	
37	64,2	284	573	555, 297, 271	251	NI	
38	64,9	276	529	511, 297, 271	251	NI	
39	68,2	270	773	755, 737, 685	737, 667, 641	NI	
40	69,3	266	595	463, 445	301	tricotina-7-O-(pentosídeo-glicosídeo)	Truchado <i>et al.</i> (2009)

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Mimosa scabrella</i> (Santa Catarina)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	7,6	288	434	419, 259, 275	157, 176, 224, 402	NI	
2	9,9	288	471	341, 425	341, 323	NI	
3	11,5	224, 260	153	109	109	ácido protocatéquico	padrão
4	20,8	293	436	316	273	4-metil-sulfonil-butil glicosinolato (glucorafanina)	Phenol-Explorer, 2015
6	27,8	265, 357	639	477, 315	300	isoramnetina-diglicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011), Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
7	29,0	313	701	565,535,399,555	399, 389	NI	
8	30,1	298, 307	639	519, 399	399	isoramnetina-diglicosídeo (isômero)	Negri <i>et al.</i> (2011), Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
9	32,4	316	193	149, 178, 134	134	ácido ferúlico	padrão
10	33,0	311	715	569, 549, 399	506, 399	NI	
11	34,6	267, 310	625	463, 445, 301	151	tricetina-7-O-soforosídeo(glicosil(1-2)glicosídeo)	Truchado <i>et al.</i> (2009)
12	35,0	271, 313	609	445, 285, 315	151	quercetina rutinosídeo (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
13	35,3	310	715	549, 399	399, 506	NI	
14	35,7	297, 307	639	519, 399	399	isoramnetina-3-O-diglicosídeo <b>ou</b> patuletina-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011), Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
15	38,7	265,295,330,347	609	429, 285, 255	339, 309	luteolina-7-O- soforosídeo(glicosil(1-2)glicosídeo)	Truchado <i>et al.</i> (2009)
16	40,4	266, 343	755	593	285	campferol-3-O-glicosil-rutinosídeo	Bresciani <i>et al.</i> (2015)
17	41,3	262, 282	593	429, 285	255	campferol-3-O-ramnosil-glicosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
18	41,8	282	403	271	253; 151	pinobanksina-3-O-fenilpropionato	Falcão <i>et al.</i> (2013)
19	43,8	255, 354	609	301	179, 151	rutina	padrão
20	45,2	271, 312	724	678	660, 451, 338, 225	NI	
21	46,1	271, 320	477	315, 300	300	isoramnetina-3-O-glicosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
22	46,9	271, 324, 399	507	492, 345, 329	329	NI	
23	47,4	329, 366	433	313, 271	151	quercetina-3-O-arabinosídeo	Negri <i>et al.</i> (2011)
24	47,9	301, 328, 354	317	179, 151	151	miricetina	Bresciani <i>et al.</i> (2015)
25	49,6	292, 320	582	462, 342	342	tri- <i>p</i> -cumaril-espermidina (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
26	50,2	297, 321	630	494, 468, 358	332	NI	
27	51,0	371	301	179, 151	151	quercetina	padrão

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Mimosa scabrella</i> (Santa Catarina) (continuação)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
29	51,7	254, 366	301	257, 229	185	ácido elágico	Kajdžanoska <i>et al.</i> (2010)
30	52,2	298, 310	582	462, 342	342	tri- <i>p</i> -cumaril-espermidina (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
31	52,6	324	403	271	151	pinobanksina-3-O-fenilpropionato (isômero)	Falcão <i>et al.</i> (2013)
32	52,8	290	271	151, 177	107	naringenina	padrão
33	53,5	310, 338	879	743, 717	581, 555, 551, 415	NI	
34	54,1	291	785	665, 545	545	NI	
36	55,3	319	863	727,701,671,561	565, 535, 399	NI	
37	55,9	294	785	665, 545	545	NI	
38	57,3	317	672	536, 522	479, 372	N', N'', N'''-tris- <i>p</i> -feruloil-espermidina	Negri <i>et al.</i> (2011)
39	58,8	297, 308	785	665, 545	545	NI	
40	59,3	265, 366	285	229, 151	185	campferol	padrão
41	63,9	280	329	311,229,211,293	211, 209, 125	quercetina bi-metilada	Keckes <i>et al.</i> (2013)
42	68,6	294, 308	575	557, 539, 415	539, 521, 441, 415	NI	
43	69,1	312	421	403,377,359,333	359, 341, 317, 299	NI	
Amostra: <i>Mimosa scabrella</i> (Rio Grande do Norte)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	16,2	267, 288	377	329, 287, 215	215	derivado de ácido cafeico	Bystrom <i>et al.</i> (2008)
2	23,1	280	153	109	109, 65	ácido $\beta$ -resorcílico	padrão
3	25,1	265, 345	609	447, 285	285	orientina-7-glicosídeo	Sakalem <i>et al.</i> (2012)
4	26,6	265, 331, 345	755	593	285	campferol-3-O-glicosil-rutinosídeo (isômero)	Bresciani <i>et al.</i> (2015)
5	28,2	265, 331, 347	609	489, 447, 285	327, 255, 284	campferol-3,7-di-O-glicosídeo	Bresciani <i>et al.</i> (2015)
6	32,8	320	223	208, 179, 164	164, 149	ácido sinápico	padrão
7	38,5	265, 331, 350	609	429, 285	151	quercetina-3-O- rutinosídeo	Keckes <i>et al.</i> (2013)
8	40,9	265, 349	593	429, 285, 255	255	campferol-7-O-rutinosídeo	Truchado <i>et al.</i> (2009)
9	42,9	254, 352	609	301	151	rutina	padrão
10	44,2	264, 367	447	285	151	campferol-3-O-glicosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Mimosa scabrella</i> (Rio Grande do Norte) (continuação)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
11	45,4	254, 370	723	678	660, 225, 338, 451	1-sinapoil-2-feruloil gentiobiose	Phenol-Explorer, 2015
12	47,4	303, 358	709	665	314, 299	NI	
13	48,4	266,327,345	447	284	255, 227	campferol-3-O-glicosídeo (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
14	48,6	266,299,326,339	593	285	267, 257, 229, 213	campferol-7-O- rutinosídeo	Truchado <i>et al.</i> (2009)
15	49,2	272,296,307	837	791	773, 565, 452, 338	NI	
16	50,8	361	331	316	287, 271	NI	
17	51,5	268, 345	301	255, 229	211, 185	ácido elágico	
18	52,4	292	403	271	253	pinobanksina-3-O-fenilpropionato	Falcão <i>et al.</i> (2013)
19	52,9	290	271	151	63, 83	naringenina	padrão
20	53,9	297, 366	301	179, 151	151	quercetina	padrão
21	54,2	297, 308	598	478	342	dicumaroil-cafeoil-espermidina	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
22	56,8	238, 319	635	617,327,309,291	273, 247, 193, 165	NI	
23	58,1	297, 307	628	492, 466	449, 372	NI	
24	58,3	297	489	327, 309, 291	273, 247, 193, 165	campferol-3-O-acetil-glicosídeo	
25	59,2	265, 366	285	229, 151	185	campferol	padrão
26	60,1	256, 355	315	300	271, 255, 151	quercetina-3-metil-éter	Falcão <i>et al.</i> (2013)
27	60,3	298, 307	612	492	449, 372	NI	
28	61,1	290	327	291,229,211,171	211, 125	pinobanksina-5-metil-éter-3-O-acetato	Falcão <i>et al.</i> (2013)
29	61,6	284	327	309,291,229,171	153, 127, 125	pinobanksina-3-O-propionato	Falcão <i>et al.</i> (2013)
30	66,1	297	626	506	491	NI	
31	68,7	236, 280	577	559	443, 417	procianidina B1 (dímero)	Sakalem <i>et al.</i> (2012)
32	69,5	313	489	442, 309	185	campferol-3-O-acetilglicosídeo	Jajdzanoska <i>et al.</i> (2010)

Amostra: <i>Mimosa scabrella</i> (Mato Grosso)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
1	12,5	293, 312	305	263, 149, 134	134	NI	

(Continua)

Tabela 23. Continuação...

Amostra: <i>Mimosa scabrella</i> (Mato Grosso) (continuação)							
Pico	$t_R$ (min)	$\lambda/nm$	MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)	Identificação proposta	Referência
2	14,3	295	727	709, 623	303, 667, 521, 385	NI	
3	19,9	296	210	94	66	NI	
4	23,4	294	278	163, 132, 216, 234	119	NI	
5	30,7	266, 304	655	346, 331	331	NI	
6	33,9	270, 294, 314	625	300, 301, 445, 271	271, 255	quercetina diglicosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
7	37,0	275, 287	609	300, 271, 255	271, 255	quercetina rutinosídeo (isômero)	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
8	38,7	280	610	565	547, 225	NI	
9	39,1	282	403	271	253	pinobanksina-3-O-fenil-propionato (isômero)	Falcão <i>et al.</i> (2013)
10	41,3	266, 283, 314	593	429, 285, 255	255	campferol rutinosídeo	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
11	41,8	282	403	271	151	pinobanksina-3-O-fenil-propionato (isômero)	Falcão <i>et al.</i> (2013)
12	45,1	271, 289, 356	723	678	659, 338, 225	1-sinapoil-2-feruloil gentiobiose	Phenol-Explorer, 2015
13	49,1	269	837	791	772, 565, 451, 338	NI	
14	49,6	292, 320	582	462, 342	342	tri- <i>p</i> -cumaril-espermidina	Mihajlovic <i>et al.</i> (2015)
15	50,6	304	762	582, 556, 596	567, 402, 539, 387	NI	
16	51,6	295	950	904	886, 678, 565, 451	NI	
17	52,2	296	672	536, 522	479, 372	N',N'',N'''-tris- <i>p</i> -feruloil-espermidina	Negri <i>et al.</i> (2011)
18	52,7	292	403	271	253	pinobanksina-3-O-fenil-propionato (isômero)	Falcão <i>et al.</i> (2013)
19	53,3	315	762	596, 582	568, 539, 402, 387	NI	
20	54,6	296, 316	672	536, 522	479, 372	N',N'',N'''-tris- <i>p</i> -feruloil-espermidina (isômero)	Negri <i>et al.</i> (2011)
21	56,1	319	762	596, 582	567, 539, 402, 387	NI	
22	56,6	319	702	566, 552, 522	537, 509, 402, 372	NI	
23	57,2	300	672	536, 522	479, 372	N',N'',N'''-tris- <i>p</i> -feruloil-espermidina (isômero)	Negri <i>et al.</i> (2011)
24	61,1	294	327	271	253	pinobanksina-3-O-propionato	Falcão <i>et al.</i> (2013)
25	69,2	268, 329	537	443, 375	331	NI	

NI: não identificado.

Entre os compostos identificados predominaram os flavonoides glicosídeos, principalmente os 3-O-glicosídeos de quercetina, campferol e isoramnetina. A presença de um açúcar na molécula pode influenciar na absorção, distribuição e metabolismo das substâncias pelo organismo. Alguns compostos glicosilados são rapidamente absorvidos no intestino delgado, enquanto outros sofrem hidrólise enzimática ou são metabolizados em agliconas pela microbiota e, então, absorvidos. Em estudos *in vitro* identificou-se que a glicosilação pode afetar positiva ou negativamente a capacidade antioxidante das agliconas. No caso da quercetina e do campferol, a adição de um açúcar à molécula promoveu a redução do potencial de inativação do peroxinitrito (CROZIER; DEL-RIO; CLIFFORD, 2010; XIAO; CHEN; CAO, 2014).

A presença de derivados de pinobanksina foi sugerida em sete amostras e apenas em *Anadenanthera* este composto não foi identificado. Trata-se de um diidroflavonol com potencial antibacteriano (SIMÕES, 2007) já identificado em amostras de mel e de própolis (CABRAL, 2008; FALCÃO *et al.*, 2013; KECKES *et al.*, 2013). O 4-metil-sulfonil-butil glicosinolato (glucorafanina), encontrado em três amostras (*Alternanthera*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *M. scabrella* de Santa Catarina), faz parte do grupo dos glicosinolatos, cujos compostos ocorrem principalmente em vegetais da família Brassicaceae, mas também em outras angiospermas (PRAKASH; GUPTA, 2013). Traka *et al.* (2013), em estudos com *Brassica oleracea* L. (brócolis), observaram quantidades variáveis de glucorafanina nas amostras e citaram efeitos benéficos para a saúde, como o potencial anticarcinogênico, relacionados com a presença de glucorafanina e produtos da hidrólise desta substância. Com base na literatura consultada, esta é a primeira vez que este composto foi identificado em amostras de PAD.

No espectro de massas da amostra monofloral de *Alternanthera* foram observados 26 picos e 18 foram identificados, incluindo cinco padrões e os picos majoritários. O conteúdo de catequina ( $0,73 \pm 0,08$  mg/100 g de amostra), ácido siríngico ( $4,81 \pm 0,05$  mg/100 g), ácido *p*-cumárico ( $0,47 \pm 0,02$  mg/100 g), rutina ( $6,65 \pm 0,05$  mg/100 g) e quercetina ( $1,92 \pm 0,02$  mg/100 g) foi determinado utilizando a curva de calibração construída com uma mistura dos padrões analisados por HPLC-DAD. Os compostos majoritários identificados foram uma antocianina glicosilada (petunidina-3-O-galactosídeo, tempo de retenção: 49,3 min) e um derivado de espermidina (tri-*p*-cumaril-espermidina, tempo de retenção: 56,7 min). O

composto petunidina-3-O-galactosídeo resulta da substituição de um grupo hidroxila da aglicona por uma unidade de galactose. Derivados de petunidina foram previamente identificados em vinho tinto (JIMÉNEZ *et al.*, 2010). O tri-*p*-cumaril-espermidina é um conjugado de poliamina com compostos fenólicos que faz parte de um grupo de substâncias bioativas com potencial antimicrobiano (BASSARD *et al.*, 2010). A ocorrência de derivados de espermidina foi reportada em amostras de PAD produzidas em Belgrado, Sérvia (MIHAJLOVIC *et al.*, 2014).

A análise da amostra de *Anadenanthera* indicou 32 picos, dos quais 23 foram identificados, entre eles, oito padrões e os picos majoritários. Os padrões foram também quantificados:  $0,69 \pm 0,03$  mg de catequina/100 g de amostra,  $12,54 \pm 0,12$  mg de ácido  $\beta$ -resorcílico/100 g,  $1,04 \pm 0,01$  mg de ácido ferúlico/100 g,  $3,66 \pm 0,14$  mg de rutina/100 g,  $13,05 \pm 0,08$  mg de ácido cinâmico/100 g,  $4,57 \pm 0,17$  mg de naringenina/100 g e  $7,42 \pm 0,15$  mg de quercetina/100 g. A catequina não foi identificada na análise por *HPLC-DAD* e, conseqüentemente, não foi quantificada, porque o conteúdo estava abaixo do limite de detecção.

Considerando-se a intensidade dos picos, dois derivados de espermidina foram os principais compostos no PAD de *Anadenanthera*: tri-*p*-cumaril-espermidina (tempo de retenção: 56,6 min) e N', N'', N'''-tris-*p*-feruloil-espermidina (tempo de retenção: 57,3 min). O maior tempo de retenção deste último indica uma menor polaridade em relação aos demais, o que coincide com o observado por Negri *et al.* (2011) para este composto em amostras de PAD. Os autores atribuíram a menor polaridade desta substância à presença de um grupo metoxil na unidade feruloil.

Os compostos ampeloptina e eriodictiol ocorreram, apenas, no PAD de *Anadenanthera*. Zhou *et al.* (2010) citaram que a ampeloptina (ou diidromiricetina) é utilizada na medicina chinesa como agente anti-inflamatório e que, em estudos *in vitro*, este composto demonstrou potencial antioxidante e antitumoral. Keckes *et al.* (2013) sugeriram que o eriodictiol e a quercetina podem ser utilizados como marcadores para o mel de girassol produzido na Sérvia.

Dentre os espectros gerados, o do PAD de *Cocos nucifera* foi aquele com o menor número de picos (22), dos quais 14 foram identificados. Entre as oito amostras, verificou-se que esta teve a menor capacidade antioxidante e baixa capacidade antimicrobina contra bactérias, conforme mencionado anteriormente, o que pode estar relacionado ao menor número ou ao tipo de compostos nesse PAD. Um glicosídeo de isoramnetina (isoramnetina-3-O-ramnosil-glicosídeo) foi o

composto majoritário, o qual já foi identificado previamente no PAD (NEGRI *et al.*, 2011). Flavonoides-O-glicosídeos foram identificados no mel e, o tipo e a quantidade destas substâncias, relacionados com a origem botânica das amostras (TRUCHADO; FERRERES; TOMAS-BARBERAN, 2009). A presença de cinco padrões foi confirmada e estes quantificados por *HPLC-DAD*: ácido clorogênico ( $4,85 \pm 0,12$  mg/100 g), ácido ferúlico ( $0,71 \pm 0,02$  mg/100 g), ácido sinápico ( $0,29 \pm 0,03$  mg/100 g), rutina ( $4,78 \pm 0,10$  mg/100 g) e quercetina ( $1,86 \pm 0,01$  mg/100 g).

Dos 26 picos observados na amostra de *M. caesalpiniaefolia*, 21 foram identificados. Esta foi uma das duas amostras em que o composto majoritário (tempo de retenção: 56,1 min) não foi identificado, composto esse que ocorreu, também, na amostra *M. scabrella* coletada em Mato Grosso (MT). O segundo pico de maior intensidade corresponde ao composto isoramnetina-3-O-glicosídeo. Sete padrões foram confirmados, sendo que o teor determinado por *HPLC-DAD* foi de:  $0,75 \pm 0,05$  mg de catequina/100 g de amostra,  $4,53 \pm 0,19$  mg de ácido clorogênico/100 g,  $0,15 \pm 0,01$  mg de ácido caféico/100 g,  $5,36 \pm 0,24$  mg de ácido siríngico/100 g,  $8,39 \pm 0,16$  mg de rutina/100 g,  $2,91 \pm 0,06$  mg de quercetina/100 g e  $7,40 \pm 0,45$  mg de campferol/100 g.

Para o PAD de *Myrcia* detectaram-se 40 picos, sendo 28 identificações. Os compostos majoritários foram identificados como miricetina (tempo de retenção: 47,8 min) e ácido elágico (tempo de retenção: 51,5 min). A miricetina é uma substância de ação antioxidante que, dependendo da concentração e das condições do meio, pode agir como pró-oxidante (CHOBOT; HADACEK, 2011). O ácido elágico é um dímero de ácido gálico com ação anti-inflamatória (BAE *et al.*, 2010), antioxidante (FESTA *et al.*, 2001) e potencial para reduzir o acúmulo de lipídeos no tecido adiposo (OKLA *et al.*, 2015). Saldanha *et al.* (2013) analisaram extratos de *Myrcia bella*, uma espécie do gênero *Myrcia* comum nas áreas de Cerrado, e identificaram, assim como no presente estudo, glicosídeos de miricetina, quercetina e campferol.

Cinco padrões foram confirmados por espectrometria de massas no PAD de *Myrcia*, mas um deles, o ácido sinápico, não foi identificado e quantificado por *HPLC-DAD*. O conteúdo de ácido vanílico foi de  $6,06 \pm 0,08$  mg /100 g, ácido *p*-cumárico de  $6,68 \pm 0,02$  mg /100 g, rutina de  $3,98 \pm 0,01$  mg /100 g e quercetina de  $67,91 \pm 0,25$  mg /100 g. Este foi o maior teor de quercetina observado entre as amostras e foi, também neste PAD, que se observou a maior capacidade antioxidante por ambos os métodos. Isto corrobora com o resultado da análise de

correlação de *Pearson*, discutida anteriormente (parte 1), que indicou correlação positiva entre este composto e a capacidade antioxidante do PAD.

Os compostos cianidina-3-rutinosídeo e apigenina foram encontrados apenas na amostra de *Myrcia*. O primeiro é um polifenol do grupo das antocianinas com potencial para auxiliar na prevenção de doenças degenerativas, que já foi identificado em amostras de açaí coletadas no estado do Pará (GOUVÊA *et al.*, 2012). A apigenina é um flavonoide da classe das flavonas encontrado em frutas e vegetais, com ação anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (SHUKLA; GUPTA, 2010).

Cada uma das três amostras de *M. scabrella* apresentou um perfil singular de compostos. Esta variação pode estar relacionada com diferenças agronômicas ou genótípicas; condições climáticas, como temperatura, estresse hídrico e intensidade de luz; além de condições de solo; que poderiam influenciar na composição do pólen destas plantas (DAOUD *et al.*, 2015). No PAD coletado em Santa Catarina foi observado o maior número de picos (43) e, embora o composto majoritário não tenha sido identificado (tempo de retenção: 53,6), outros 28 o foram. Seis padrões foram identificados, um deles apenas na análise por espectrometria de massas (ácido ferúlico). O conteúdo dos padrões variou de 1,50 a 46,80 mg/100 g, sendo: ácido protocatéquico ( $1,50 \pm 0,01$  mg/100 g), rutina ( $46,80 \pm 2,57$  mg/100 g), naringenina ( $18,36 \pm 1,09$  mg/100 g), quercetina ( $5,97 \pm 0,29$  mg/100 g) e campferol ( $5,50 \pm 0,31$  mg/100 g). Deve-se mencionar que, nesta amostra, foram identificados dois compostos comuns a plantas do gênero *Myrcia*: miricetina e tricetina-7-O-soforosídeo[glicosil(1-2)glicosídeo].

No PAD coletado no Rio Grande do Norte foram observados 32 picos no espectro de massas, dos quais 25 foram identificados. O campferol-3-O-glicosídeo foi o composto majoritário (tempo de retenção: 44,2 min) e, além deste, outros sete glicosídeos deste flavonol foram identificados. Ácido  $\beta$ -resorcílico, ácido sinápico, rutina, naringenina, quercetina e campferol foram confirmados, de modo que o conteúdo foi de, respectivamente,  $9,65 \pm 0,12$  mg/100 g,  $0,33 \pm 0,03$  mg/100 g,  $25,81 \pm 0,31$  mg/100 g,  $10,41 \pm 0,25$  mg/100 g,  $5,05 \pm 0,21$  mg/100 g e  $44,97 \pm 2,88$  mg/100 g. A procianidina B1, que foi identificada apenas nesta amostra, é uma substância de ação antioxidante (AMÍC; LUCIC, 2010) e antiviral (LI *et al.*, 2010).

Na amostra coletada em Mato Grosso, dos 25 picos observados, 13 foram identificados, incluindo o majoritário (N',N'',N'''-tris-*p*-feruloil-espermidina). Entre as

três amostras de *M. scabrella*, nesta observou-se o menor número de compostos, juntamente com a menor capacidade antioxidante por ambos os métodos (conforme discutido anteriormente), no entanto, a capacidade antimicrobiana foi intermediária, sinalizando que este parâmetro pode ser mais influenciado pelo tipo de compostos presentes na amostra do que pelo número total de compostos.

#### 4 CONCLUSÃO

O pólen apícola desidratado é fonte de energia e proteínas. Tem elevado conteúdo de zinco, manganês e cobre e algumas amostras tem quantidades importantes de ferro e manganês, portanto, seria importante a realização de testes de biodisponibilidade destes micronutrientes. Quanto as propriedades biológicas, destaca-se a capacidade antioxidante, muitas vezes superior ao observado nas frutas vermelhas reconhecidas como fontes de antioxidantes na dieta. Os compostos fenólicos atuam como agentes potencialmente bioativos, sendo que a quercetina tem especial importância neste alimento. Com relação a capacidade antimicrobiana, mais estudos devem ser conduzidos para determinar quais compostos atuam e se outros micro-organismos são mais sensíveis. Flavonoides glicosilados são os principais compostos fenólicos neste produto e devem ser estudados, porém, outras substâncias de elevado potencial biológico devem ser melhor investigadas, tanto em relação a prevalência destes compostos no pólen apícola desidratado, quanto aos possíveis efeitos *in vitro* e *in vivo*.

Os parâmetros instrumentais de cor são fortes indicativos da presença de cálcio, magnésio e ferro nas amostras e podem ser utilizados para sugerir o conteúdo de lipídeos, cinzas, potássio, zinco, manganês e fenólicos totais, bem como a capacidade antioxidante pelo método DPPH e ORAC. Numa abordagem multivariada, o teor de fenólicos totais, a capacidade antimicrobiana, a capacidade antioxidante e os parâmetros instrumentais de cor são variáveis que discriminam as amostras, porém, não são absolutos para classifica-las de acordo com a origem botânica e a Região de origem.

Por fim, conclui-se que há uma grande variação nas características do pólen apícola desidratado. Em um mesmo apiário coletaram-se produtos cujo perfil variou ao longo do ano em função da fonte de pólen disponível para as abelhas e de

fatores que podem interferir na produção do grão de pólen pelos vegetais. Na busca por produtos de maior potencial biológico, deve-se priorizar aqueles oriundos da Região Sul do Brasil, especialmente os que contenham o gênero *Brassica* em sua composição. Ademais, embora muitos pesquisadores busquem estabelecer um perfil físico-químico para cada tipo polínico, com a variação observada entre produtos monoflorais de um mesmo táxon pode-se concluir que esta pode não ser uma tarefa simples, embora tendências possam ser observadas.

## 5 REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I.M.; ALI-SHTAYEH, M.S.; JAMOUS, R.M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v.166, n.1, p.179-191, 2015.

ALMARAZ-ABARCA, N.; CAMPOS, M.G.; DELGADO-ALVARADO, E.A.; ÁVILA-REYES, J.A.; HERRERA-CORRAL, J.; GONZÁLEZ-VALDEZ, L.S.; NARANJO-JIMÉZES, N.; FRIGERO, C.; TOMATAS, A.F.; ALMEIDA, A.J.; VIEIRA, A.; URIBE-SOTO, J.N. Pollen flavonoid/phenolic acid composition of four species of Cactaceae and its taxonomic significance. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.3, n.3, p.534-543, 2008.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; ARRUDA, V.A.S.; BARRETO, L.M.R.C. **Manual de Controle de Qualidade do Pólen Apícola**. São Paulo: APACAME, 2012. 28 p.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets, **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, n.1, p.105-111, 2005.

AMÍC, D.; LUCIC, B. Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.1, p.28-35, 2010.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.232-240, 2007.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18.ed. 3rd revision. Gaithersburg, 2005. 1 vol.

ARAUJO, M.C.; BEZERRA, I.N.; BARBOSA, F.S.; JUNGER, W.L.; YOKOO, E.M.; PEREIRA, R.A.; SICHIERI, R. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. **Revista de Saúde Pública**, v.47,n.1,p.177-189,2013.

ARGENTINA. Ley nº 18.284, de 30 de junio de 1971. La Secretaría de Estado de Salud Pública establece la vigencia de las normas higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial contenidas en el Código Alimentario Argentino. **Boletín Oficial**, Buenos Aires, 20 set. 1971.

ARRAES, R.A.; MARIANO, F.Z.; SIMONASSI, A.G. Causas do desmatamento no Brasil e seu ordenamento no contexto mundial. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.50, n.1, p.119-140, 2012.

ARRUDA, V.A.S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica**. São Paulo, 2013. 192p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ARRUDA, V.A.S.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ESTEVINHO, M.L.M.F.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Propriedades biológicas do pólen apícola de coqueiro, coletado na região Nordeste do Brasil. **Magistra**, v.25, p.1-7, 2013b. Número Especial.

ARRUDA, V.A.S.; SANTOS-PEREIRA, A.A.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n.2, p.100-105, 2013a.

BAE; J.Y.; CHOI, J.S.; KANG, S.W.; LEE, Y.J.; PARK, J.; KANG, Y.H. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. **Experimental Dermatology**, v.19, n.8, p.182-190, 2010.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen dominante. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.2, p.351-366, 1970a.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 2. Pólen acessório. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.3, p.571-590, 1970b.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 3. Pólen isolado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.4, p.747-772, 1970c.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees, **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p.342-350, 2004.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.

BASSARD, J.E.; ULLMANN, P.; BERNIER, F; WERCK-REICHHART, D. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. **Phytochemistry**, v.71, p.1808-1824, 2010.

BENAVIDES, A.; MONTORO, P.; BASSARELLO, C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: characterisation and LC/ESI/MS/MS quali-quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.3, p.639-647, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 2001. Seção 1, p.18.

BRASIL. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da União**, n.219, Brasília, 13 nov. 2012. Seção 1, p.122.

BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. **Diário Oficial da União**, n.184, Brasília, 23 set. 2005. Seção 1, p.372.

BRESCIANI, L.; CALANI, L.; CASSU, M.; MENA, P.; SAYEGH, M.; RAY, S.; DEL-RIO, D. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. **PharmaNutrition**, v.3, n.2, p.11-19, 2015.

BRITO, A.; RAMIREZ, J.E.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M.J. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v.19, n.11, p.17400-17421, 2014.

BYSTROM, L.M.; LEWIS, B.A.; BROWN, D.L.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, R.L. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry**, v.111, n.4, p.1017-1024, 2008.

CABRAL, I.S.R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CABRERA, C.; MONTENEGRO, G. Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.40, n.1, p.223-230, 2013.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CAMPOS, M.G.R.; FRIGERIO, C.; LOPES, J.; BOGDANOV, S. What is the future of Bee-Pollen? **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v.2, n.4, p.131-144, 2010.

CARPES, S.T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da Região Sul do Brasil**. 2008. 255f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARPES, S.T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1818-1825, 2007.

CARPES, S.T.; PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil, **Química Nova**, v.31, n.7, p.1660-1664, 2008.

CARPES, S.T.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.3, p.220-229, 2009.

CHISTÉ, R.C.; YAMASHITA, F.; GOZZO, F.C.; MERCADANTE, A.Z. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography**, v.1218, p.57-63, 2011.

CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. **Redox Report**, v.16, n.6, p.242-247, 2011.

CROZIER, A.; DEL-RIO, D.; CLIFFORD, M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v.31, n.6, p.446-467, 2010.

CUNHA, N.R.S.; LIMA, J.E.; GOMES, M.F.M.; BRAGA, M.J. Intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.46, n.2, p.291-323, 2008.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, n.10, p.7313-7352, 2010.

DAOUD, A.; MALIKA, D.; BAKARI, S.; HFAIEDH, N.; MNAFGUI, K.; KADRI, A.; GHARSALLAH, N. Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015. No prelo.

DRUMOND, P.M. Serviço valoroso: quanto custa para a agricultura brasileira os serviços prestados pelos polinizadores naturais? **A Lavoura**, n.696, p.24-27, 2013.

FANALI, C.; DUGO, L.; ROCCO, Nano-liquid chromatography in nutraceutical analysis: determination of polyphenols in bee pollen. **Journal of Chromatography A**, v.1313, n.25, p.270-274, 2013.

FALCÃO, S.I.; VALE, N.; GOMES, P.; DOMINGUES, M.R.M.; FREIRE, C.; CARDOSO, S.M.; VILAS-BOAS, M. Phenolic profiling of portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochemical Analysis**, v.24, n.4, p.309-318, 2013.

FAPCEN. Fundação de Apoio à Pesquisa do Corredor de Exportação Norte. **Proposta de integração apicultura e silvicultura será apresentada no TO**, 2011. Disponível em: <<http://www.fapcen.agr.br/?p=451>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

FÉAS, X.; VÁZQUEZ-TATO, M.P.; ESTEVINHO, L.; SEIJAS, J.A.; IGLESIAS, A. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v.17, n.7, p.8359-8377, 2012.

FESTA, F.; AGLITTI, T.; DURANTI, G.; RICORDY, R.; PERTICONE, P.; COZZI, R. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells in vitro revealed by the comet assay. **Anticancer Research**, v.21, n.6A, p.3903-3908, 2001.

FREIRE, K.R.L.; LINS, A.C.S.; DÓREA, M.C.; SANTOS, F.A.R.; CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, v.17, n.2, p.1652-1664, 2012.

FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; FILHO, H.G.; CURI, P.R.; GOMES DIERCKX, S.M.A.; FUNARI, A.R.M.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Composições Bromatológica e Mineral do Pólen Coletado por Abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.11, n.2, p. 88-93, 2003.

GONÇALVEZ, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C.** São Paulo, 2008. 88p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

GOUVÊA, A.C.M.S.; ARAUJO, M.C.P.; SCHULZ, D.F.; PACHECO, S.; GODOY, R.L.O.; CABRAL, L.M.C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.1, p.43-46, 2012.

GRAIKOU, K.; KAPETA, S.; ALIGIANNIS, N.; SOTIROUDIS, G.; CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E.; CHINOU, L. Chemical analysis of Greek pollen - antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. **Chemistry Central Journal**, v.5, n.33, p.1-9, 2011.

GRANATO, D.; CALADO, V.M.A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, v.55, p.137-149, 2014.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.10, p.572-584, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE lança mapa de biomas do Brasil e o mapa de vegetação do Brasil, em comemoração ao dia mundial da biodiversidade**, 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 26 mai. 2013.

JIMÉNEZ, A.; LISA-SANTAMARÍA, P.; GARCÍA-MARINO, M.; ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.; RIVAS-GONZALO, J.C.; REVUELTA, J.L. The biological activity of the wine anthocyanins delphinidin and petunidin is mediated through Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v.10, p.858-869, 2010.

KAJDZANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MS identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 29, n.2, p.181-194, 2010.

KASKONIENÉ, V.; VENSKUTONIS, P.R. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.620-634, 2010.

KECKES, S.; GASIC, U.; VELICKOVIC, T.C.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; NATIC, M.; TESIC, Z. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.138, n.1, p.32-40, 2013.

KETKAR, S.S.; RATHORE, A.S.; LOHIDASAN, S.; RAO, L.; PARADKAR, A.R.; MAHADIK, K.R. Investigation of the nutraceutical potential of monofloral Indian mustard bee pollen. **Journal of Integrative Medicine**, v.12, n.4, p.379-389, 2014.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAFMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-6, 2015.

KOOLEN, H.H.F.; SILVA, F.M.A.; GOZZO, F.C.; SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.51, n.2, p.467-473, 2013.

LEBLANC, B.W.; DAVIS, O.K.; BOUE, S.; DELUCCA, A.; DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v.115, n.4, p.1299-1305, 2009.

LÉON-RUIZ, V.; VERA, S.; GONZÁLEZ-PORTO, A.V.; ANDRÉS, M.P.S. Vitamin C and sugar levels as simple markers for discriminating spanish honey sources. **Journal of Food Science**, v.76, n.3., p.C356-C361, 2011.

LI, S.; KODAMA, E.N.; INOUE, Y.; TANI, H.; MATSUURA, Y.; ZHANG, J.; TANAKA, T.; HATTORI, T. Procyanidin B1 purified from *Cinnamomi cortex* suppresses hepatitis C virus replication. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v.20, n.6, p. 239-248, 2010.

LIN, L.Z.; HARNLY, J.M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Food Chemistry**, v.120, n.1, p.319-326, 2010.

LOPES, J.; STANCIU, O.G.; CAMPOS, M.G.; ALMARAZ-ABARCA, N.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MARGHITAS, L.A. Bee pollen antioxidant activity - a review: achievements and further challenges. **Journal of Pharmacognosy**, v.2, n.2, p.25-38, 2011.

LV, H.; WANG, X.; HE, Y.; WANG, H.; SUO, Y. Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from Qinghai-Tibetan Plateau by HPLC-DAD-APCI/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.38, p.49-54, 2015.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MELO, I.L.P.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.3, p.346-53, 2009.

MENEZES, J.D.S.; MACIEL, L.F.; MIRANDA, M.S.; DRUZIAN, J.I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.233-242, 2010.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.127–130, 2001.

MERRIL, A.L.; WATT, B.K. **Energy value foods: basis and derivation**. Washington: United States Department of Agriculture, 1973. 105p.

MIHAJLOVIC, L.; RADOSAVLJEVIC, J.; BURAZER, L.; SMILJANIC, K.; VELICKOVIC, T.C. Composition of polyphenol and polyamide compounds in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen and sub-pollen particles. **Phytochemistry**, 2014. No prelo.

MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA-NETO, J.A.A. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1057-1065, 2007.

MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA-NETO, J.A.A. Flora de importância polinífera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.1145-1153, 2011.

MOHDALY, A.A.A.; MAHMOUD, A.A.; ROBY, M.H.H.; SMETANSKA, I.; RAMADAN, M.F. Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Food Biochemistry**, 2015. No prelo.

MODRO, A.F.H.; SILVA, I.C.; LUZ, C.F.P.; MESSAGE, D. Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n.2, p.281-285, 2009.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.5, p.1096-1101, 2011.

MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, V.C.; RODRIGUES, R.R. **Atlas do pólen de plantas apícolas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual. 2002. 88p.

MORGANO, M.A.; MARTINS, M.C.T.; RABONATO, L.C.; MILANI, R.F.; YOTSUYANAGI, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, 727-736, 2012.

NEGRI, G.; TEIXEIRA, E.W.; ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P.; BORGUINI, R.G.; SALATINO, A. Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from Southeast Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5516-5522, 2011.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. esp., p.107-110, 2009.

NOGUEIRA, C.; IGLESIAS, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.11173-11187, 2012.

OKLA, M.; KANG, I.; KIM, D.M.; GOURINENI, V.; SHAY, N.; GU, L.; CHUNG, S. Ellagic acid modulates lipid accumulation in primary human adipocytes and human hepatoma Huh7 cells via discrete mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.26, n.1, p.82-90, 2015.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, K.C.L.S.; MORIYA, M.; AZEDO, R.A.B.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; TEIXEIRA, E.W.; ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1099-1102, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4619-4626, 2001.

PANZIERA, F.B.; DORNELES, M.M.; DURGANTE, P.C.; SILVA, V.L. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.14, n.1, p.49-58, 2011.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FÉAS, X.; ESTEVINHO, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v.63, p.233-239, 2014.

PEREIRA, T.C.; HESSEL, G. Deficiência de zinco em crianças e adolescentes com doenças hepáticas crônicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, p.322-328, 2009.

PESQUISA, USP ONLINE DESTAQUE. **Estudo compara propriedades de pólen apícola de todo o país**, 2015. Disponível em: <<http://www5.usp.br/85688/estudo-da-fcf-analisa-amstras-de-polen-apicola-de-todo-o-pais/>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

PHENOL-EXPLORER. **Database on polyphenol content in foods**, 2015. Disponível em: <<http://phenol-explorer.eu/>>. Acesso em: 05 abr. 2015.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PINTO, F.A.; CAMPOS, C.N.; BARRETO, L.M.R.C. Perfil físico-químico do pólen apícola produzido em Taubaté, Vale do Paraíba, sudeste do Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.20, n.1-2; p.1-6, 2012.

PRAKASH, D.; GUPTA, C. Glucosinolates: the phytochemicals of nutraceutical importance. In: PRAKASH, D.; SHARMA, G. **Phytochemicals of nutraceutical importance**. Boston: CAB International. cap.9. p.132-147.

SAKALEM, M.E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.6, p.1219-1232, 2012.

SALDANHA, L.L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A.L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v.18, n.7, p.8402-8416, 2013.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. **Pharmaceutical Research**, v.27, n.6, p.962-978, 2010.

SIMÕES, C.C. **Estudo bioquímico da ação da própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos**. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado Odontologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: PACKER, L. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1999. vol. 299, p.152-178.

SLOW FOOD FOUNDATION FOR BIODIVERSITY. **A world without bees?** 2015. Disponível em: <[www.slowfood.com](http://www.slowfood.com)>. Acesso em: 24 ago. 2015.

SOUZA, B.R. **Quantificação das vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) e vitâmeros das vitaminas B<sub>3</sub> e B<sub>6</sub> em amostras de pólen apícola desidratado provenientes da Região Sul do Brasil.** São Paulo, 2014. 125p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

TAVDIDISHVILI, D.; KHUTSIDZE, T.; PKHAKADZE, M.; VANIDZE, M.; KALANDIA, A. Flavonoids in Georgian Bee Bread and Bee Pollen. **Journal of Chemistry Chemical & Engineering**, v.8, p.676-681, 2014.

TOLEDO, V.A.A.; CHAMBÓ, E.D.; HALAK, A.L.; FAQUINELLO, P.; PARPINELLI, R.S.; OSTROWSKI, K.R.; CASAGRANDE, A.P.B.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Biologia floral e polinização em girassol (*Helianthus annuus* L.) por abelhas africanizadas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.5-17, 2011.

TRAKA, M.H.; SAHA, S.; HUSEBY, S.; KOPRIVA, S.; WALLEY, P.G.; BARKER, G.C.; MOORE, J.; MERO, G.; VAN DEN BOSCH, F.; CONSTANT, H.; KELLY, L.; SCHEPERS, H.; BOBBUPALLI, S.; MITHEN, R.F. Genetic regulation of glucoraphanin accumulation in Beneforté broccoli. **New Phytologist**, v.198, p.1085-1095, 2013.

TRUCHADO, P.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.43, p.7241-7248, 2009.

ULUSOY, E.; KOLAYLI, S. Phenolic composition and antioxidant properties of anzer bee pollen. **Journal of Food Biochemistry**, v.38, n.1, p.73-82, 2014.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. USDA **Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2**, 2010. Disponível em: <[http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC\\_R2.pdf](http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC_R2.pdf)>. Acesso em: 24 set. 2015.

VECCHIA, P.D. **Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola (determinação de compostos fenólicos e flavonóides totais)**, 2010. Disponível em: <[www.eventos.cp.utfpr.edu.br](http://www.eventos.cp.utfpr.edu.br)>. Acesso em: 12 mai. 2011.

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. Flavonoid glycosylation and biological benefits. **Biotechnology Advances**, 2014. No prelo.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n.6., p.1060-1066, 2008.

YANG, K.; WU, D.; YE, X.; LIU, D.; CHEN, J.; SUN, P. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n.3, p.708-718, 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline: potassium intake for adults and children**. Geneva: World Health Organization, 2012. 42p.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline: sodium intake for adults and children**. Geneva: World Health Organization, 2012. 46p.

ZHOU, W.M.; HE, R.R.; YE, J.T.; ZHANG, N. LIU, D.Y. Synthesis and biological evaluation of new 5-fluorouracil-substituted ampelopsin derivatives. **Molecules**, v.15, n.4, p.2114-2123, 2010.

ZHOU, J.; QI, Y.; RITHO, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; WU, L.; LI, Y.; SUN, L. Flavonoid glycosides as floral origin markers to discriminate of unifloral bee pollen by LC-MS/MS. **Food Control**, 2015. No prelo.

ZIELINSKI, A.A.F.; HAMINIUK,C.W.I.; NUNES, C.A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S.M.; GRANATO, D. Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: a critical review and guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, n.3, p.300-316, 2014.

# CAPÍTULO 5

## CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES EXTRATOS E PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO E COMPARAÇÕES POR ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade antioxidante de diferentes extratos, e os parâmetros instrumentais de cor, de 27 amostras monoflorais e 37 heteroflorais de pólen apícola desidratado, aplicando uma abordagem multivariada para a análise dos resultados. Os extratos a base de etanol a 70%; metanol a 50% e acetona a 70%; e éter etílico, álcool etílico e água foram preparados e sua capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH. Os parâmetros instrumentais de cor foram determinados por refletância. A capacidade antioxidante média dos três extratos principais variou de 35,42 a 54,21  $\mu\text{mol ET/g}$  de amostra. Houve certa correlação entre e coordenada  $b^*$  e a capacidade antioxidante. Pela análise de componentes principais, a Região Sul destacou-se das demais quanto à capacidade antioxidante e a Região Nordeste pelo parâmetro  $L^*$  (luminosidade). 100% das amostras da Região Nordeste e 80% das amostras da Região Sudeste foram corretamente classificadas utilizando o método dos mínimos quadrados parciais. A extração a base de metanol a 50% e acetona a 70% mostrou-se a mais eficiente entre as condições testadas, embora a extração com etanol a 70% possa ser uma boa alternativa. A coordenada  $b^*$  poderia ser utilizada para sugerir a capacidade antioxidante do pólen apícola desidratado pelo método DPPH, ainda que não possa ser utilizada como único critério de seleção. Com base nos parâmetros analisados, algumas amostras de pólen apícola tiveram perfis característicos da Região onde foram produzidas.

**Palavras-chave:** pólen apícola; métodos de extração; capacidade antioxidante; cor.

### ABSTRACT

This study aimed to determine the antioxidant capacity of different extracts and the color instrumental parameters of 27 monofloral and 37 heterofloral samples of

dehydrated bee-pollen, applying a multivariate approach to data analysis. The extracts were prepared with ethanol; 50% methanol and 70% acetone; and ethyl ether, ethyl alcohol and water; and their antioxidant capacity assessed by DPPH method. The color instrumental parameters were determined by reflectance. The average of the three major antioxidant capacity extracts ranged from 35.42 to 54.21  $\mu\text{mol TE/g}$  of sample. There was some correlation between coordinate  $b^*$  and the antioxidant capacity of all extracts. The South Region had the highest antioxidant capacity and the Northeast Region the highest  $L^*$  value by principal component analysis. 100% of the samples in the Northeast and 80% of the Southeast samples were classified correctly using the partial least squares-discriminant analysis. It was concluded that 50% methanol and 70% acetone extraction showed the most efficient among the conditions tested, although the extraction with 70% ethanol may be a good alternative. The coordinate  $b^*$  could be used to suggest the antioxidant capacity of dehydrated bee-pollen by DPPH method, although it can not be used as a single selection criteria. Based on the parameters analyzed, some bee-pollen samples has characteristics profiles related to region where it was produced.

**Keywords:** bee-pollen; extraction methods; antioxidant capacity; color.

## 1 INTRODUÇÃO

Antioxidantes são um conjunto heterogêneo de moléculas que, quando presentes em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, são capazes de retardar reações oxidativas nos alimentos, ou reagir com os radicais livres gerados no organismo, formando moléculas estáveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

O organismo humano dispõe de mecanismos antioxidantes para limitar os níveis intracelulares de radicais livres, porém, quando há um desequilíbrio entre a geração destes compostos e a capacidade de atuação do sistema endógeno de controle, acontece o chamado estresse oxidativo. Nesta situação, pode ocorrer a oxidação de açúcares, proteínas, lipídeos, enzimas e DNA, promovendo danos na estrutura e função da célula que podem ou não serem permanentes (VASCONCELOS *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010). Pesquisadores sugeriram

que o estresse oxidativo pode contribuir para o processo de envelhecimento celular, bem como para o desenvolvimento de doenças auto-imunes, cardiovasculares e neurodegenerativas e, ainda, na indução de alguns tipos de câncer. A inclusão de antioxidantes na dieta poderia auxiliar na prevenção dos danos relacionados ao estresse oxidativo (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

A adição de antioxidantes nas formulações tem como objetivo aumentar a estabilidade oxidativa. Compostos como ácido ascórbico e ácido cítrico estão na lista de antioxidantes aprovados pela ANVISA para uso alimentício (BRASIL, 2010). Substâncias sintéticas, como o butil-hidróxi-tolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA), são autorizadas em alguns países, contudo, antioxidantes naturais tem apelo positivo junto a população e tendem a ser submetidos a uma avaliação de segurança menos rigorosa que a exigida para aprovação de um composto sintético (BRASIL, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010).

As plantas são importantes fontes de compostos antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999). O pólen apícola é produzido a partir do pólen das flores e, por esta razão, contém uma variedade de compostos bioativos que, nesta matriz, estão protegidos pelas duas camadas que envolvem os grãos de pólen (KOMOSINSKA-VASSEV *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos são apontados como os principais responsáveis pela ação antioxidante do pólen apícola (LeBLANC *et al.*, 2009; MARGHITAS *et al.*, 2009). Estes compostos são, em sua maioria, solúveis em água e solventes orgânicos de polaridade intermediária a alta, o que pode explicar o uso de diferentes diluições de etanol na extração destas substâncias (CARPES *et al.*, 2008). Entretanto, embora importantes, os compostos fenólicos não são os únicos antioxidantes encontrados no pólen apícola. Compostos como o  $\beta$ -caroteno e as vitaminas E e C já foram observados neste alimento (OLIVEIRA *et al.*, 2009; MELO, ALMEIDA-MURADIAN, 2010) e sabe-se que estes dois primeiros são solúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade. Assim, para a extração dos antioxidantes do pólen apícola pode ser necessário o uso de solventes de diferentes polaridades.

Em alguns estudos, foi descrita a correlação entre capacidade antioxidante e cor instrumental do alimento (HENRÍQUEZ *et al.*, 2010). A determinação dos parâmetros instrumentais de cor é uma análise de baixo custo e rápida que, no caso do pólen apícola, exigiria apenas a trituração prévia da amostra. A observância de correlação, seja ela positiva ou negativa, entre cor instrumental e capacidade

antioxidante de um alimento possibilitaria presumir os valores desta última a partir dos resultados da primeira.

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi determinar a capacidade antioxidante de diferentes extratos, e os parâmetros instrumentais de cor, de amostras monoflorais e heteroflorais de pólen apícola desidratado, aplicando uma abordagem multivariada para a análise dos dados.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAS**

Foram adquiridas 64 amostras de pólen apícola desidratado entre os meses de novembro de 2011 e dezembro de 2013. Todas as amostras foram produzidas por abelhas da espécie *Apis mellifera*, e coletadas e processadas por apicultores ou entrepostos localizados nas Regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste.

Os produtos foram recebidos, à temperatura ambiente, no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foram cadastrados e fracionados. Parcelas de cada amostra foram enviadas para o Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, onde foram armazenadas, também à temperatura ambiente, até o momento das análises. Esta etapa foi realizada em parceria com os pesquisadores Dra Ortrud Monika Barth e Alex da Silva de Freitas. As parcelas que permaneceram no Laboratório de Análise de Alimentos foram armazenadas, à temperatura de -4°C, até o momento das análises.

### **2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS**

Algumas horas antes do início dos ensaios, as amostras foram retiradas do congelador para que, à temperatura ambiente, fossem trituradas em moinho analítico até granulometria de 0,595 mm. Este procedimento não foi realizado para a análise polínica.

## 2.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

### 2.3.1 Métodos de extração

#### 2.3.1.1 Etanol a 70%

Os extratos a base de etanol (Grau P.A., Synth) a 70% foram preparados conforme o método descrito por Carpes *et al.* (2007), com algumas modificações. Este procedimento foi detalhado no Capítulo 4 (Material e Métodos, item 2.3). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

#### 2.3.1.2 Metanol a 50% e acetona a 70%

Esta extração foi realizada conforme procedimento descrito por Rufino *et al.* (2010). 2 g amostra foram medidas em *erlenmeyer* e a este foram adicionados 40 mL de metanol (Grau P.A., Synth) a 50%. O conteúdo foi submetido à agitação, em agitador magnético, por 1 h, temperatura ambiente e abrigo da luz. Barras magnéticas foram utilizadas para a agitação ajustada em 250 rpm. Em seguida, o extrato foi transferido para tubos tipo Falcon, centrifugado (7.500 rpm, 15 min.) e o sobrenadante transposto para um balão volumétrico de 100 mL. O sedimento foi recolhido para o *erlenmeyer*, adicionados 40 mL de acetona (Grau P.A., Synth) a 70% e realizada nova extração, a qual foi seguida de centrifugação sob as condições já descritas. O sobrenadante foi transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro extrato e o volume ajustado com água deionizada. Por fim, o conteúdo do balão foi transferido para frasco âmbar e armazenado à temperatura de 0°C. As extrações foram realizadas em triplicata.

#### 2.3.1.3 Éter etílico, etanol e água

A extração sequencial foi realizada com solventes de diferentes polaridades e, para tal, foi adotado o procedimento descrito por Carvalho *et al.* (2012). 40 mL de éter etílico (Grau P.A., Synth) foram adicionados a *erlenmeyer* contendo 2 g de amostra e a mistura submetida a agitação, em agitador magnético, por 1 h com rotação ajustada em 250 rpm, temperatura ambiente e abrigo da luz. Para a agitação

foram utilizadas barras magnéticas. Em seguida, o extrato foi filtrado com papel qualitativo (porosidade: 3 micras), o volume ajustado para 40 mL com o éter etílico P.A. e extrato transferido para frasco âmbar. O resíduo da filtração foi recolhido do papel filtro para o *erlenmeyer*, adicionados 40 mL de etanol e a extração realizada sob as condições anteriores. O extrato foi filtrado (papel qualitativo, porosidade: 3 micras), o volume ajustado para 40 mL com etanol P.A. e transferido para outro frasco âmbar. Então, o resíduo foi novamente recolhido do papel filtro para o *erlenmeyer*, adicionados 40 mL de água deionizada e a terceira extração realizada sob as condições adotadas anteriormente. Por fim, o extrato foi transferido para tubos tipo Falcon, centrifugado (7.500 rpm, 15 min.), o sobrenadante ajustado para 40 mL com água deionizada e armazenado em um terceiro frasco âmbar. Os extratos foram armazenados à temperatura de 0°C. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

### **2.3.2 Capacidade de redução do radical DPPH – Capacidade antioxidante**

Para determinar a capacidade antioxidante das amostras foi adotado o método DPPH descrito por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações. O procedimento de análise, cálculo do percentual de descoloração e construção da curva analítica de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox) foram descritos, detalhadamente, no Capítulo 4 (Material e Métodos, item 2.7.1). Os resultados foram expressos em EC<sub>50</sub> e em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (ET) por g de pólen apícola desidratado (em base seca), sendo que, para a extração sequencial, a soma dos resultados dos três extratos (etéreo, alcoólico e aquoso) foi considerada a capacidade antioxidante.

## **2.4 PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR**

Os parâmetros instrumentais de cor das amostras foram determinados em colorímetro ColorQuest XE (CQX 2329, Hunterlab) com Software Universal V4.10. Os resultados foram expressos em valores das coordenadas L\*, a\*, b\* e Chroma. O procedimento de análise e o cálculo do Chroma foram descritos em detalhes no Capítulo 4 (Material e Metodos, item 2.15).

## 2.5 ANÁLISE POLÍNICA

Os procedimentos descritos por Barth *et al.*, (2010) foram utilizados para o preparo das amostras e análise em microscópio de luz fotônica. A partir de informações catalogadas, os tipos polínicos foram identificados e designados pelo táxon ao qual se assemelhavam (BARTH, 1970a; BARTH, 1970b; BARTH, 1970c; BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002). O procedimento utilizado foi descrito, detalhadamente, no Capítulo 2 (Material e Métodos, item 2.2).

## 2.6 TRATAMENTO DOS DADOS

Os resultados experimentais foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O teste t de *Student* para amostras independentes (pólen apícola monofloral *versus* heterofloral) ou *one-way* ANOVA (comparação entre regiões ou métodos de extração) seguida de teste de *Tukey* foram utilizados para comparar as médias entre os grupos. A homocedasticidade foi previamente verificada pelo teste *F* (duas variâncias) ou pelo teste *Brown-Forsythe* ( $n \geq 3$  variâncias). Quando necessário, foi utilizado o teste de *Welch-ANOVA* para dados de comportamento heterocedástico. Quaisquer valores de p abaixo de 5% foram considerados estatisticamente significativos (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014).

A análise de componentes principais (*principal component analysis - PCA*) e a análise de agrupamento hierárquico (*hierarchical cluster analysis - HCA*) foram utilizadas para estudar a estrutura de dados e procurar por padrões, nos parâmetros instrumentais de cor e na capacidade antioxidante das amostras de pólen apícola desidratado pelos diferentes métodos de extração, de acordo com a região onde foram produzidas (Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste) e a origem botânica. Amostras ( $n=64$ ) foram inseridas em linhas e variáveis de resposta ( $n=10$ ) em colunas, totalizando 640 pontos. A *HCA* foi utilizada para mostrar a associação multivariada entre as respostas. O método de Ward e distâncias Euclidianas foi utilizado para gerar um dendrograma das variáveis (ZIELINSKI *et al.*, 2014). Os dados foram auto-escalonados antes da análise.

Para classificar as amostras de acordo com a região onde foram produzidas e com a origem botânica, a análise discriminante pelo método dos mínimos

quadrados parciais (*partial least squares-discriminant analysis* - *PLS-DA*) foi aplicada utilizando o *software* Chemoface v. 2.5 (UFLA, Brasil). O desempenho dos modelos *PLSDA* foi validada, internamente, utilizando abordagem do teste *leave-one-out*. O algoritmo Kennard-Stone foi utilizado para validar, externamente, os modelos *PLSDA*. Para este propósito, os resultados foram divididos em grupo-teste (75% das amostras) e grupo de validação (25% das amostras) (ZIELINSKI *et al.*, 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise polínica foram identificados 39 táxons: as espécies *Cocos nucifera*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *M. scabrella* e *M. verrucosa*, os gêneros *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Cecropia*, *Brassica*, *Eupatorium*, *Anadenanthera*, *Piper*, *Ilex*, *Alternanthera*, *Montanoa*, *Syagrus*, *Schinus*, *Vernonia*, *Astrocaryum*, *Elephantopus*, *Sebastiania*, *Coffea*, *Machaerium*, *Ricinus*, *Antigonon*, *Astronium*, *Baccharis* e *Richardia* e outros tipos polínicos das famílias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Arecaceae*, *Anacardiaceae*, *Poaceae*, *Apiaceae*, *Cyperaceae*, *Loranthaceae*, *Malvaceae*, *Melastomataceae*, *Myrtaceae* e *Rubiaceae*. 27 amostras foram classificadas como monoflorais e 37 amostras foram classificadas como heteroflorais.

Campos *et al.* (2008), Carpes *et al.* (2008) e LeBlanc *et al.* (2009) sugeriram que o potencial antioxidante do pólen apícola esteja relacionado a origem botânica do produto. Para comprovar esta hipótese são necessários estudos para identificar a correlação entre tipos polínicos e capacidade antioxidante ou entre tipos polínicos e compostos bioativos, como polifenóis, vitamina E, vitamina C e  $\beta$ -caroteno, que, de acordo com Campos *et al.* (2008), Oliveira *et al.* (2009) e Melo e Almeida-Muradian (2010), são substâncias de ação antioxidante. Menezes *et al.* (2010) observaram correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e o gênero *Eucalyptus* e correlação negativa deste teor com a espécie *Mimosa pudica*. Arruda (2013) observou correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e os tipos polínicos *Anadenanthera*, *Eucalyptus* e *Schinus*, e correlação negativa com os táxons *M. scabrella* e *C. nucifera*. Os tipos polínicos estudados por Arruda (2013) foram, também, observados no presente estudo. Sattler (2013) identificou correlação positiva entre o teor de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e os gêneros *Montanoa* e *Euterpe* em amostras de pólen apícola produzidas na Região Sul do Brasil.

A capacidade de sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi tomada como indicador da capacidade antioxidante (CA) das amostras. A extração a base de etanol a 70% (EtOH70) já foi, previamente, relatada em estudos com pólen apícola desidratado (CARPES *et al.*, 2008; CARPES *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2010; ARRUDA, 2013; CARPES *et al.*, 2013), mas informação a respeito do uso de extração sequencial (EtSe) a base de éter etílico, etanol e água ou de extração a base de metanol a 50% e acetona a 70% (MeOH50+Ac70), nesta matriz alimentícia, não foi encontrada. Na Tabela 1 é apresentada a CA dos extratos, onde EtSe corresponde a soma dos resultados dos extratos etéreo (EtE), alcoólico (EtOH) e aquoso (EtA).

**Tabela 1.** Capacidade antioxidante de amostras monoflorais e heteroflorais de pólen apícola desidratado após extração com diferentes solventes.

Classificação*	Amostra	Capacidade antioxidante ( $\mu\text{mol ET/g}$ )**		
		EtOH70 <sup>1</sup>	EtSe <sup>2</sup>	MeOH50+Ac70 <sup>3</sup>
Monofloral	A1	29,44 $\pm$ 0,56	20,62 $\pm$ 0,29	41,42 $\pm$ 1,89
	A2	25,61 $\pm$ 1,30	13,91 $\pm$ 0,40	29,59 $\pm$ 0,41
	C1	150,95 $\pm$ 1,48	66,97 $\pm$ 2,00	161,11 $\pm$ 1,18
	C2	114,47 $\pm$ 1,34	81,21 $\pm$ 0,71	165,38 $\pm$ 2,14
	E3	133,33 $\pm$ 4,16	126,52 $\pm$ 2,48	199,31 $\pm$ 2,18
	E7	54,39 $\pm$ 1,35	78,76 $\pm$ 4,74	87,90 $\pm$ 5,67
	G3	39,93 $\pm$ 0,63	22,68 $\pm$ 0,20	33,54 $\pm$ 0,83
	G5	30,85 $\pm$ 0,28	24,49 $\pm$ 0,94	42,71 $\pm$ 0,46
	I2	9,97 $\pm$ 0,35	6,14 $\pm$ 0,05	10,99 $\pm$ 0,16
	J1	71,57 $\pm$ 1,79	35,84 $\pm$ 0,94	50,78 $\pm$ 0,63
	K2	40,06 $\pm$ 0,79	17,06 $\pm$ 0,12	29,38 $\pm$ 0,47
	L2	110,85 $\pm$ 1,35	25,34 $\pm$ 4,60	145,28 $\pm$ 1,87
	L3	102,71 $\pm$ 0,42	88,33 $\pm$ 3,34	97,45 $\pm$ 3,45
	M1	63,77 $\pm$ 1,30	54,07 $\pm$ 1,15	61,81 $\pm$ 1,49
	M2	31,09 $\pm$ 0,98	38,76 $\pm$ 3,13	39,08 $\pm$ 1,80
	N1	36,09 $\pm$ 1,60	21,92 $\pm$ 0,51	14,28 $\pm$ 0,47
	O1	57,35 $\pm$ 4,35	21,16 $\pm$ 1,29	36,42 $\pm$ 0,52
	P1	15,95 $\pm$ 0,11	12,49 $\pm$ 0,12	19,41 $\pm$ 0,25
	Q1	20,76 $\pm$ 0,58	22,45 $\pm$ 0,58	19,59 $\pm$ 1,04
	S3	18,38 $\pm$ 0,34	11,78 $\pm$ 0,08	14,18 $\pm$ 0,62
S4	15,55 $\pm$ 0,33	10,53 $\pm$ 0,31	14,08 $\pm$ 0,49	
S6	12,75 $\pm$ 1,15	11,88 $\pm$ 0,34	15,34 $\pm$ 0,30	
S7	26,81 $\pm$ 0,58	23,44 $\pm$ 0,86	34,35 $\pm$ 1,01	
T1	31,60 $\pm$ 0,02	22,25 $\pm$ 0,54	28,05 $\pm$ 0,71	
U1	26,31 $\pm$ 1,12	18,48 $\pm$ 0,40	28,15 $\pm$ 0,03	
V1	9,43 $\pm$ 0,37	11,04 $\pm$ 0,38	19,42 $\pm$ 0,81	
AC1	24,48 $\pm$ 0,78	30,34 $\pm$ 0,76	23,72 $\pm$ 0,85	
	<b>Máximo</b>	<b>150,95 <math>\pm</math> 1,48</b>	<b>126,52 <math>\pm</math> 2,48</b>	<b>199,31 <math>\pm</math> 2,18</b>
	<b>Mínimo</b>	<b>9,43 <math>\pm</math> 0,37</b>	<b>6,14 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>10,99 <math>\pm</math> 0,16</b>
	<b>Média</b>	<b>40,83 <math>\pm</math> 29,57</b>	<b>29,34 <math>\pm</math> 21,43</b>	<b>46,42 <math>\pm</math> 39,49</b>

(Continua)

Tabela 1. Continuação...

Classificação*	Amostra	Capacidade antioxidante ( $\mu\text{mol ET/g}$ )**		
		EtOH70 <sup>1</sup>	EtSe <sup>2</sup>	MeOH50+Ac70 <sup>3</sup>
Heterofloral	C3	94,78 $\pm$ 1,26	55,57 $\pm$ 1,20	156,48 $\pm$ 2,15
	D1	63,90 $\pm$ 0,51	56,85 $\pm$ 0,95	98,78 $\pm$ 5,57
	D3	31,72 $\pm$ 0,75	29,70 $\pm$ 2,20	40,56 $\pm$ 0,44
	E1	19,10 $\pm$ 0,75	14,89 $\pm$ 0,45	24,20 $\pm$ 0,11
	E2	139,70 $\pm$ 4,53	138,89 $\pm$ 1,21	198,85 $\pm$ 8,80
	E4	88,17 $\pm$ 1,23	59,66 $\pm$ 1,34	100,17 $\pm$ 5,59
	E5	53,50 $\pm$ 1,86	83,84 $\pm$ 0,55	96,15 $\pm$ 1,48
	E6	36,19 $\pm$ 0,83	23,33 $\pm$ 0,67	35,70 $\pm$ 2,60
	F2	24,50 $\pm$ 1,11	14,12 $\pm$ 0,32	25,07 $\pm$ 0,78
	G1	16,41 $\pm$ 0,73	13,87 $\pm$ 0,39	18,44 $\pm$ 1,18
	G2	22,40 $\pm$ 1,10	10,40 $\pm$ 0,46	21,85 $\pm$ 0,88
	G4	14,11 $\pm$ 0,25	8,92 $\pm$ 0,09	19,10 $\pm$ 1,16
	G6	39,10 $\pm$ 0,39	28,76 $\pm$ 0,97	42,08 $\pm$ 0,58
	G7	33,28 $\pm$ 0,44	16,46 $\pm$ 0,46	24,78 $\pm$ 2,39
	G8	28,86 $\pm$ 0,68	18,82 $\pm$ 0,56	31,45 $\pm$ 0,65
	G9	23,24 $\pm$ 0,12	17,04 $\pm$ 0,21	28,41 $\pm$ 1,24
	G10	29,20 $\pm$ 0,31	25,80 $\pm$ 0,17	39,95 $\pm$ 0,16
	G11	38,99 $\pm$ 0,16	32,79 $\pm$ 0,16	48,18 $\pm$ 1,53
	H1	154,73 $\pm$ 4,53	50,18 $\pm$ 4,78	98,72 $\pm$ 1,68
	I1	19,54 $\pm$ 0,30	18,70 $\pm$ 0,31	29,20 $\pm$ 1,36
	K1	42,17 $\pm$ 0,83	38,45 $\pm$ 1,81	55,36 $\pm$ 1,02
	K3	31,52 $\pm$ 0,81	22,19 $\pm$ 0,08	33,15 $\pm$ 1,38
	K4	45,24 $\pm$ 0,58	34,66 $\pm$ 4,50	77,49 $\pm$ 1,23
	L1	53,83 $\pm$ 1,60	48,93 $\pm$ 2,11	73,93 $\pm$ 3,06
	R1	32,88 $\pm$ 0,28	25,37 $\pm$ 0,60	39,40 $\pm$ 1,29
	S1	19,88 $\pm$ 0,31	13,90 $\pm$ 0,06	20,41 $\pm$ 0,78
	S2	41,13 $\pm$ 0,53	29,28 $\pm$ 0,76	49,42 $\pm$ 3,25
	S5	10,14 $\pm$ 0,16	8,06 $\pm$ 0,14	10,91 $\pm$ 0,62
	X1	11,38 $\pm$ 0,41	6,79 $\pm$ 0,14	38,17 $\pm$ 0,44
	Z1	36,17 $\pm$ 0,18	28,84 $\pm$ 0,14	52,27 $\pm$ 1,57
	AA1	20,85 $\pm$ 0,79	21,86 $\pm$ 0,28	31,49 $\pm$ 0,75
	AA2	58,04 $\pm$ 1,78	72,12 $\pm$ 1,64	92,99 $\pm$ 4,52
AB1	81,23 $\pm$ 1,59	65,42 $\pm$ 1,73	89,89 $\pm$ 6,95	
AC2	35,04 $\pm$ 0,27	27,88 $\pm$ 1,18	34,18 $\pm$ 2,62	
AC3	35,64 $\pm$ 0,42	30,26 $\pm$ 0,33	42,78 $\pm$ 1,33	
AD1	31,18 $\pm$ 0,23	26,91 $\pm$ 0,76	52,50 $\pm$ 2,45	
AD2	26,29 $\pm$ 1,19	29,08 $\pm$ 0,15	34,48 $\pm$ 1,58	
	<b>Máximo</b>	<b>154,73 <math>\pm</math> 4,53</b>	<b>138,89 <math>\pm</math> 1,21</b>	<b>198,85 <math>\pm</math> 8,80</b>
	<b>Mínimo</b>	<b>10,14 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>6,79 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>10,91 <math>\pm</math> 0,62</b>
	<b>Média</b>	<b>48,27 <math>\pm</math> 39,33</b>	<b>39,86 <math>\pm</math> 33,83</b>	<b>59,90 <math>\pm</math> 49,17</b>
	<b>Média geral</b>	<b>45,13 <math>\pm</math> 35,48</b>	<b>35,42 <math>\pm</math> 29,52</b>	<b>54,21 <math>\pm</math> 45,50</b>

\*Classificação com base na frequência dos tipos polínicos identificados na amostra.

\*\* $\mu\text{mol ET/g}$ :  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por g de pólen apícola desidratado

<sup>1</sup>EtOH70: etanol a 70%;

<sup>2</sup>EtSe: extração sequencial com éter etílico, etanol e água;

<sup>3</sup>MeOH50+Ac70: metanol a 50% e acetona a 70%.

A análise estatística dos dados indicou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os métodos de extração. A média dos extratos MeOH50+Ac70 foi de  $54,21 \pm$

45,50  $\mu\text{mol ET/g}$ , dos extratos EtOH70 foi de  $45,13 \pm 35,48 \mu\text{mol ET/g}$ , e da EtSe foi de  $35,42 \pm 29,52 \mu\text{mol ET/g}$  de pólen apícola desidratado. Entre as médias de MeOH50+Ac70 e EtOH70 não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ), entre MeOH50+Ac70 e EtSe houve diferença ( $p<0,05$ ) e entre as médias de EtOH70 e EtSe não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). Embora a média das extrações MeOH50+Ac70 e EtOH70 indique que os métodos são estatisticamente iguais, uma análise individual de cada produto deve ser considerada. Em 70% das amostras, o método a base de MeOH50+Ac70 foi o mais eficiente e em outras 27% foi com o método a base de EtOH70 que os maiores valores de CA foram observados.

A hipótese de que o método de extração sequencial (EtSe), com solventes de baixa, intermediária e alta polaridade, seria o mais eficiente foi confirmada apenas nas amostras Q1 e AC1, que representam 3% do total de produtos analisados. A CA nos extratos EtE variou de  $0,29 \pm 0,03$  a  $6,85 \pm 0,25 \mu\text{mol ET/g}$ , nos extratos EtOH de  $3,60 \pm 0,04$  a  $129,93 \pm 1,82 \mu\text{mol ET/g}$  e nos extratos EtA variou de  $1,49 \pm 0,15$  a  $18,22 \pm 0,16 \mu\text{mol ET/g}$ .

A maior CA dos extratos MeOH50+Ac70 pode estar relacionada à características físico-químicas dos compostos bioativos presentes nestas 64 amostras de pólen apícola desidratado e, conseqüentemente, com à afinidade entre cada substância e os diferentes extratores. LeBlanc *et al.* (2009), que realizaram um estudo de comparação entre oito solventes de diferentes polaridades (água, metanol, etanol, propanol, 2-propanol, acetona, dimetilformamida e acetonitrila) para a extração de pólen apícola, concluíram que as extrações a base de metanol e de dimetilformamida foram os procedimentos mais eficientes para determinar da CA pelo método DPPH.

É necessário considerar, também, que a quantidade de cada composto bioativo na amostra pode ter influenciado nos resultados. Sabe-se que compostos como  $\beta$ -caroteno e vitamina E tem alta afinidade por solventes de baixa polaridade, portanto, é esperado que sejam extraídos com solventes como o éter etílico. Assim, a baixa CA dos extratos EtE pode ser um reflexo do baixo teor destes compostos nas amostras. Ademais, a temperatura aplicada durante cada procedimento também pode explicar variações entre métodos de extração. Carpes *et al.* (2007), que propuseram o método a base de EtOH70 utilizado em vários outros estudos, indicaram a extração dos compostos sob temperatura de  $70^{\circ}\text{C}$ , porém, os autores não citam se outras condições foram analisadas. Bajerová *et al.* (2014), que

avaliaram diferentes métodos de extração de compostos antioxidantes em plantas, observaram que o emprego de temperaturas acima de 60°C pode resultar em degradação de alguns compostos.

Além de variações na CA de acordo com o método de extração, houve, também, grande variação entre as amostras. No geral, o menor valor encontrado foi de  $6,14 \pm 0,05$   $\mu\text{mol ET/g}$ , na amostra I2, e o maior valor foi de  $199,31 \pm 2,18$   $\mu\text{mol ET/g}$ , na amostra E3. Em todos os trabalhos consultados, a CA pelo método DPPH foi apresentada em percentual de descoloração ou em  $\text{EC}_{50}$  (*effective concentration* 50), ou seja, em concentração de amostra (mg/mL de extrato) necessária para reduzir 50% do radical. Para uma correta comparação entre estudos, todos os dados devem estar na mesma unidade. Os valores de  $\text{EC}_{50}$  dos extratos a base de EtOH70 serão utilizados para comparação porque, em média, foram estatisticamente iguais aos observados nos outros dois métodos de extração.

O  $\text{EC}_{50}$  dos extratos EtOH70 variou de  $0,38 \pm 0,02$  a  $7,91 \pm 0,04$  mg/mL. Carpes *et al.* (2008), que avaliaram a CA de extratos EtOH70 de 36 amostras de pólen apícola da Região Sul do Brasil, observaram  $\text{EC}_{50}$  variando de 0,80 a 4,69 mg/mL, com um valor médio de 1,92 mg/mL. Chantarudee *et al.* (2012), ao realizarem uma extração a base de metanol a 50%, em amostras de pólen apícola coletadas na Tailândia, observaram  $\text{EC}_{50}$  médio de 0,43 mg/mL de extrato. Arruda (2013) observou  $\text{EC}_{50}$  de 0,35 a 13,42 mg/mL em extratos EtOH70 de pólen apícola coletado nas Regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste.

Sousa, Vieira e Lima (2011) analisaram extratos etanólicos (etanol a 20%) de resíduos de polpas de *Malpighia glabra* L. (acerola) e observaram  $\text{EC}_{50}$  de 0,31 a 0,39 mg/mL. Huang *et al.* (2012) analisaram extratos metanólicos (metanol a 80%) de frutas vermelhas cultivadas em Nanjing/China. Estas frutas são apontadas como de elevada capacidade antioxidante e, no estudo em questão, os autores observaram  $\text{EC}_{50}$  de 0,42 mg/mL para *Vaccinium ashei* cv. Brightwell (mirtilo), 0,42 mg/mL para *Rubus laciniatus* cv. Hull (amora-americana) e de 0,81 mg/mL para *Fragaria x ananassa* cv. Toyonoka (morango). Alguns dos valores de CA observados no presente estudo assemelham-se a estes.

Campos *et al.* (2003) identificaram influência da origem botânica sobre a capacidade antioxidante de amostras de pólen apícola coletadas em Portugal e Nova Zelândia. Os autores sugeriram que os compostos fenólicos sejam as principais substâncias antioxidantes presentes nesta matriz alimentícia. Além disso,

é possível que os perfis fenólicos/flavonóides sejam espécie-específicos e que cada composto em particular tenha um potencial intrínscico para desativar espécies reativas.

O menor valor de CA em extratos EtOH70 foi observado na amostra V1 ( $9,43 \pm 0,37 \mu\text{mol ET/g}$ ), monofloral de *C. nucifera*, coletada no Estado da Bahia; enquanto o maior valor foi observado na amostra H1 ( $154,73 \pm 4,53 \mu\text{mol ET/g}$ ), heterofloral com predominância do táxon *M. scabrella* e menor participação do táxon *Brassica*, coletada no Estado do Paraná. Entre os extratos EtSe, o menor valor foi observado na amostra I2 ( $6,14 \pm 0,05 \mu\text{mol ET/g}$ ), uma monofloral de *C. nucifera*, coletada na Bahia; e o maior valor na amostra E2 ( $138,89 \pm 1,21 \mu\text{mol ET/g}$ ), uma heterofloral produzida no Estado da Bahia, com predominância do táxon *Eucalyptus* e participação dos táxons *M. caesalpiniaefolia* e *C. nucifera*. Quanto aos extratos MeOH50+Ac70, o menor valor de CA foi encontrado na amostra S5 ( $10,91 \pm 0,62 \mu\text{mol ET/g}$ ), um pólen apícola desidratado coletado em São Paulo, com predominância do tipo polínico *Alternanthera* e pequena participação de *Vernonia*; enquanto o maior valor foi observado na amostra E3 ( $199,31 \pm 2,18 \mu\text{mol ET/g}$ ), um produto monofloral de *Eucalyptus*, produzido na Bahia.

O gênero *Eucalyptus* esteve presente não só nas amostras de maior valor de CA pelos métodos EtSe e MeOH50+Ac70. Nota-se que três das sete amostras com CA acima de  $100 \mu\text{mol ET/g}$  nos extratos EtOH70 (C1, E3, E2), cinco das sete amostras com acima deste teor nos extratos MeOH50+Ac70 (C1, C3, E2, E3, E4) e as duas amostras com CA também acima de  $100 \mu\text{mol ET/g}$  nas extrações EtSe (E2, E3), tinham o gênero *Eucalyptus* entre os táxons identificados. Nos gráficos de escores PC1 versus PC2 gerados na análise de componentes principais, citada mais a frente, é possível ver que amostras com ocorrência deste gênero estão distribuídas nas regiões de maior CA (Figura 4).

No Capítulo 4 foi discutida a correlação entre alguns táxons e características físico-químicas e potencial biológico de amostras monoflorais de pólen apícola desidratado, mas não houve um número mínimo ( $n=3$ ) de amostras monoflorais de *Eucalyptus* para que a influência deste táxon fosse investigada. Arruda (2013) identificou correlação negativa entre os resultados do DPPH e o gênero *Eucalyptus*, portanto a influência deste táxon na CA do pólen apícola desidratado deve ser melhor investigada, considerando, inclusive, possíveis variações na composição do pólen de eucalipto relacionadas a região.

Quando agrupadas em monoflorais e heteroflorais, a média da CA dos extratos (EtOH70: 40,83 x 48,27  $\mu\text{mol ET/g}$ ; EtSe: 29,34 x 39,86  $\mu\text{mol ET/g}$ ; MeOH50+Ac70: 46,42 x 59,90  $\mu\text{mol ET/g}$ ; monoflorais x heteroflorais) sugere que o produto heterofloral tem maior ação, mesmo que a análise estatística dos dados tenha indicado que entre estas médias não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). Por outro lado, quando as amostras foram agrupadas por Regiões, foram identificadas variações significativas entre os grupos. O valor médio da CA foi maior nas amostras da Região Sul (SU) e entre as demais Regiões não houve diferença significativa, embora os valores indiquem uma menor CA em amostras das Regiões Sudeste (SE) e Centro-Oeste (CO) em relação as amostras da Região Nordeste (NE) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Comparação entre capacidade antioxidante e parâmetros instrumentais de cor entre amostras de pólen apícola desidratado agrupadas por Regiões brasileiras onde foram produzidas.

Região*	EtOH70	EtSe	MeOH50+ Ac70	L*	a*	b*	Chroma
NO (n=20)	43,03 $\pm$ 37,40 <sup>b</sup>	39,93 $\pm$ 38,90 <sup>ab</sup>	57,61 $\pm$ 54,60 <sup>ab</sup>	68,60 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>	2,58 $\pm$ 1,28 <sup>c</sup>	37,19 $\pm$ 3,62 <sup>c</sup>	37,30 $\pm$ 3,66 <sup>b</sup>
SU (n=16)	75,57 $\pm$ 41,97 <sup>a</sup>	52,88 $\pm$ 29,48 <sup>a</sup>	85,82 $\pm$ 49,86 <sup>a</sup>	61,68 $\pm$ 3,84 <sup>b</sup>	7,08 $\pm$ 3,55 <sup>a</sup>	51,98 $\pm$ 6,23 <sup>a</sup>	52,53 $\pm$ 6,61 <sup>a</sup>
SE (n=25)	28,37 $\pm$ 11,68 <sup>b</sup>	22,40 $\pm$ 10,78 <sup>b</sup>	33,45 $\pm$ 18,21 <sup>b</sup>	61,03 $\pm$ 8,96 <sup>b</sup>	6,09 $\pm$ 3,59 <sup>b</sup>	43,19 $\pm$ 5,53 <sup>ab</sup>	43,72 $\pm$ 5,88 <sup>ab</sup>
CO (n=3)	36,49 $\pm$ 20,70 <sup>b</sup>	20,83 $\pm$ 8,18 <sup>b</sup>	36,03 $\pm$ 16,43 <sup>ab</sup>	62,92 $\pm$ 3,78 <sup>ab</sup>	7,04 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup>	43,27 $\pm$ 4,82 <sup>ab</sup>	43,92 $\pm$ 4,41 <sup>ab</sup>
Valor p <sup>1</sup>	0,015	0,013	0,002	<0,001	0,001	<0,001	<0,001

\*NO: Nordeste; SU: Sul; SE: Sudeste; CO: Centro-Oeste

<sup>1</sup>Valores de probabilidade obtidos por análise de variância (ANOVA) *One-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

Quanto aos parâmetros L\*, a\*, b\* e Chroma não houve diferença significativa entre os grupos monofloral e heterofloral, mas entre Regiões foram observadas variações significativas (Tabela 2). Os maiores valores de luminosidade (L\*) foram encontrados em NE e CO, embora entre esta última e as demais Regiões a diferença não tenha sido significativa ( $p>0,05$ ). Os maiores valores de a\* foram identificados em produtos de SU e CO, portanto, a tonalidade do vermelho foi mais pronunciada nestas amostras. Quanto a coordenada b\* e o Chroma, os maiores valores foram observados em amostras de SU, embora estes tenham sido estatisticamente iguais aos valores de SE e CO. Pode-se dizer que as maiores tonalidades de amarelo foram observadas nas amostras de SU. Na Tabela 3 são apresentados os parâmetros instrumentais de cor (PIC) de todas as amostras.

**Tabela 3.** Parâmetros instrumentais de cor de amostras monoflorais e heteroflorais de pólen apícola desidratado.

Classificação	Amostra	Parâmetros Instrumentais de Cor <sup>1</sup>				
		L*	a*	b*	Chroma	
Monofloral	A1	65,61 ± 0,37	5,02 ± 0,27	37,45 ± 0,44	37,80 ± 0,47	
	A2	67,99 ± 0,54	4,07 ± 0,07	35,37 ± 0,26	35,61 ± 0,26	
	C1	60,21 ± 0,59	5,65 ± 0,29	53,00 ± 0,52	53,30 ± 0,44	
	C2	60,30 ± 0,78	5,82 ± 0,31	55,40 ± 0,35	55,70 ± 0,26	
	E3	67,76 ± 0,41	2,74 ± 0,16	38,92 ± 0,15	39,02 ± 0,16	
	E7	69,01 ± 0,48	2,98 ± 0,25	38,75 ± 0,27	38,87 ± 0,29	
	G3	67,06 ± 0,56	3,44 ± 0,26	40,05 ± 0,20	40,20 ± 0,22	
	G5	66,87 ± 0,22	3,19 ± 0,21	40,17 ± 0,18	40,30 ± 0,20	
	I2	71,69 ± 0,38	1,14 ± 0,08	31,51 ± 0,19	31,53 ± 0,20	
	J1	59,79 ± 0,01	9,11 ± 0,04	54,49 ± 0,45	55,25 ± 0,43	
	K2	63,81 ± 0,22	4,32 ± 0,05	44,31 ± 0,41	44,52 ± 0,41	
	L2	62,68 ± 0,17	5,86 ± 0,07	48,26 ± 0,15	48,62 ± 0,16	
	L3	60,85 ± 0,48	5,01 ± 0,21	42,04 ± 0,08	42,34 ± 0,08	
	M1	68,62 ± 0,63	2,16 ± 0,20	38,65 ± 0,18	38,72 ± 0,19	
	M2	68,90 ± 0,55	1,28 ± 0,10	39,63 ± 0,25	39,65 ± 0,26	
	N1	62,56 ± 0,22	8,72 ± 0,07	56,53 ± 0,09	57,20 ± 0,10	
	O1	64,57 ± 0,24	5,55 ± 0,03	42,23 ± 0,18	42,60 ± 0,18	
	P1	58,59 ± 0,26	10,03 ± 0,14	39,05 ± 0,43	40,32 ± 0,45	
	Q1	71,82 ± 0,28	1,48 ± 0,07	34,85 ± 0,14	34,89 ± 0,14	
	S3	48,97 ± 0,02	10,65 ± 0,15	44,77 ± 0,14	46,02 ± 0,14	
	S4	51,58 ± 0,09	9,05 ± 0,06	48,79 ± 0,74	49,62 ± 0,74	
	S6	49,84 ± 0,20	10,60 ± 0,04	48,24 ± 0,12	49,39 ± 0,12	
	S7	66,81 ± 0,36	2,80 ± 0,22	41,17 ± 0,10	41,27 ± 0,12	
	T1	65,01 ± 0,26	3,71 ± 0,16	36,93 ± 0,35	37,12 ± 0,37	
	U1	70,40 ± 0,54	1,37 ± 0,13	36,78 ± 0,06	36,81 ± 0,06	
	V1	71,67 ± 0,18	1,29 ± 0,05	33,94 ± 0,10	33,96 ± 0,10	
	AC1	54,39 ± 0,42	10,57 ± 0,18	48,16 ± 0,53	49,31 ± 0,53	
		<b>Máximo</b>	<b>71,82 ± 0,28</b>	<b>10,65 ± 0,15</b>	<b>56,53 ± 0,09</b>	<b>57,20 ± 0,10</b>
		<b>Mínimo</b>	<b>48,97 ± 0,02</b>	<b>1,14 ± 0,08</b>	<b>31,51 ± 0,19</b>	<b>31,53 ± 0,20</b>
		<b>Média</b>	<b>64,61 ± 6,06</b>	<b>4,72 ± 2,95</b>	<b>42,68 ± 7,51</b>	<b>43,01 ± 7,69</b>
	Heterofloral	C3	59,93 ± 0,58	7,21 ± 0,38	56,95 ± 0,73	57,40 ± 0,58
		D1	51,10 ± 0,49	8,47 ± 0,23	48,10 ± 1,01	48,84 ± 0,34
		D3	42,75 ± 1,82	11,27 ± 1,06	43,69 ± 1,96	45,12 ± 2,16
E1		70,85 ± 0,70	1,67 ± 0,15	35,20 ± 0,14	35,24 ± 0,15	
E2		66,05 ± 0,17	3,98 ± 0,14	47,53 ± 0,14	47,70 ± 0,13	
E4		65,81 ± 0,06	4,23 ± 0,21	40,77 ± 0,09	40,99 ± 0,09	
E5		64,86 ± 0,84	4,01 ± 0,37	41,58 ± 0,31	41,77 ± 0,28	
E6		64,86 ± 0,86	3,22 ± 0,24	37,64 ± 0,06	37,78 ± 0,06	
F2		69,86 ± 0,24	1,65 ± 0,10	34,95 ± 0,42	34,99 ± 0,42	
G1		70,45 ± 0,57	2,12 ± 0,21	35,33 ± 0,47	35,40 ± 0,48	
G2		72,35 ± 0,61	1,03 ± 0,08	34,35 ± 0,24	34,37 ± 0,24	
G4		65,73 ± 0,95	5,08 ± 0,36	43,13 ± 0,31	43,43 ± 0,30	
G6		68,63 ± 0,50	4,18 ± 0,27	51,06 ± 0,44	51,23 ± 0,46	
G7		71,07 ± 0,44	1,84 ± 0,17	36,52 ± 0,17	36,56 ± 0,18	
G8	70,02 ± 0,57	2,52 ± 0,17	37,20 ± 0,12	37,29 ± 0,13		
G9	70,65 ± 0,19	1,89 ± 0,06	36,73 ± 0,10	36,78 ± 0,10		
G10	69,18 ± 0,49	2,86 ± 0,02	38,10 ± 0,18	38,20 ± 0,18		
G11	70,84 ± 0,48	1,65 ± 0,05	35,80 ± 0,17	35,84 ± 0,17		

(Continua)

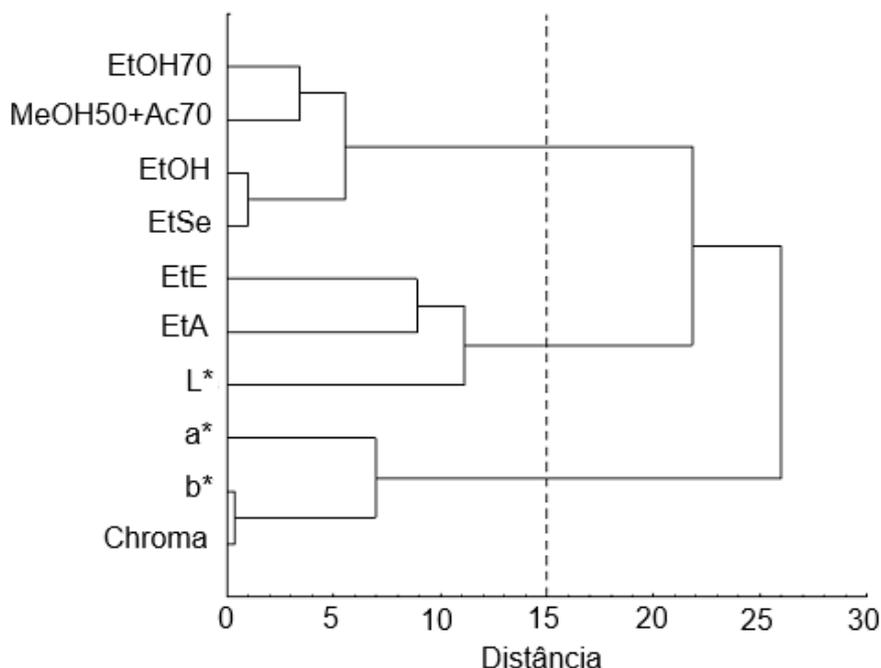
Tabela 3. Continuação...

Classificação	Amostra	Parâmetros Instrumentais de Cor <sup>1</sup>			
		L*	a*	b*	Chroma
Heterofloral	H1	63,73 ± 0,15	4,87 ± 0,08	49,85 ± 0,25	50,09 ± 0,25
	I1	68,74 ± 0,50	3,16 ± 0,15	36,71 ± 0,29	36,85 ± 0,31
	K1	68,06 ± 0,19	2,45 ± 0,03	43,93 ± 0,15	44,00 ± 0,15
	K3	63,80 ± 0,36	5,58 ± 0,32	45,05 ± 0,67	45,39 ± 0,70
	K4	68,48 ± 0,67	3,24 ± 0,29	48,16 ± 0,34	48,27 ± 0,35
	L1	51,82 ± 0,12	16,90 ± 0,14	60,19 ± 0,63	62,52 ± 0,64
	R1	70,33 ± 0,27	1,23 ± 0,07	31,72 ± 0,23	31,74 ± 0,24
	S1	63,60 ± 0,48	5,44 ± 0,21	40,16 ± 0,75	40,53 ± 0,77
	S2	57,76 ± 0,02	6,65 ± 0,14	44,09 ± 0,50	44,59 ± 0,52
	S5	48,07 ± 0,46	9,06 ± 0,14	45,12 ± 0,36	46,02 ± 0,38
	X1	72,16 ± 0,06	1,07 ± 0,15	34,98 ± 0,40	34,99 ± 0,40
	Z1	65,60 ± 0,40	5,54 ± 0,25	48,52 ± 1,40	48,84 ± 1,42
	AA1	61,60 ± 0,29	11,75 ± 0,21	63,18 ± 0,74	64,26 ± 0,73
	AA2	60,88 ± 0,31	7,75 ± 0,18	54,39 ± 0,61	54,94 ± 0,62
	AB1	58,33 ± 0,53	9,11 ± 0,28	56,02 ± 0,98	56,76 ± 1,01
	AC2	57,09 ± 0,30	9,07 ± 0,07	51,54 ± 0,55	52,33 ± 0,55
	AC3	57,34 ± 1,02	8,76 ± 0,22	51,51 ± 0,65	52,25 ± 0,60
	AD1	55,77 ± 0,54	10,53 ± 0,46	47,09 ± 0,74	48,26 ± 0,81
	AD2	57,89 ± 0,44	9,58 ± 0,21	48,87 ± 0,15	49,80 ± 0,18
		<b>Máximo</b>	<b>72,35 ± 0,61</b>	<b>16,90 ± 0,14</b>	<b>63,18 ± 0,74</b>
	<b>Mínimo</b>	<b>42,75 ± 1,82</b>	<b>1,03 ± 0,08</b>	<b>31,72 ± 0,23</b>	<b>31,74 ± 0,24</b>
	<b>Média</b>	<b>62,94 ± 7,49</b>	<b>5,70 ± 3,83</b>	<b>44,13 ± 7,57</b>	<b>44,59 ± 7,94</b>
	<b>Média geral</b>	<b>63,65 ± 6,93</b>	<b>5,28 ± 3,50</b>	<b>43,52 ± 7,52</b>	<b>43,93 ± 7,81</b>

<sup>1</sup>L\*: 0 (preto) a 100 (branco), a\*: - (verde) a + (vermelho); b\*: - (azul) a + (amarelo); C: Chroma (intensidade da cor)

De maneira geral, as amostras tenderam mais ao branco que ao preto (valor de L\* acima de 50 em 94% das amostras), ao vermelho que ao verde (valor a\* positivo em todas as amostras) e ao amarelo que ao azul (valor b\* positivo em todas as amostras). Este pode ser o primeiro trabalho em que a análise dos PIC foi realizada nesta matriz da maneira como foi preparada, visto que não foram encontrados estudos semelhantes. A determinação dos PIC foi uma tentativa de propor um protocolo rápido que sugerisse a capacidade antioxidante do pólen apícola desidratado pelo método DPPH.

A análise dos resultados indicou correlação positiva entre a coordenada b\* e a CA de todos os extratos, bem como entre os valores de Chroma e CA. Na Figura 1 é apresentada uma visão global das correlações entre todas as variáveis (PIC e CA de todos os extratos, inclusive os extratos EtE, EtOH e EtA) gerada pela análise de agrupamento hierárquico (HDA), enquanto na Tabela 4 são apresentados os valores das correlações entre as principais variáveis.



**Figura 1.** Análise de agrupamento hierárquico baseada nos parâmetros de cor e capacidade antioxidante de todos os extratos analisados.

**Tabela 4.** Valores de correlação entre a capacidade antioxidante de extratos etanólicos, metanólicos e extração sequencial e parâmetros instrumentais de cor de pólen apícola desidratado.

Variáveis resposta	EtOH70	EtSe	MeOH50+ Ac70	L*	a*	b*	C
<b>EtOH70</b>	1,0000 p= ---						
<b>EtSe</b>	0,8358 p=0,000	1,0000 p= ---					
<b>MeOH50+ Ac70</b>	0,9080 p=0,000	0,9173 p=0,000	1,0000 p= ---				
<b>L*</b>	-0,0696 p=0,585	-0,0589 p=0,644	-0,0570 p=0,654	1,0000 p= ---			
<b>a*</b>	0,0380 p=0,766	0,0400 p=0,754	0,0270 p=0,832	-0,8897 p=0,000	1,0000 p= ---		
<b>b*</b>	0,3867 p=0,002	0,3095 p=0,013	0,3628 p=0,003	-0,6071 p=0,000	0,7613 p=0,000	1,0000 p= ---	
<b>C</b>	0,3677 p=0,003	0,2953 p=0,018	0,3450 p=0,005	-0,6349 p=0,000	0,7896 p=0,000	0,9989 p=0,000	1,0000 p= ---

EtOH70: etanol a 70%; EtSe: extração sequencial com éter etílico, etanol e água; MeOH50+Ac70: metanol a 50% e acetona a 70%; L\*: luminosidade (0 a 100); a\*: verde (-) a vermelho (+); b\* azul (-) a amarelo (+); C: Chroma (intensidade da cor).

Considerando-se o índice de correlação de Pearson (RIEDER *et al.*, 2000), houve correlação média entre a CA dos extratos EtOH70 e a coordenada b\* ( $r=0,3867$ ,  $p=0,002$ ) e Chroma ( $r=0,3677$ ,  $p=0,003$ ), correlação fraca entre a CA das

extrações EtSe e  $b^*$  ( $r=0,3095$ ,  $p=0,013$ ) e Chroma ( $r=0,2953$ ,  $p=0,018$ ) e, ainda, correlação média entre a CA dos extratos MeOH50+Ac70 e  $b^*$  ( $r=0,3628$ ,  $p=0,003$ ) e Chroma ( $r=0,3450$ ,  $p=0,005$ ). Assim, a coordenada  $b^*$  e o Chroma poderiam ser utilizados para sugerir a CA de amostras de pólen apícola desidratado pelo método DPPH, embora não possam ser utilizados como único critério de seleção, visto que a correlação variou de fraca a média.

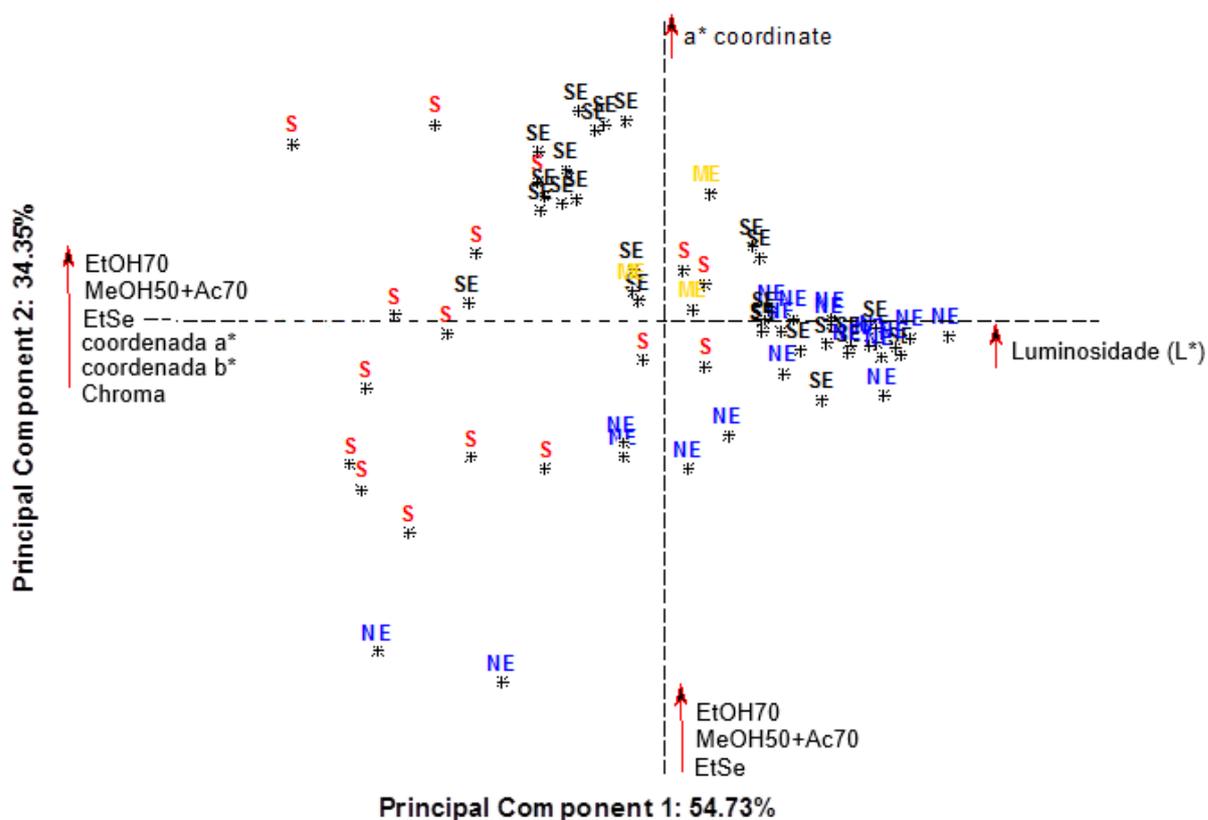
Uma correlação positiva quase perfeita foi identificada entre os valores de  $b^*$  e Chroma ( $r=0,9989$ ,  $p=0,00$ ), o que sugere que a intensidade da cor seja bastante influenciada por este parâmetro. Entre  $L^*$  e os demais PIC houve forte correlação negativa, de modo que quanto maior a intensidade da cor, principalmente quando a tonalidade tende ao vermelho, menor a luminosidade no pólen apícola desidratado. Já na apreciação visual das amostras trituradas e prontas para análise foi possível identificar a predominância da cor amarela. Em frutas, como manga e pêssego, esta cor está relacionada a presença de carotenoides (AMAYA-CRUZ *et al.*, 2015).

### 3.1 ANÁLISE MULTIVARIADA

Para uma discussão mais ampla dos resultados foi utilizada a análise de componentes principais (PCA), como análise exploratória dos dados, e a análise discriminante pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA), para classificar as amostras de acordo com a região onde foram produzidas e com a origem botânica. Nestas avaliações foram considerados, também, os dados de CA antioxidante dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso da extração sequencial.

Pela PCA foi possível avaliar o comportamento das amostras e grupos (monofloral  $\times$  heterofloral, regiões brasileiras e tipos polínicos), numa tentativa de identificar tendências. Nas Figuras 2, 3 e 4 é possível ver que os dois componentes principais explicaram 54,73% das variações no conjunto de dados. O componente principal 1 (34,35%) separou as amostras quanto as variáveis CA dos extratos EtOH70, CA dos extratos MeOH50+Ac70, CA das extrações EtSe, coordenada  $a^*$ , coordenada  $b^*$  e Chroma. O componente principal 2 (20,38%) discriminou as amostras pela CA dos três extratos principais e deslocou para o quadrante superior as amostras com as maiores medidas da coordenada  $a^*$ . A proximidade entre amostras indica comportamento similar quanto aos componentes principais.

Na Figura 2 é possível ver que 81% das amostras de SU e parte das amostras de SE estão distribuídas nos quadrantes à esquerda. Entre estes grupos, nota-se que os maiores valores de CA nos extratos estão nas amostras da SU, pois os dados estão dispersos mais a esquerda e no quadrante inferior. Em contrapartida, o conjunto SE aglomerado no quadrante superior esquerdo apresentou os maiores da coordenada  $a^*$ .



**Figura 2.** Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a Região de origem.

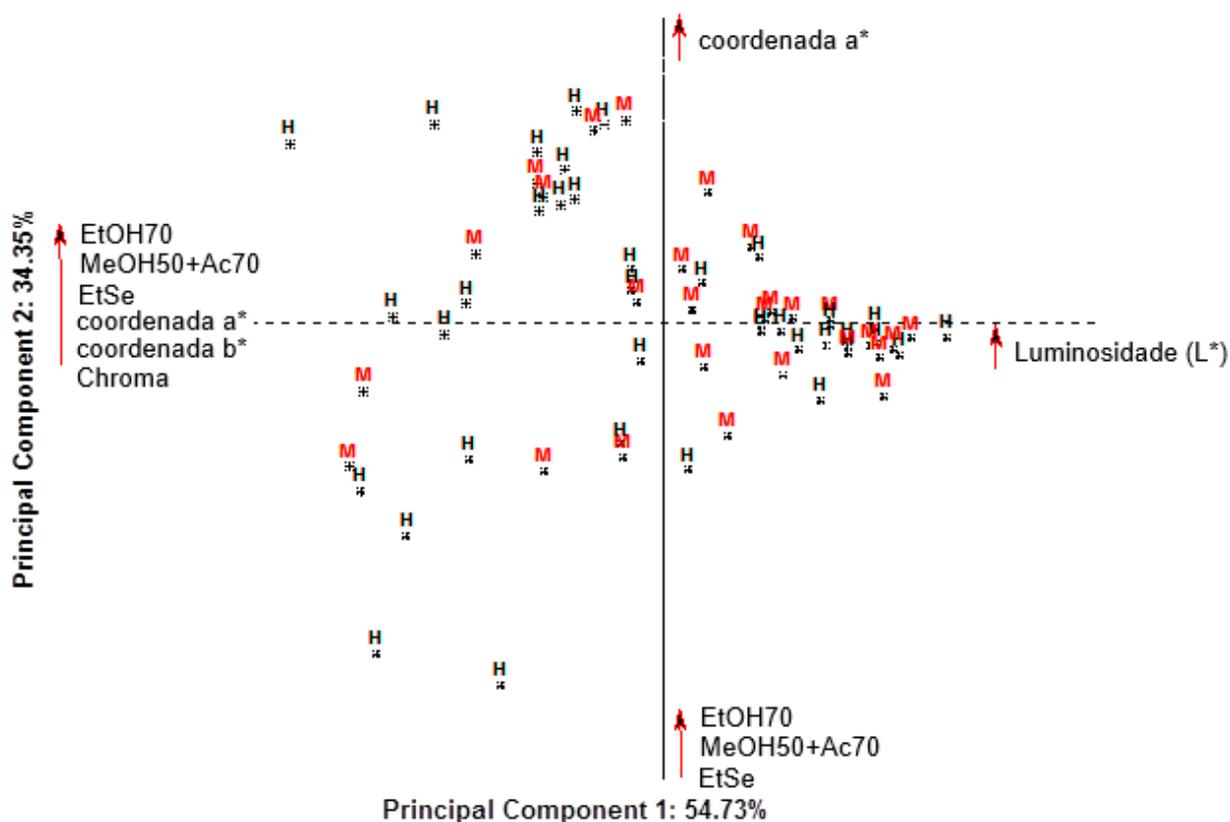
S: Sul (SU); SE: Sudeste (SE); NE: Nordeste (NE); ME: Centro-Oeste (CO)

As amostras da Região NE estão, em sua maioria (70%), aglomeradas no centro dos quadrantes localizados a direita do eixo y, característico dos maiores valores de  $L^*$ . Assim, as amostras desta Região claramente tendem a altos valores de  $L^*$  em relação as demais. Duas amostras de CO estão na parte superior do quadrante direito e uma na parte superior do quadrante esquerdo, portanto são amostras com características distintas.

A distribuição das amostras na Figura 2 sugere que a Região onde o pólen apícola foi produzido teve influência, embora não absoluta, sobre as variáveis, conforme discutido anteriormente. Diante disso, aplicou-se a *PLSDA* para identificar

o quanto as amostras poderiam ser devidamente reconhecidas como da Região SU, SE, NE e CO. O modelo de classificação será discutido mais a frente com os resultados apresentados na Tabela 6.

Na Figura 3 tem-se a distribuição dos grupos monoflorais e heteroflorais. As amostras heteroflorais estão por todos os quadrantes, assim como as amostras monoflorais, porém, nota-se que 63% das amostras monoflorais estão distribuídas pelo quadrante direito, ou seja, onde estão alguns dos menores valores de CA e alguns dos maiores valores de  $L^*$ . O modelo de classificação obtido para a origem botânica das amostras será discutido mais a frente.

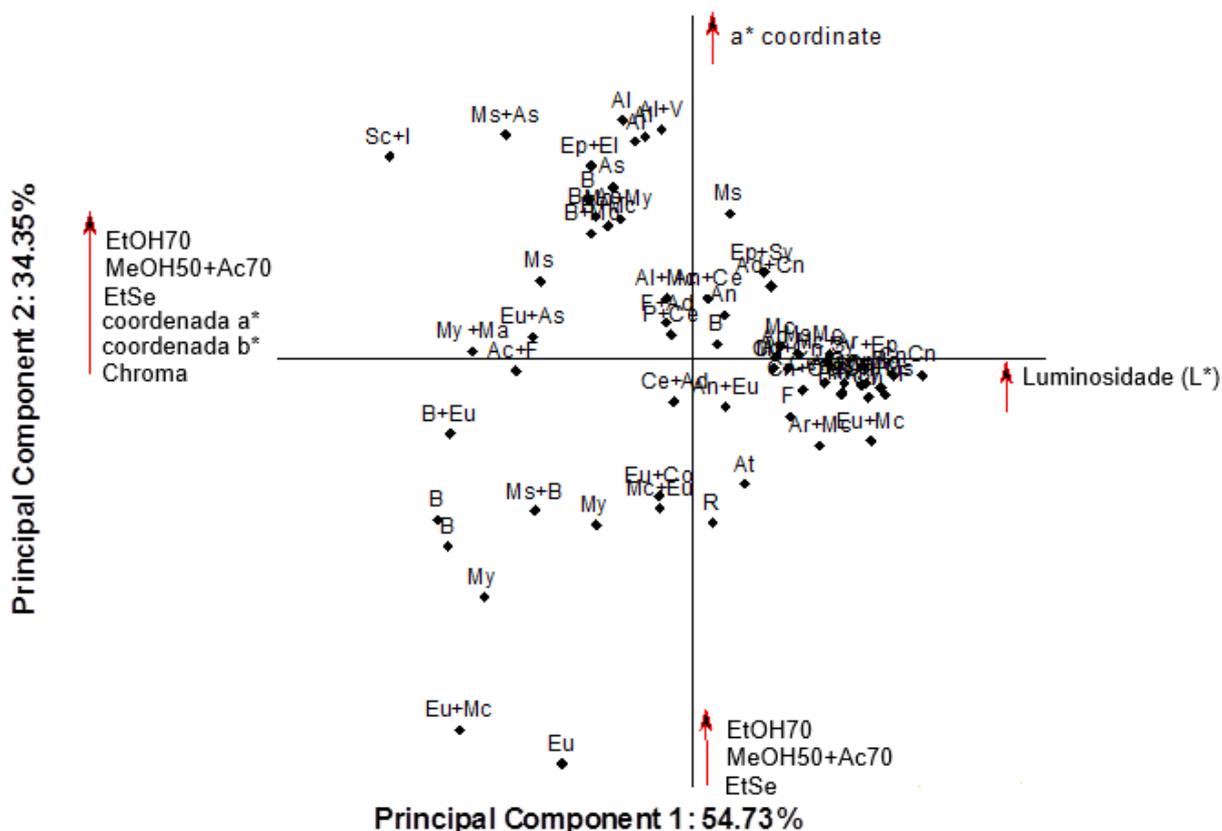


**Figura 3.** Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com a origem botânica.

M: monofloral; H: heterofloral.

A distribuição dos dados, considerando os principais tipos polínicos de cada amostra, é apresentada na Figura 4, sendo possível ver os táxons que se destacam dos demais. Na Tabela 5 são listados os tipos polínicos com as respectivas siglas para que seja possível identificar as amostras na Figura 4. No quadrante inferior esquerdo estão as amostras de maiores CA nos três extratos: duas monoflorais de *Brassica* [C1 e C2, ambas SU (Estado do Rio Grande do Sul)], uma monofloral de

*Myrcia* (L2, SU), uma monofloral de *Eucalyptus* (E3, NO) e uma heterofloral com *Eucalyptus* e *M. caesalpiniaefolia* como tipos polínicos principais (E2, NO).



**Figura 4.** Projeção de amostras de pólen apícola desidratado em um plano bi-dimensional de acordo com os tipos polínicos.

Siglas e tipos polínicos na Tabela 5.

Entre as 64 amostras há, além daquelas citadas no parágrafo anterior, outras duas monoflorais de *Brassica* e, também, outras duas monoflorais de *Myrcia*, porém, estão distribuídas em outros quadrantes. As outras duas amostras monoflorais do gênero *Brassica* estão: uma na região central do quadrante direito (O1, CO) e que, portanto, tem CA significativamente menor e maiores valores de L\* que as amostras C1 e C2; e outra no quadrante esquerdo superior [N1, SU (Estado de Santa Catarina)], indicando menores valores de CA e maiores valores de a\* entre as quatro amostras monoflorais deste gênero. Com isso, nota-se que, mesmo entre amostras monoflorais de um mesmo tipo polínico pode haver variações significativas na CA dos extratos EtOH70, MeOH50+Ac70 e EtSe e nos PIC de acordo com a Região do país onde estas amostras são produzidas. Entre as amostras monoflorais do gênero *Myrcia* também foi possível ver que, aquelas produzidas na SU tinham

características semelhantes (L2 e L3), e que estas características eram diferentes das observadas na amostra G5, produzida em SE.

**Tabela 5.** Principais tipos polínicos e classificação em monofloral ou heterofloral de 64 amostras de pólen apícola desidratado, coletadas em quatro Regiões Brasileiras.

Classificação	Sigla: tipo polínico	Amostra (Região de origem)
Monofloral	Al: <i>Alternanthera</i>	S3 (SE), S4 (SE), S6 (SE)
	An: <i>Anadenanthera</i>	K2 (SU), S7 (SE)
	As: Asteraceae	AC1 (SE)
	At: <i>AstrOcaryum</i>	G3 (SE), M1 (NO)
	B: <i>Brassica</i>	C1 (SU), C2, (SU), N1 (SU), O1 (CO)
	Cn: <i>COcOs nucifera</i>	I2 (NO), Q1 (NO), V1 (NO)
	Eu: <i>Eucalyptus</i>	E3 (NO)
	F: Fabaceae	M2 (NO)
	Mc: <i>MimOsa caesalpiniaefOlia</i>	A1 (NO), A2 (NO)
	Ms: <i>MimOsa scabrella</i>	J1 (SU), P1 (NO), T1 (NO)
	Mv: <i>MimOsa verrucOsa</i>	U1 (NO)
	My: <i>Myrcia</i>	G5 (SE), L2 (SU), L3 (SU)
	R: Rubiaceae	E7 (NO)
Heterofloral	Ac+F: Anacardiaceae + Fabaceae	AA2 (SU)
	Al+Mc: <i>Alternanthera</i> + <i>M. caesalpiniaefOlia</i>	S2 (SE)
	Al+V: <i>Alternanthera</i> + <i>VernOria</i>	S5 (SE)
	An+Ce: <i>Anadenanthera</i> + <i>CecrOpia</i>	K3 (SU), K4 (SU)
	An+Cn: <i>Anadenanthera</i> + <i>C. nucifera</i>	S1 (SE)
	An+Eu: <i>Anadenanthera</i> + <i>Eucalyptus</i>	K1 (SU)
	An+F: <i>Anadenanthera</i> + Fabaceae	Z1 (NO)
	Ar+Ce: Arecaceae + <i>CecrOpia</i>	G9 (SE)
	Ar+Mc: Arecaceae + <i>M. caesalpiniaefOlia</i>	G11 (SE)
	As+Ms: Asteraceae + <i>M. scabrella</i>	AA1 (SU)
	B+As: <i>Brassica</i> + Asteraceae	AC2 (SE)
	B+Eu: <i>Brassica</i> + <i>Eucalyptus</i>	C3 (SU)
	B+Mc: <i>Brassica</i> + <i>M. caesalpiniaefOlia</i>	AD1 (SE)
	B+Mo: <i>Brassica</i> + <i>MOntanOa</i>	AC3 (SE)
	Ce+My: <i>CecrOpia</i> + <i>Myrcia</i>	G8 (SE)
	Cn+Ce: <i>C. nucifera</i> + <i>CecrOpia</i>	G10 (SE)
	Cn+Mc: <i>C. nucifera</i> + <i>M. caesalpiniaefOlia</i>	E1 (NO)
	Cn+Ms: <i>C. nucifera</i> + <i>M. scabrella</i>	X1 (NO)
	Co+Cn: <i>COffea</i> + <i>C. nucifera</i>	E6 (NO)
	Ep+El: <i>EupatOrium</i> + <i>ElephantOpus</i>	D3 (SE)
	Eu+As: <i>Eucalyptus</i> + Asteraceae	D1 (SE)
	Eu+Co: <i>Eucalyptus</i> + <i>COffea</i>	E5 (NO)
	Eu+Mc: <i>Eucalyptus</i> + <i>M. caesalpiniaefOlia</i>	E2 (NO), E4 (NO), R1 (NO)
	P+At: <i>Piper</i> + <i>AstrOcaryum</i>	G7 (SE)
	P+Ce: <i>Piper</i> + <i>CecrOpia</i>	G6 (SE)
	Ma+My: <i>Machaerium</i> + <i>Myrcia</i>	AB1 (SU)
	Mc+Ar: <i>M. caesalpiniaefOlia</i> + Arecaceae	I1 (NO)
	Mc+My: <i>M. caesalpiniaefOlia</i> + <i>Myrcia</i>	AD2 (SE)
	Ms+B: <i>M. scabrella</i> + <i>Brassica</i>	H1 (SU)
	Ms+Mc: <i>M. scabrella</i> + <i>M. caesalpiniaefOlia</i>	F2 (NO)
	Sc+I: <i>Schinus</i> + <i>Ilex</i>	L1 (RS)
	Sy+Ep: <i>Syagrus</i> + <i>EupatOrium</i>	G1 (SE), G4 (SE)
	Sy+F: <i>Syagrus</i> + Fabaceae	G2 (SE)

Foram criados modelos de classificação para origem botânica (monofloral ou heterofloral) e para Região pela *PLS-DA* (Tabela 6). Para o modelo obtido para a origem botânica, utilizando 5 variáveis latentes, um total de 61% das amostras foi devidamente reconhecidas como mono ou heteroflorais, sendo que 70% das amostras heteroflorais foram corretamente classificadas usando *PLS-DA*, mas apenas 48% das amostras monoflorais puderam ser reconhecidas como pertencentes a essa classe. Os parâmetros que contribuíram, mais pronunciadamente para essa classificação, foram coordenada  $a^*$  > capacidade antioxidante do extrato EtE > capacidade antioxidante do extrato EtA.

**Tabela 6.** Modelo de discriminação para amostras de pólen apícola desidratado coletadas em diferentes Regiões e com diferente origem botânica usando *PSL-DA*.

Origem botânica					
Classes	Monofloral	Heterofloral	Classificação correta (%)		
Monofloral	13	14	48		
Heterofloral	11	26	70		
Modelo geral para origem botânica			61 <sup>a</sup>		

Regiões					
Classes	SU	SE	NE	CO	Classificação correta (%)
SU	9	5	2	0	56
SE	0	20	5	0	80
NE	0	0	20	0	100
CO	1	2	0	0	0
Modelo geral para Regiões					77 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>A classificação correta foi obtida por validação interna *leave-One-Out* dos modelos. Para origem botânica, a validação externa utilizando o algoritmo de Kennard-Stone, as taxas de classificação corretas foram de 61% para a origem botânica e 60% para Regiões, respectivamente

Quando a Região onde o produto foi produzido foi considerada como variável de predição, utilizando 4 variáveis latentes, um total de 77% das amostras foram corretamente classificadas, sendo que 100% das amostras de NE e 80% das amostras de SE foram reconhecidas pelo modelo proposto. Resultados insatisfatórios foram obtidos para as amostras produzidas em SU e CO, já que 56% e 0% das amostras foram classificadas corretamente. As principais variáveis envolvidas para a classificação obtida foram coordenada  $b^*$  > Chroma > capacidade antioxidante do extrato EtOH70.

## 4 CONCLUSÃO

Entre os métodos de extração analisados, o procedimento a base de metanol a 50% e acetona a 70% mostrou-se um bom protocolo para extrair compostos antioxidantes do pólen apícola desidratado, quando a ação é avaliada pelo método DPPH. Este método pode ser uma alternativa ao atual procedimento utilizado por muitos pesquisadores (a base de etanol a 70%) para determinações nesta matriz alimentícia.

Certos parâmetros instrumentais de cor podem ser utilizados para sugerir a capacidade antioxidante do pólen apícola, porém são apenas critérios sugestivos e não absolutos. Estes parâmetros poderiam servir para priorizar a análise de amostras quando há um número grande de produtos para análise, por exemplo.

Algumas amostras de pólen apícola desidratado tiveram perfis característicos da Região onde foram produzidas, portanto, se o interesse é por amostras de maior capacidade antioxidante, pode-se buscar por produtos da Região Sul do Brasil, mas, se o interesse é por certos parâmetros instrumentais de cor, amostras da Regiões Sudeste e Nordeste devem ser priorizadas.

## 5 REFERÊNCIAS

AMAYA-CRUZ, D.M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, S.; PÉREZ-RAMÍREZ, I.F.; LOARCA-PIÑA, G.; AMAYA-LIANO, S.; GALLEGOS-CORONA, M.A.; REYNOSO-CAMACHO, R. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. **Journal of Functional Foods**, v.17, p.93-102, 2015.

ARRUDA, V.A.S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica**. São Paulo, 2013. 192p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BAJEROVÁ, P.; ADAM, M.; BAJER, T.; VENTURA, K. Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. **Journal of Separation Science**, v.37, n.7, p.835-844, 2014.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen dominante. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.2, p.351-366, 1970a.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 2. Pólen acessório. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.3, p.571-590, 1970b.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 3. Pólen isolado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.4, p.747-772, 1970c.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Resolução RDC nº 45, de 03 de novembro de 2010. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Alimentares Autorizados Segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). **Diário Oficial da União**, n.212, Brasília, 05 nov. 2010. Seção 1, p.63.

BRASIL. Resolução RDC nº 02, de 15 de janeiro de 2007. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 jan. 2007, Seção 1.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CAMPOS, M.G.R.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Age-Induced Diminution of Free Radical Scavenging Capacity in Bee Pollens and the Contribution of Constituent Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.3, p.742-745, 2003.

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. Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. **CyTA - Journal of Food**, v.11, n.2, p.150-161, 2013.

CARPES, S.T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1818-1825, 2007.

CARPES, S.T.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.3, p.220-229, 2009.

CARPES, S.T.; PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil, **Química Nova**, v.31, n.7, p.1660-1664, 2008.

CARVALHO, R.H.R.; GALVÃO, E.L.; BARROS, J.A.C.; CONCEIÇÃO, M.M.; SOUSA, E.M.B.D. Extraction, fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract (*Sesamum indicum* L.). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.2, p.409-420, 2012.

CHANTARUDEE, A.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A.; CHANCHAO, C. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.45, p.1-12, 2012.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.3, p.231-237, 2013.

GRANATO, D.; CALADO, V.M.A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, v.55, p.137-149, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and Medicine**. 4.ed. New York: Oxford University Press Inc., 2007. 851p.

HENRÍQUEZ, C.; ALMONACID, S.; CHIFFELLE, I.; VALENZUELA, T.; ARAYA, M.; CABEZAS, L.; SIMPSON, R.; SPEISKY, H. Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple

cultivars grown in Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.70, n.4, p.523-536, 2010.

HUANG, W.Y.; ZHANG, H.C.; LIU, W.X.; LI, C.Y. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University**, v.13, n.2, p.94-102, 2012.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAFMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-6, 2015.

LEBLANC, B.W.; DAVIS, O.K.; BOUE, S.; DELUCCA, A.; DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v.115, n.4, p.1299-1305, 2009.

LOPES, J.; STANCIU, O.G.; CAMPOS, M.G.; ALMARAZ-ABARCA, N.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MARGHITAS, L.A. Bee pollen antioxidant activity - a review: achievements and further challenges. **Journal of Pharmacognosy**, v.2, n.2, p.25-38, 2011.

MARGHITAS, L.A.; STANCIU, O.G.; DEZMIREAN, D.S.; BOBIS, O.; POPESCU, O.; BOGDANOV, S.; CAMPOS, M.G. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. **Food Chemistry**, v.115, n.3, p.878-883, 2009.

MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. **Química Nova**, v.33, n3, p.514-518, 2010.

MENEZES, J.D.S.; MACIEL, L.F.; MIRANDA, M.S.; DRUZIAN, J.I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.233-242, 2010.

MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, V.C.; RODRIGUES, R.R. **Atlas do pólen de plantas apícolas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual. 2002. 88p.

OLIVEIRA, K.C.L.S.; MORIYA, M.; AZEDO, R.A.B.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; TEIXEIRA, E.W.; ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1099-1102, 2009.

PHAM-HUY, L.A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v.4, n.2, p.89-96, 2008.

RIEDER, A.; DORES, E.F.G.C.; HIGA, N.; MORAES, M.P.L. Alterações no teor da matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do Pantanal diante da poluição por pestocodas. **Pesticidas**, v.10, p.87-112, 2000.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, n.4, p.996-1002, 2010.

SATTLER, J.A.G. **Quantificação das vitaminas antioxidantes E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A ( $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil**. São Paulo, 2013. 140p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, n.9, p.930-940, 2010.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14, n.3, p.202-210, 2011.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V., BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

YODMANEE, S.; KARRILA, T.T.; PAKDEECHANUAN, P. Physical, chemical and antioxidant properties of pigmented rice grown in Southern Thailand. **International Food Research Journal**, v.18, n.3, p.901-906, 2011.

ZIELINSKI, A.A.F.; HAMINIUK, C.W.I.; NUNES, C.A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S.M.; GRANATO, D. Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: a critical review and guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, n.3, p.300-316, 2014.

# CAPÍTULO 6

## DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO PRODUZIDO NO BRASIL

(Trabalho publicado no periódico *Letters in Applied Microbiology* - ANEXO VI)

### RESUMO

O pólen apícola é um produto com potencial para aplicações médicas e nutricionais, portanto, sua qualidade microbiológica deve ser monitorada. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi diagnosticar a qualidade microbiológica de 45 amostras de pólen apícola desidratado, coletadas entre os meses de novembro de 2011 a dezembro de 2013, em nove estados brasileiros. Todas as amostras foram negativas para esporos de clostrídeos sulfito-redutores, *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli*, os quais são micro-organismos de interesse em saúde pública. A contagem de micro-organismos aeróbicos mesófilos variou de <10 a  $1,10 \times 10^4$  UFC/g, com psicrotrofos variando de <10 a  $1,12 \times 10^3$  UFC/g e coliformes totais de <10 a  $2,80 \times 10^3$  UFC/g, enquanto nos valores de bolores e leveduras houve variação de <10 a  $7,67 \times 10^3$  UFC/g. De acordo com a literatura consultada, a microbiota observada neste estudo foi considerada típica, no entanto é importante ter em mente que estes micro-organismos podem causar deterioração e redução na vida-de-prateleira, razão pela qual programas de controle de qualidade devem ser implementados.

**Palavras-chave:** qualidade microbiológica; micro-organismos deteriorantes; patógenos; *Apis mellifera*; pólen apícola; apicultura.

### ABSTRACT

Bee-pollen is an apicultural product with potential for medical and nutritional applications; therefore, its microbiology quality should be monitored. In this context, the objective of this study was to diagnose the microbiological quality of 45 dehydrated bee-pollen samples collected from November 2011 to December 2013 in nine Brazilian States. All the samples were negative for sulphite-reducing *Clostridium* spores, *Salmonella*, coagulase-positive *Staphylococcus* and *Escherichia coli*, which

are microorganisms of public health concern. Total aerobic mesophilic microorganism counts ranged from  $<10$  to  $1.10 \times 10^4$  CFU/g, with psychrotroph counts ranging from  $<10$  to  $1.12 \times 10^3$  CFU/g and total coliforms from  $<10$  to  $2.80 \times 10^3$  CFU/g, while the values for yeasts and moulds were between  $<10$  to  $7.67 \times 10^3$  CFU/g. According to the literature, the microbiota observed in this study were typical, however it is important to consider that these microorganisms may cause spoilage and diminish shelf life, reason by which quality control programs should be implemented.

**Keywords:** microbiological quality; spoilage microorganisms; pathogens; *Apis mellifera*; bee-pollen; apicultural.

## 1 INTRODUÇÃO

O pólen apícola é o resultado da aglutinação de diferentes grãos de pólen coletados das flores pelas abelhas, que adicionam secreções salivares e pequenas quantidades de néctar e/ou mel (BRASIL, 2001; CAMPOS *et al.*, 2008). O consumo deste alimento é impulsionado pela demanda por produtos naturais, complementares à dieta ou com propriedades terapêuticas (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005). Além disso, há, também, uma crescente preocupação com o *status* sanitário dos alimentos. Assim, para atender a demanda por pólen apícola e, ainda, evitar danos à saúde do consumidor, controle permanente na cadeia apícola, bem como a implementação de boas práticas de produção e processamento pelos apicultores e entrepostos, são essenciais.

Existe pouca informação a respeito da qualidade microbiológica do pólen apícola desidratado, sendo que apenas dois estudos realizados com amostras brasileiras foram encontrados (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005; HERVATIN, 2009). Não há um padrão internacional para este produto e a legislação brasileira estabelece limites, apenas, para parâmetros físico-químicos, como umidade, proteína, lipídios, cinzas, açúcares totais, acidez livre e pH (BRASIL, 2001). A falta de parâmetros microbiológicos específicos para este alimento pode estar relacionada à ausência de diagnósticos que atestem a necessidade de limitações.

Dada a necessidade de se realizar um diagnóstico do *status* sanitário do pólen apícola desidratado produzido no Brasil, este estudo teve como objetivo

avaliar a qualidade microbiológica de amostras coletadas em nove Estados brasileiros.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia (LM) da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal. As amostras foram adquiridas de produtores e entrepostos indicados pela Confederação Brasileira de Apicultura, bem como aleatoriamente no comércio para fins de investigação. Foram analisadas 45 amostras de pólen apícola de abelhas *Apis mellifera*, desidratadas e prontas para o consumo, coletadas, entre os meses de novembro de 2011 e dezembro de 2013, em 22 apiários localizados em nove Estados brasileiros (APÊNDICE IV).

Inicialmente, o produto foi enviado para o Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde as amostras foram codificadas e armazenadas à temperatura de 0°C. Grupos de amostras foram enviados, à temperatura ambiente, para o LM (cinco grupos; tempo entre o envio e o recebimento: até cinco dias), onde foram novamente armazenadas à temperatura de 0°C, até o momento da análise.

### 2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As embalagens foram abertas em capela de fluxo laminar, homogeneizadas e, em seguida, parcelas de  $10 \pm 0,2$  g foram tomadas para os ensaios. As porções foram pesadas, assepticamente, em embalagens estéreis e, então, homogeneizadas com 90 mL de água peptonada (HiMedia, Mumbai, Índia), por 1 min., em equipamento *Stomacher Lab-Blender* (Seward tipo 400, Londres, UK) previamente esterilizado. Por fim, diluições seriadas foram preparadas utilizando água peptonada (1:10, v/v).

## 2.3 AERÓBIOS MESÓFILOS

A contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos foi realizada 48 h após a incorporação de 1 mL de cada diluição em meio *plate count agar* (PCA) (HiMedia, Mumbai, India) seguida de incubação a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  (IPQ, 2002a). Para o cálculo dos resultados foi considerada a seguinte fórmula:

$$\text{CFU.g}^{-1} = \sum C / [V * (n1 + 0.1 n2) * d]$$

Onde  $\sum C$  = soma de todas as colônias contadas nas placas com intervalo de contagem de 15 a 150;

V = volume de inóculo semeado em cada placa;

n1 = número de placas da primeira diluição contada;

n2 = número de placas da segunda diluição contada;

d = diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens.

Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por g de pólen apícola desidratado (UFC/g).

## 2.4 PSICROTRÓFICOS

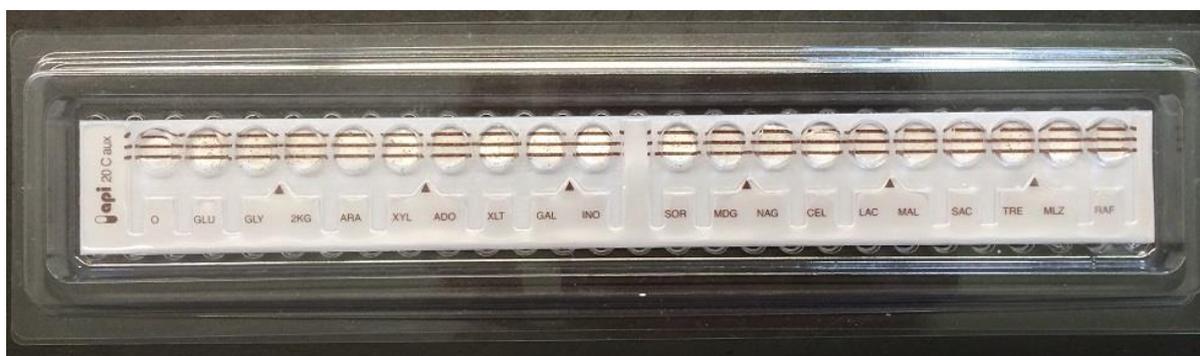
Para a contagem de psicotróficos, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das diluições foram semeadas, por espalhamento (*spread-plate*), na superfície de placas de Petri contendo meio PCA solidificado e, em seguida, procedeu-se a incubação a  $6,5\pm 0,5^\circ\text{C}$  por 10 dias (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2001). Os resultados foram expressos em UFC/g de amostra.

## 2.5 BOLORES E LEVEDURAS

A contagem de bolores e leveduras foi realizada, conforme descrito na ISO 21572-2:2008 (ISO, 2008), semeando, por espalhamento, 100  $\mu\text{L}$  das diluições na superfície de placas de Petri contendo meio *potato dextrose agar* (PDA) (HiMedia, Mumbai, India) solidificado e previamente acidificado com ácido tartárico. As placas foram incubadas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  por 5 dias e os resultados expressos em UFC/g de amostra.

### 2.5.1 Isolamento e identificação de leveduras

As leveduras foram identificadas utilizando o sistema de galerias API 20C AUX (BioMerieux, Hazelwood, MO, USA), por comparação com um padrão de cepas identificadas, de antemão, pelo fabricante por PCR. Previamente às análises, as culturas foram isoladas em placas de Petri contendo ágar *Sabouraud* (HiMedia, Mumbai, India) após incubação por 48h a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  (NOGUEIRA *et al.*, 2012). Em seguida, cada estirpe foi inoculada em 2 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85%, em quantidade suficiente para uma turvação correspondente ao padrão 2 da escala de *McFarland*. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  dos inóculos em solução de cloreto de sódio a 0,85% foram adicionados a tubos contendo meio C (fornecido pelo fabricante) e, então, alíquotas foram transferidas para as galerias para proceder a incubação do sistema a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 h. A identificação da levedura foi realizada conforme informações fornecidas pelo fabricante. O sistema utilizado é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Sistema de galerias API 20C AUX para identificação de leveduras.

Fonte: arquivo pessoal de Adriane A. M. de Melo.

### 2.6 COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI*

A determinação do número mais provável de coliformes totais e de *E. coli* foi realizada em kit SimPlate (BioControl) (AOAC, 2000). O meio de cultura foi preparado seguindo as instruções do fabricante e, em seguida, 1 mL das diluições foram inoculadas. Procedeu-se a agitação em vórtex e, por fim, os inóculos foram vertidos para as placas do kit, as quais foram incubadas a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 h. Os poços em que observou-se mudança na cor do meio de cultura de azul para rosa

foram considerados positivos para coliformes e, estes, considerados positivos para *E. coli* quando houve fluorescência no momento em que as placas eram expostas a lâmpada de UV com comprimento de onda de 365 nm (Viber Lourmat, Merck, Paris, France, TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>). Os resultados foram calculados de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante e expressos em número mais provável de coliformes totais, ou de *E. coli*, por g de pólen apícola desidratado (NMP/g).

## 2.7 STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada conforme procedimento descrito na NP-4400-1 (IPQ, 2002b). Inicialmente, alíquotas de 100 µL das diluições foram inoculadas, por espalhamento, na superfície de placas de Petri contendo ágar *Baird-Parker* (HiMedia, Mumbai, India) enriquecido com emulsão de gema de ovo. As placas foram incubadas a 37±2°C por 24 h. Em seguida, colônias típicas e atípicas foram inoculadas em tubos contendo caldo *brain heart infusion broth (BHI)* (VWR, Denver, CO, USA) e incubadas por 24 h a 37±2°C. Finalmente, procedeu-se o teste de coagulase utilizando plasma de coelho (Merck, Darmstadt, Germany). Os resultados foram expressos em UFC/g.

## 2.8 ESPOROS DE CLOSTRÍDEOS SULFITO-REDUTORES

A presença ou ausência de esporos de clostrídeos sulfito-redutores foi determinada com base no procedimento descrito na ISO 15213:2003 (ISO, 2003). Inicialmente, alíquotas de 10, 5 e 1 mL da diluição inicial foram adicionadas a tubos de ensaio (previamente esterilizados) e o conteúdo submetido a aquecimento em banho-maria por 10 min a 80°C. O conteúdo dos tubos foi vertido em placas de Petri e incorporado a meio de cultura *iron sulfite agar* (HiMedia, Mumbai, India) preparado, previamente, conforme instruções do fabricante. A incubação ocorreu a 37±2°C por 48 h sob condições de anaerobiose. As placas com crescimento de colônias negras características foram considerados positivas e os resultados foram expressos em presença ou ausência de esporos de clostrídeos sulfito-redutores em 0,01 g de pólen apícola desidratado.

## 2.9 PESQUISA DE *SALMONELLA* SP.

Esta pesquisa foi realizada em kit 1-2 TEST (BioControl) (AOAC, 2000), preparado conforme as recomendações do fabricante. 100 µL da diluição inicial foram inoculados no kit e este incubado por 14 a 30 h a 37±2°C. Ao final do período de incubação foi considerado positivo para *Salmonella* sp. a formação de uma banda branca (imunobanda) em forma de U ou de menisco. Os resultados foram expressos em presença ou ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de pólen apícola desidratado.

## 2.10 TRATAMENTO DOS DADOS

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste *F* e, quando relevante, a teste *Tukey* HSD com  $\alpha=0,05$ . O programa *Statistical Analysis System* 6.0 foi utilizado para os cálculos.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados na Tabela 1. A escolha dos indicadores microbiológicos para determinar a qualidade sanitária das amostras baseou-se em estudos prévios (CAMPOS *et al.*, 2008; ESTEVINHO *et al.*, 2012; FÉAS *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2012; PUIG-PEÑA *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Percentagem de amostras de pólen apícola desidratado em cada faixa de determinação.

UFC/g ou NMP/g	Aeróbios mesófilos (%)	PSI (%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (%)	BOL (%)	CT (%)	<i>Escherichia coli</i>
<10	6,7	57,8	100	15,6	33,3	100
10 - 100	15,6	35,6	-	37,8	15,6	-
101 - 1000	53,3	4,4	-	31,1	37,8	-
1001 - 10000	22,2	2,2	-	15,6	13,3	-
Acima de 10001	2,2	-	-	-	-	-

PSI: psicrotróficos; BOL: bolores e leveduras; CT: coliformes totais.

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos variou de  $<10$  a  $1,10 \times 10^4$  UFC/g, psicrotróficos de  $<10$  a  $1,12 \times 10^3$  UFC/g, bolores e leveduras de  $<10$  a  $7,67 \times 10^3$  UFC/g e coliformes totais de  $<10$  a  $2,80 \times 10^3$  UFC/g. As maiores contagens foram de micro-organismos aeróbios mesófilos. Nota-se que houve variação significativa ( $p < 0,05$ ) entre algumas amostras, inclusive entre produtos de um mesmo apiário. Em uma amostra coletada no Mato Grosso foi observada a maior contagem de aeróbios mesófilos ( $1,10 \times 10^4$  UFC/g) e em uma amostra produzida no Paraná o maior valor de psicrotróficos ( $1,12 \times 10^3$  UFC/g). Duas amostras, uma coletada em São Paulo e outra na Bahia, tiveram as maiores contagens de bolores e leveduras ( $7,67 \times 10^3$  UFC/g), enquanto o maior valor de coliformes totais foi observado em uma amostra produzida na Bahia ( $2,80 \times 10^3$  UFC/g), diferente daquela com a maior contagem de bolores e leveduras (Tabela 2). Variações na contagem de micro-organismos entre amostras procedentes do mesmo Estado estão relacionadas ao fato de que cada apiário é uma unidade de produção e adota diferentes práticas de coleta e processamento.

**Tabela 2.** Faixa de contagem de micro-organismos em amostras de pólen apícola desidratado de acordo com o Estado onde foram produzidas.

Origem/ Estado	Número de amostras	Aeróbios mesófilos (UFC/g)	Psicrotróficos (CFU/g)	Bolores e leveduras (CFU/g)	Coliformes totais (NMP/g)
Bahia	14	$2,50 \times 10^4$ a $2,13 \times 10^3$	$<10$ a $5,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^4$ a $7,67 \times 10^3$	$<10$ a $2,80 \times 10^3$
São Paulo	13	$<10$ a $3,53 \times 10^3$	$<10$ a $9,80 \times 10^1$	$<10$ a $7,67 \times 10^3$	$<10$ a $1,67 \times 10^3$
Paraná	4	$1,11 \times 10^2$ a $1,50 \times 10^3$	$<10$ a $1,12 \times 10^3$	$3,70 \times 10^4$ a $4,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^4$ a $1,40 \times 10^3$
Rio Grande do Norte	4	$<10$ a $3,50 \times 10^2$	$<10$	$2,40 \times 10^4$ a $4,50 \times 10^2$	$<10$ a $2,20 \times 10^1$
Rio Grande do Sul	3	$3,70 \times 10^2$ a $7,42 \times 10^2$	$<10$ a $1,70 \times 10^1$	$2,30 \times 10^4$ a $2,17 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2$ a $2,27 \times 10^3$
Sergipe	2	$6,84 \times 10^2$ a $7,64 \times 10^2$	$<10$ a $1,82 \times 10^2$	$2,72 \times 10^2$ a $2,80 \times 10^2$	$<10$
Santa Catarina	2	$4,80 \times 10^4$ a $6,80 \times 10^1$	$<10$ a $1,30 \times 10^1$	$<10$ a $2,20 \times 10^1$	$<10$ a $6,70 \times 10^1$
Mato Grosso	2	$1,94 \times 10^2$ a $1,10 \times 10^4$	$<10$ a $2,70 \times 10^1$	$<10$ a $8,70 \times 10^1$	$6,70 \times 10^4$ a $3,33 \times 10^2$
Mato Grosso do Sul	1	$4,80 \times 10^3$	$4,70 \times 10^1$	$6,70 \times 10^2$	$2,67 \times 10^2$

O diagnóstico da qualidade microbiológica de um alimento permite avaliar as condições de processamento, armazenamento e distribuição (ROCHA, 2013). A presença de micro-organismos no pólen apícola desidratado está relacionada às práticas inadequadas de higiene durante as etapas de manejo a campo e de beneficiamento, à manipulação do produto em ambientes contaminados e à contaminação do grão de pólen floral ainda na planta ou pela própria abelha (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005; HERVATIN, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2012). No processo de produção, um ponto crítico é o tempo de permanência do pólen apícola, ainda *in natura*, nas armadilhas de coleta fixadas na entrada da colmeia, uma vez que os grãos podem ficar em contato com o ar, poeira e outras sujidades e, em determinadas épocas do ano, expostos a alta umidade e temperaturas ideais para o crescimento microbiano (GONZÁLES *et al.*, 2005).

A proliferação dos micro-organismos nas matrizes alimentícias depende de condições favoráveis. Estevinho *et al.* (2012) observaram correlação positiva entre atividade de água ( $a_w$ ) e a população de bolores e leveduras neste alimento. A  $a_w$  no pólen apícola desidratado varia de 0.25 a 0.60 (BASTOS *et al.*, 2003; ESTEVINHO *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2012, ROCHA, 2013), sendo este um fator limitante para o desenvolvimento microbiano. Há duas hipóteses para a presença de micro-organismos viáveis nas amostras de pólen apícola desidratado em estudo, uma delas seria a baixa temperatura utilizada no processo de desidratação, insuficiente para eliminar os micro-organismos, e a outra seria a contaminação do produto durante as etapas de beneficiamento que sucedem a desidratação (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005, HERVATIN, 2009).

A contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos é comumente utilizada como um indicador geral da qualidade dos alimentos. Pesquisadores que realizaram diagnósticos de qualidade microbiológica em amostras de pólen apícola desidratado encontraram contagens de aeróbios mesófilos na faixa de  $<10$  a  $10^4$  UFC/g (ESTEVINHO *et al.*, 2012; FEÁS *et al.*, 2012; HANI *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2012), embora valores acima de  $10^4$  UFC/g tenham sido relatados por Pena-Puig *et al.* (2012). Com base na literatura, era esperado que os psicrótróficos, em razão do armazenamento e comercialização deste produto ocorrer a temperatura ambiente, estivessem em menor número, o que foi confirmado.

Os coliformes totais também são indicadores de contaminação durante etapas de produção, coleta e processamento dos alimentos, mas são, por vezes,

utilizados como indicadores da presença de patógenos de origem entérica, como a *Escherichia coli*. Estudos da presença de coliformes totais nesta matriz indicaram valores de  $<10$  a  $10^4$  CFU/g (HANI *et al.*, 2012; ROCHA, 2013). Com relação a bolores e leveduras, em amostras de pólen apícola desidratado, pesquisadores indicam valores de  $<10$  a  $10^4$  CFU/g (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005; SANTOS *et al.*, 2010; HANI *et al.*, 2012; ROCHA, 2013).

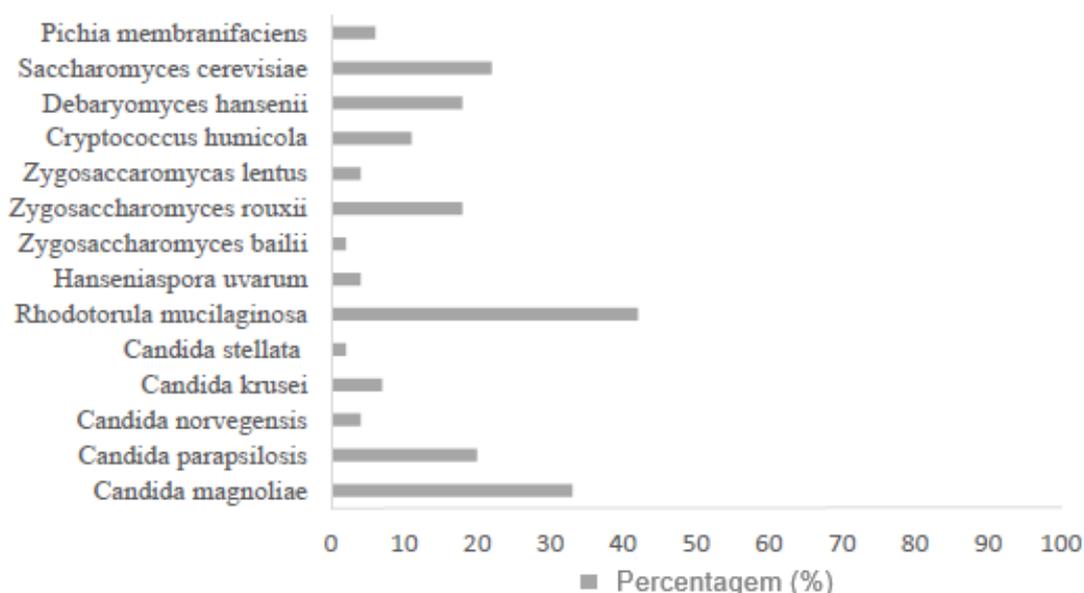
Todas as amostras foram negativas para esporos de clostrídeos sulfito-redutores e *Salmonella* sp. e não houve crescimento de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus* coagulase positiva. Estes resultados são importantes porque estes micro-organismos são potencialmente patogênicos e de interesse em saúde pública. Gastroenterites podem ser causadas pela ingestão de alimento contaminado com a enterotoxina produzida pelo *Clostridium perfringens*, sendo os sintomas mais comuns diarreia e dor abdominal (MONMA *et al.*, 2015). Uma neurotoxina produzida pelo *C. botulinium* pode causar um quadro grave de neuroparalisia (VASQUEZ, 2009).

A *Salmonella* sp. é a causadora de uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns e de distribuição mundial, cuja infecção pode causar gastroenterite e, em casos mais severos, quadros de septicemia e meningite (CHIAPPINI *et al.*, 2002). A *Escherichia coli*, além de indicador das condições de higiene durante as etapas de produção e processamento e, possivelmente, da presença de outros micro-organismos de origem entérica (FRANCO; LANDGRAF, 2009), é potencialmente patogênica, visto que algumas cepas adquiriram fatores de virulência específicos e responsáveis por quadros de diarreia, inflamação aguda, colite hemorrágica, infecções do trato urinário, septicemia e meningite neonatal (KAPER; NATARO; MOBILEY, 2004; MÜLLER *et al.*, 2007). O *Staphylococcus aureus* é um *Staphylococcus* coagulase-positiva capaz de produzir enterotoxinas termoestáveis que, quando ingeridas, causam intoxicação alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2009).

Poucos países dispõem de critérios microbiológicos para a comercialização do pólen apícola. Pesquisadores da International Honey Commission (IHC), uma comissão internacional que pretende propor critérios de qualidade e um padrão internacional de identidade e qualidade para este produto, recomendaram limites para aeróbios totais ( $<10^5$  UFC/g), bolores e leveduras ( $<5 \times 10^4$  UFC/g), Enterobacteriaceae (máx.  $10^2$  UFC/g), *E. coli* (ausência em 1 g), *Salmonella* sp.

(ausência em 10 g) e *S. aureus* (ausência em 1 g) (CAMPOS *et al.*, 2008). Considerando os limites propostos pela IHC, todas as amostras em estudo estariam dentro do padrão.

Foram identificadas 14 espécies de leveduras em 26 amostras (57,7%), nas demais não houve crescimento destes micro-organismos ou correspondência com as informações disponíveis no sistema API 20C AUX. Das 14 espécies identificadas, cinco pertenciam ao gênero *Candida* (*C. magnoliae*, *C. parapsilopsis*, *C. norvegensis*, *C. krusei*, *C. stellata*) e três ao gênero *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii*, *Z. rouxii*, *Z. lentus*). As demais espécies foram *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Cryptococcus humicola*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia membranifaciens*. A ocorrência de cada espécie nas 45 amostras analisadas é apresentada na Figura 2.



**Figura 2.** Ocorrência das leveduras isoladas e identificadas em 45 amostras de pólen apícola desidratado coletadas em nove Estados brasileiros.

Entre as leveduras identificadas, observa-se a predominância do gênero *Candida*. Deste gênero fazem parte micro-organismos comensais que habitam, primariamente, o trato gastrointestinal de humanos, mas também fazem parte da microbiota vaginal, da uretra e dos pulmões. Estas leveduras podem se tornar patogênicas caso ocorra um desequilíbrio na sua relação com o hospedeiro, por isso são chamadas de oportunistas. Embora *C. albicans* seja considerada a mais importante levedura patogênica para o homem, nas últimas décadas outras espécies

foram identificadas em processos infecciosos, entre elas *C. parapsilopsis*, *C. norvegensis* e *C. krusei* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são patógenos oportunistas, capazes de colonizar e infectar pacientes susceptíveis. A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* é, comumente, isolada em alimentos e bebidas, porém, a maioria dos casos de infecção por *Rhodotorula* spp. são fungemias associadas ao uso de cateter (WIRTH; GOLDANI, 2012). Embora considerada agente deteriorante, a espécie *Cryptococcus humicola* já foi descrita como agente de criptococose em pacientes imunossuprimidos, entretanto, não é a espécie mais comum associada a esta patologia (HARRIS *et al.*, 2011).

Patógenos oportunistas causam infecções apenas em circunstâncias especiais, de modo que a ingestão de alimentos contaminados com estes micro-organismos não vai, necessariamente, resultar em infecção. De acordo com Bishop (2012), em indivíduos imunossuprimidos, um processo infeccioso pode ocorrer quando há desequilíbrio na população destes patógenos. Este desequilíbrio pode ocorrer, também, devido a stress ou a mudanças no pH intestinal.

A espécie *Zygosaccharomyces rouxii* também foi encontrada em amostras comerciais de pólen apícola desidratado adquiridas em Portugal e na Espanha (NOGUEIRA *et al.*, 2012). Esta espécie é um micro-organismo deteriorante conhecido por sua alta tolerância a stress osmótico. (PRIBYLOVA; MONTIGNY; SYCHROVA, 2007). *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia membranifaciens* também causam fermentação e, conseqüentemente, deterioração (MOREIRA *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2012). A espécie *Debaryomyces hansenii* já foi encontrada em diferentes alimentos de baixa atividade de água e em produtos com elevado teor de açúcares, estando associada a processos de deterioração (BREUER; HARMS, 2006).

De que se tem conhecimento, apenas um estudo foi publicado contemplando o isolamento e a identificação de leveduras em pólen apícola desidratado (NOGUEIRA *et al.*, 2012), mas a presença destes micro-organismos em amostras de mel tem sido bastante estudada (GILLIAM, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005). Uma vez que ambos são produtos apícolas, é possível que a própria abelha seja uma fonte de contaminação ou, ainda, que a contaminação ocorra em razão da ampla distribuição destes micro-organismos na natureza e, conseqüentemente, no pólen das espécies vegetais. Neste estudo, a

ocorrência das leveduras nas amostras não parece relacionada a época do ano em que o produto foi coletado ou ao Estado onde foi produzido, uma vez que estes micro-organismos foram identificados em amostras de todos os nove Estados e coletadas em diferentes épocas do ano.

#### 4 CONCLUSÃO

Com base na literatura consultada, este é o estudo mais abrangente de qualidade microbiológica do pólen apícola desidratado produzido no Brasil, incluindo um grande número de amostras e análises. Os valores de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e bolores e leveduras foram semelhantes aos observados em outros estudos e seriam considerados aceitáveis pela IHC.

A ausência de bactérias causadoras de doenças é um resultado positivo, embora a identificação de leveduras potencialmente patogênicas possa ser uma preocupação. É importante estabelecer critérios de qualidade microbiológica para o pólen apícola desidratado e, de maneira imediata, deve ser dada uma maior atenção, por parte dos produtores e entrepostos, às práticas de manejo a campo e beneficiamento, de modo a evitar danos a saúde dos consumidores e, ainda, aumentar a vida de prateleira do produto.

#### 5 REFERÊNCIAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 17. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete Estados brasileiros e do Distrito Federal, **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.2, p.167-175, 2005.

BASTOS, D.H.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais - Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.3, p.239-244, 2003.

BISHOP, P. Eucaryotic microorganisms: fungi, protozoa and multicelular parasites. In: LEE, G.M. **Microbiology and infection control for health professionals**. 5 ed. Frenchs Forest, NSW: Pearson Australia, 2012. cap.6. pp.110-134.

BRASIL. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 2001. Seção 1, p.18.

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, v.23, n.6, p.415-437, 2006.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CARVALHO, C.M.; ROCHA, A.; ESTEVINHO, M.L.F.; CHOUPINA, A. Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the its region. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.5, n.1, p.11-17, 2005.

CHIAPPINI, E.; GALLI, L.; PECILE, P.; VIERUCCI, A.; MARTINO, M. Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among *Salmonella* enterica isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea. **Clinical Therapeutics**, v.24, n.10, p.1585-1594, 2002.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.13. pp.159-166.

ESTEVINHO, M.L.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A.P.; FEÁS, X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, n.2, p.429-435, 2012.

FÉAS, X.; VÁZQUEZ-TATO, M.P.; ESTEVINHO, L.; SEIJAS, J.A.; IGLESIAS, A. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v.17, n.7, p.8359-8377, 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 6.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 182p.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letters**, v.155, n.1, p.1-10, 1997.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, n.3, p.225-234, 2010.

GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.1, p.1-9, 2005.

HANI, B.; DALILA, B.; SALIHA, D.; DAOUND, H.; MOULOUD, G.; SEDDIK, K. Microbiological sanitary aspects of pollen. **Advances in Environmental Biology**, v.6, n.4, p.1415-1420, 2012.

HARRIS, J.R.; LOCKHART, S.R.; DEBESS, E.; MARSDEN-HAUG, N.; GOLDOFT, M.; WOHRLE, R.; LEE, S.; SMELSER, C.; PARK, B.; CHILLER T. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v.53, n.12, p.1188–1195, 2011.

HERVATIN, H.L. **Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola *in natura* e desidratado sob diferentes temperaturas**. Campinas, 2009. 99p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

IPQ. INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE. **NP 3788. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microorganismos a 30°C**. Costa de Caparica, 2002a. 7p.

IPQ. INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE. **NP 4400-1. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies)**. Costa de Caparica, 2002b. 7p.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 21572-2:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95**. International Organization for Standardization. Winterthur, 2008. 3p.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 15213:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions**. International Organization for Standardization. Winterthur, 2003. 6p.

KAPER, J.B.; NATARO, J.O.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

MONMA, C.; HATAKEYAMA, K.; OBATA, H.; YOKOYAMA, K.; KONISHI, N.; ITOH, T.; KAI, A. Four food-borne outbreaks caused by a new type of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, n.3, p.859-867, 2015.

MOREIRA, N.; PINA, C.; MENDES, F.; COUTO, J. A.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. **Food Control**, v.22, n.5, p.662-667, 2011.

MÜLLER, D.; GREUNE, L.; HEUSIPP, G.; KARCH, H.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, M.A. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.10, p.3380-3390, 2007.

NOGUEIRA, C.; IGLESIAS, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.11173-11187, 2012.

PRIBYLOVA, L.; MONTIGNY, J.; SYCHROVA, H. Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. **Yeast**, v.24, n.3, p.171-180, 2007.

PUIG-PEÑA, Y.; DEL-RISCO-RÍOS, C.A.; ÁLVAREZ-RIVERA, V.P.; LEIVA-CASTILLO, V.; GARCÍA-NENINGER, R. Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, v.43, n.1, p.23-27, 2012.

ROCHA, J.F.M. **Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola**. Bragança, Portugal, 2013. 111f. Dissertação de Mestrado - Instituto Politécnico de Bragança.

SANTOS, L.O.; SILVEIRA, N.F.A.; LEITE, R.S.F.; BORGUINI, R.G. Avaliação microbiológica do pólen apícola comercializado no estado de São Paulo. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4, Campinas, 2010. **Anais eletrônicos**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2010. Disponível em: <[www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010](http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010)>. Acesso em: 23 mar. 2013.

TEIXEIRA, A.C.P.; MARINI, M.M.; NICOLI, J.R.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R.P.; LACHANCE, M.; ROSA, C.A. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, suppl.1, p.339-343, 2003.

VASQUEZ, Y. Infant botulism: a review of two cases reported in 2008 from El Paso, Texas. **Journal of Applied Research**, v.9, n.3, p.52-56, 2009.

WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v.2012, p.1-7, 2012.

# CAPÍTULO 7

## EFEITO DAS CONDIÇÕES DE DESIDRATAÇÃO SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO PÓLEN APÍCOLA

(Estudo publicado no periodico *LWT - Food Science and Technology* - ANEXO VII)

### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar os parâmetros físicos, químicos e biológicos e a qualidade microbiológica de amostras de pólen apícola submetidas a diferentes processos de desidratação e, também, correlacionar os resultados. As amostras eram principalmente de *Eucalyptus* (Myrtaceae) e *Eupatorium* (Asteraceae). As condições de desidratação influenciaram nos parâmetros  $L^*a^*b^*$  de cor e no valor biológico. Ao contrário do conteúdo de proteínas e lipídeos, os teores de glicose e frutose não foram afetados. O conteúdo de vitamina E nas amostras desidratadas em estufa com circulação forçada de ar ( $27,2 \pm 0,3$  g/100 g,  $27,5 \pm 0,4$  g/100 g) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que o das amostras liofilizadas ( $37,5 \pm 0,2$  g/100 g,  $53,7 \pm 3,9$  g/100 g). No geral, os resultados foram inconclusivos para o teor de vitaminas do complexo B, minerais e indicadores microbiológicos. Houve uma correlação positiva entre os parâmetros  $L^*$  e  $b^*$  de cor e o teor de fenólicos totais, bem como entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante e antimicrobiana das amostras. Os dados indicam que a liofilização pode ser uma alternativa viável para o processo atual, resultando em produtos com maior valor nutricional e maior atividade biológica.

**Palavras-chave:** métodos de desidratação; pólen apícola; valor nutricional; propriedades biológicas; qualidade microbiológica.

### ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the physical, chemical and biological parameters and the microbiological quality of bee-pollen samples treated with different dehydration processes and to correlate the results. The samples became mainly from *Eucalyptus* (Myrtaceae) and *Eupatorium* (Asteraceae) plants. The

dehydration conditions of the samples influenced the L\*a\*b\* colour parameters and the biological value. Unlike the protein and lipid content, the glucose and fructose content were unaffected. The vitamin E content in oven-dehydrated samples with forced air circulation ( $27.2 \pm 0.3$  g/100 g,  $27.5 \pm 0.4$  g/100 g) was significantly lower ( $P < 0.05$ ) compared with lyophilized samples ( $37.5 \pm 0.2$  g/100 g,  $53.7 \pm 3.9$  g/100 g). Overall, the results were inconclusive for vitamin B complex, minerals and microbiological indicators. There was a positive correlation between the colour parameters L\* and b\* and the total phenolic content, as well as between phenolic content and the antioxidant and antimicrobial capacity. The data indicate that lyophilization might be a viable alternative to the current process, resulting in products with higher nutritional value and biological activity.

**Keywords:** dehydration methods; bee-pollen; nutritional value; biological properties; microbiological quality.

## 1 INTRODUÇÃO

O pólen apícola é o resultado da aglutinação de centenas de grãos de pólen colhidos das flores pelas abelhas, que adicionam secreções salivares e pequenas porções de néctar e/ou mel (Brasil, 2001; CAMPOS *et al.*, 2008). Contém quantidades variáveis de açúcares redutores e não redutores (QIAN *et al.*, 2008), fibras (FUNARI *et al.*, 2003), aminoácidos essenciais (PARAMÁS *et al.*, 2006), ácidos graxos saturados e insaturados (HUMAN; NICOLSON, 2006; YANG *et al.*, 2013), minerais (MORGANO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013), vitaminas (OLIVEIRA *et al.*, 2009; MELO; ALMEIDA-MURADIAN, 2010; ARRUDA *et al.*, 2013) e metabólitos bioativos, como os compostos fenólicos (CARPES *et al.*, 2008). A estes últimos, são atribuídas propriedades farmacológicas, como ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antialérgica e hepatoprotetora (CAMPOS *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2012; PASCOAL *et al.*, 2014).

Os apicultores coletam o pólen apícola na entrada das colmeias e transportam para as unidades de beneficiamento, onde realizam etapas de pré-limpeza, congelamento, descongelamento, desidratação, limpeza, embalagem, transporte e comercialização. O propósito da desidratação é aumentar a vida de

prateleira do produto que, quando *in natura*, contém 20-30 g/100 g de água (umidade) e atividade de água de 0,66 a 0,82, sendo esta uma matriz favorável para proliferação de micro-organismos e para reações químicas e enzimáticas (CAMPOS *et al.*, 2008; FRANCO; LANDGRAF, 2009; ROCHA, 2013). A legislação brasileira estabelece temperatura máxima de 42°C durante a desidratação e, ao final desta, o produto passa a ser designado como “pólen apícola desidratado” (BRASIL, 2001).

O uso de estufa elétrica para desidratar o pólen apícola pode estar relacionado ao custo deste equipamento, visto que outras alternativas eficientes de conservação, como a liofilização, são pouco utilizadas. Uma vez que a influência das condições de desidratação sobre a qualidade do pólen apícola ainda é pouco compreendida, o objetivo deste estudo foi comparar o uso de estufa elétrica com circulação forçada de ar e o uso de liofilização, sobre características físico-químicas e biológicas e sobre a qualidade microbiológica do pólen apícola, bem como correlacionar os resultados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

Amostras de pólen apícola, produzidas por abelhas *Apis mellifera*, foram coletadas em um apiário localizado no Estado de São Paulo, durante os meses de abril e setembro de 2012. A análise polínica do pólen apícola coletado em abril indicou predominância do gênero *Eucalyptus*, com participação de *Asteraceae/Linguliflora* e *Mimosa caesalpiniaefolia*. Na parcela coletada em setembro, predominou o gênero *Eupatorium*, com participação de *Piper*, *Elephantopus*, *Eucalyptus*, *Cyperaceae* e *Anacardiaceae*. A análise polínica foi realizada conforme método descrito por Barth *et al.* (2010).

Imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas a -20°C no próprio apiário e, então, enviadas para a MN Própolis (Mogi das Cruzes/SP), uma empresa de alimentos que comercializa pólen apícola desidratado em estufa elétrica e que, recentemente, implementou o processo de desidratação por liofilização. Cada unidade amostral foi dividida em duas parcelas e estas foram processadas conforme

condições de rotina da empresa. Algumas parcelas foram congeladas a  $-40^{\circ}\text{C}$  e, então, desidratadas em liofilizador a vácuo (FD-TFD-80LF4, Edwards), por 18 h. Outras foram descongeladas à temperatura ambiente e desidratadas em estufa elétrica com circulação forçada de ar (ESA 1368, Sercon), a  $42^{\circ}\text{C}$ , por 24 a 52 h. Neste último caso, a variação no tempo de processamento deve-se ao fato de que as bandejas foram retiradas a medida em que a umidade no produto atingiu valor próximo ao observado na amostra submetida à liofilização (6-8 g/100 g).

As amostras foram embaladas a vácuo em embalagens de polietileno de qualidade alimentar e, então, enviadas para o Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo/Brasil, onde foram armazenadas sob temperatura ambiente e abrigo da luz por 30 dias. Parte do experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

Previamente as análise, as amostras foram trituradas em moinho analítico para granulometria de 0,595 mm.

## 2.2 NITROGÊNIO TOTAL - TEOR DE PROTEÍNAS

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, a partir de 100 mg de amostra (ALMEIDA-MURADIAN; ARRUDA; BARRETO, 2012), e convertido em proteína bruta utilizando fator de correção de 6,25 (IAL, 2008).

## 2.3 EXTRATO ETÉREO – TEOR DE LIPÍDEOS

O teor de lipídeos foi determinado por extração intermitente em Soxhlet, com éter etílico, de 2 g de amostra (ALMEIDA-MURADIAN; ARRUDA; BARRETO, 2012).

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE

Os ensaios de extração e quantificação dos açúcares glicose e frutose foram realizados conforme métodos descritos por Almeida-Muradian, Arruda e Barreto

(2012), em um cromatógrafo Shimadzu (Software LC Solution V.1.25 SP2) com bomba (LC-20AT), injetor automático (SIL-20A), detector de fluorescência (RF-10AXL) e detector de índice de refração (RID 10 A), equipado com coluna de fase normal NH<sub>2</sub> (Shim-pack CLC-Sil 5 μm, 250 x 4,6 mm, com pré-coluna de 5 μm, 10 cm x 4,6 mm). A fase móvel era composta por acetonitrila:água (85:15, mL:mL) e foi utilizada com fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μL. Foi utilizada a detecção do índice de refração. A temperatura da coluna foi mantida em 40°C. Para quantificação dos açúcares foram construídas curvas de calibração com, pelo menos, cinco concentrações de cada padrão.

## 2.5 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

Os minerais foram extraídos por digestão ácida (ácido nítrico:ácido perclórico, 2:1, mL:mL), em sistema aberto, de 500 mg de amostra (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). As concentrações de sódio (Na), cálcio (Ca), potássio (K), cobre (Cu), magnésio (Mg) e zinco (Zn) foram determinadas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado - *inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)*, conforme procedimento descrito por Morgano *et al.* (2012). O equipamento operou nos seguintes parâmetros: potência aplicada de 1,45 kW; vazão do gás do plasma de 12 L/min; vazão do gás auxiliar de 1 L/min; vazão do gás de nebulinização de 1 L/min e vazão de amostra de 2 mL/min. O comprimento de onda foi o específico para cada elemento e uma curva de calibração foi preparada com diferentes concentrações de cada mineral.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DE VITAMINA E

O teor de α-tocopherol (vitamina E) foi determinado conforme procedimento descrito por Melo e Almeida-Muradian (2010), utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Software LC Solution V.1.25 SP2) com bomba (LC-20AT), injetor automático (SIL-20A) e detector de fluorescência (RF-10AXL), equipado com uma coluna de sílica [Shimadzu CLC-Sil Shim-pack (M) 25 cm] e programado para 295 nm de excitação e 330 nm de emissão. A fase móvel era composta por hexano e álcool isopropílico

(99:1, mL:mL) e foi utilizada com fluxo de 1,5 mL/min, após ter sido filtrada e desgaseificada em sonificador. O  $\alpha$ -tocopherol foi identificado por comparação do tempo de retenção com o do padrão sintético e a quantificação foi realizada construindo uma curva analítica com, pelo menos, cinco concentrações do padrão.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS DO COMPLEXO B

Arruda *et al.* (2013) validaram métodos para extração e identificação de vitaminas do complexo B em pólen apícola. Estes métodos, os parâmetros de operação e o mesmo equipamento foram utilizados para determinar os valores de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), niacina e nicotinamida (vitamina PP ou B<sub>3</sub>), piridoxina, piridoxal e piridoxol (vitamina B<sub>6</sub>).

## 2.8 EXTRATOS ETANÓLICOS (ETE)

Os ETE foram preparados com base no método descrito por Carpes *et al.* (2008), com modificações. Os compostos foram extraídos de 2 g de amostra com 25 mL de etanol a 70%, em banho-maria a 70°C, por 30 min, com agitação de 105 rpm. Então, procedeu-se a filtragem em papel qualitativo (porosidade: 3 micras) para um balão aferido de 25 mL e o volume foi acertado com etanol a 70%. O extrato foi armazenado em vidro âmbar sob temperatura de -4°C, até o momento da realização das análises. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

## 2.9 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

O teor de fenólicos totais foi determinado conforme descrito por Carpes *et al.* (2008), com as seguintes modificações: os ETE foram diluídos em solução de etanol a 70% e não em água; todas as leituras foram realizadas com temperatura de trabalho de 20°C. Uma curva padrão de ácido gálico foi construída e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de pólen apícola desidratado, em base seca.

## 2.10 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Dois métodos foram utilizados para determinar a capacidade antioxidante das amostras: o método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e o método da capacidade de absorção do radical oxigênio – *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC). No método DPPH é aferida a redução deste radical ao receber um elétron, ou um átomo de hidrogênio, do antioxidante. O método ORAC indica a capacidade, do antioxidante, de desativar radicais peroxil gerados a partir do 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)diidrocloreto (AAPH).

### 2.10.1 Método DPPH

Para esta determinação foi adotado o método descrito por Brand-Willians, Cuvelier, and Berset (1995), com modificações. Uma alíquota de 1,5 mL de solução etanólica do radical DPPH• (absorbância entre 0,600-0,700, a 517 nm) foi adicionada a tubo de ensaio contendo 0,5 mL de ETE diluído em etanol a 70%. Os tubos foram incubados, à temperatura ambiente e abrigo da luz, por 30 min. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (UV 1650 PC, Shimadzu) com absorbância a 517 nm e temperatura de 20°C. Diferentes diluições foram preparadas para cada ETE, e o percentual de descoloração (PD) foi calculado conforme a fórmula proposta por Mensor et al. (2001):

$$PD (\%) = \{1 - [Abs_{amostra} - Abs_{branco} / Abs_{controle}]\} \times 100$$

Onde:  $Abs_{amostra}$  = absorbância da amostra,

$Abs_{branco}$  = absorbância do branco, com amostra e metanol,

$Abs_{controle}$  = absorbância controle, com metanol e sem amostra.

Com soluções de Trolox® em concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100 µmol/L, preparou-se uma curva padrão de concentração  $\times$  PD. Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de Trolox® (TE) por g de pólen apícola desidratado.

### 2.10.2 Método ORAC

Neste caso, foi adotado o método descrito por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) com as adaptações propostas por Huang, Ou e Prior (2005). Os ETE foram

diluídos em etanol a 70% e, então, uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  foi analisada com fluoresceína a  $40 \times 10^{-9}$  mol/L e AAPH a 0,153 mol/L, em uma leitora de placas (Synergy HT – Bio Tek Instruments), com temperatura de trabalho a 37°C. Soluções de Trolox<sup>®</sup> em concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100  $\mu\text{mol/L}$  foram preparadas para construção de uma curva padrão. O valor relativo de ORAC foi calculado com base na equação de regressão linear entre a concentração de Trolox<sup>®</sup> e a área sob a curva de decréscimo da fluorescência gerada automaticamente pelo equipamento. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox<sup>®</sup> (TE) por g de pólen apícola desidratado.

## 2.11 CAPACIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

O percentual de inibição da enzima hialuronidase foi utilizado como medida indireta da capacidade anti-inflamatória das amostras. Foi utilizado o método descrito por Silva *et al.* (2012), a partir de extratos metanólicos preparados como descrito por Morais *et al.* (2011). O sistema reacional contou com 50  $\mu\text{L}$  do extrato e 50  $\mu\text{L}$  ( $5.833 \times 10^{-6}$  kat) de enzima hialuronidase (Sigma-Aldrich, Tipo IV-S: bovino).

## 2.12 CAPACIDADE ANTIMICROBIANA

A capacidade antimicrobiana das amostras foi determinada frente a bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922<sup>TM</sup>; *E. coli* ESA72; *Klebsiella* ATCC BAA1705<sup>TM</sup>; *Klebsiella* ESA61), bactérias Gram positivas (*Streptococcus pyogenes* ATCC 12344<sup>TM</sup>; *S. pyogenes* ESA12; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923<sup>TM</sup>; *S. aureus* ESA54) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 60193<sup>TM</sup>; *C. albicans* ESA109). Os micro-organismos foram isolados de fluidos biológicos e identificados no Centro Hospitalar do Nordeste, Bragança, Portugal, semeados em meio Müeller-Hinton com glicerol e, então, armazenados sob temperatura de -70°C.

No momento da análise, as bactérias foram reativadas em ágar nutriente ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 24 h) e as leveduras em *Yeast Nitrogen Base* em meio sólido ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 48h). O inóculo foi transferido para erlenmayer contendo cloreto de sódio a 0,85% e

a concentração padronizada para turbidez 0,5 na escala *MacFarland*, medida em espectrofotômetro (Varian UV- Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan) a 580 nm, para bactérias, e a 640 nm, para leveduras. Padronizou-se a suspensão de células em  $10^4$  CFU/mL. Em seguida, os testes foram realizados conforme procedimento descrito por Morais et al. (2011). Fluconazol e gentamicina foram utilizados como controle positivo. Os resultados foram expressos em concentração mínima inibitória (CMI), definida como a menor concentração de extrato de pólen apícola capaz de inibir o crescimento visível de micro-organismos.

### 2.13 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

As contagens de bolores e leveduras (IPQ, 1985), micro-organismos aeróbios mesófilos (IPQ, 2002) e psicrotróficos (IPQ, 1987) foram realizadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por g de pólen apícola desidratado (UFC/g). O número mais provável de coliformes totais foi determinado em kit SimPlate da BioControl (AOAC, 2000), e os resultados foram expressos em número mais provável por g de pólen apícola desidratado (MPN./g).

### 2.14 PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DE COR

Os parâmetros instrumentais de cor foram determinados por refletância em equipamento ColorQuest XE (Hunterlab, número de série: CQX 2329), operando na escala CIE  $L^*a^*b^*$  ( $L^*$ : 0 a 100,  $a^*$ : - azul a + vermelho, e  $b^*$ : - verde a + amarelo) com Software Universal V4.10. Cada amostra foi analisada em cubeta de quartzo de 50 mm e os resultados expressos em coordenadas  $L^*a^*b^*$ .

### 2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. Para avaliar o efeito do tratamento, a comparação foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e os dados comparados

posteriormente (post hoc) dois a dois pelo teste não paramétrico de Mann Whitney para cada variável. A relação entre as variáveis foi avaliada pela correlação de Spearman. Em todas as comparações considerou-se nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros físico-químicos das amostras. Pesquisadores indicam que, no pólen apícola desidratado, o teor de proteínas pode variar de 10 a 45 g/100 g, frutose de 12 a 24 g/100 g, glicose de 7 a 22 g/100 g, lipídeos de 1 a 13 g/100 g e cinzas de 0,5 a 6 g/100 g (CAMPOS *et al.*, 2008; QIAN *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2012; ARRUDA *et al.*, 2013). Os teores de lipídeos e de glicose observados nas amostras do presente estudo foram consistentes com os valores citados acima. Por outro lado, o teor de proteínas foi abaixo de 10 g/100 g e o de frutose foi acima de 24 g/100 g nas amostras coletadas em setembro, o que pode estar relacionado a origem botânica deste produto (CAMPOS *et al.*, 2008).

Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no conteúdo de frutose e glicose entre os tratamentos. Estes carboidratos são, possivelmente, estáveis sob ambas as condições aplicadas. O teor de proteínas foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) nas amostras desidratadas em estufa, indicando que o aquecimento (mesmo a temperaturas moderadas) e a presença de gases (tais como o oxigênio) podem induzir perdas destes compostos. O conteúdo de lipídeos foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nas amostras liofilizadas, possivelmente porque as condições de processamento promovem alterações na estrutura dos grãos, o que facilita, ou não, a extração dos compostos pelo solvente. De acordo com Domínguez-Valhondo *et al.* (2011), um teor maior de lipídeos é extraído de pólen apícola após ser desidratado por liofilização, em comparação ao que é extraído do produto submetido a desidratação em estufa com aquecimento.

Em estudos prévios com amostras de pólen apícola desidratado, diferentes quantidades de K (3,2-20 g/kg), Ca (0,2-3,5 g/kg), Mg (0,2-3 g/kg), Na (1-862 mg/kg), Zn (30-250 mg/kg) and Cu (2-20 mg/kg) foram observadas (FUNARI *et al.*, 2003; CARPES *et al.*, 2009; BOGDANOV, 2012; MORGANO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013). Os valores identificados no presente estudo se enquadram nas faixas citadas,

exceto um dos valores de K ( $2,6 \pm 0,1$  g/kg). O teor de minerais pode variar de acordo com a origem floral do grão de pólen que compõe o pólen apícola, e de condições de interferam no crescimento da planta, como o tipo de solo e a origem geográfica (CARPES *et al.*, 2009).

**Tabela 1.** Parâmetros instrumentais de cor e valor nutricional de pólen apícola desidratado em liofilizador ou estufa com aquecimento e circulação forçada de ar.

Parâmetros	Período de coleta					
	Abril/2012		Setembro/2012			
	Estufa	Liofilizador	Estufa	Liofilizador		
<b>Inst. de Cor</b>	<b>L*</b> (0-100)	51,1 ± 0,4 <sup>B</sup>	58,4 ± 0,4 <sup>A</sup>	42,8 ± 1,8 <sup>b</sup>	49,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	
	<b>a*</b> (- or +)	8,5 ± 0,1 <sup>A</sup>	8,4 ± 0,1 <sup>A</sup>	11,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	
	<b>b*</b> (- or +)	48,1 ± 0,3 <sup>B</sup>	56,1 ± 0,3 <sup>A</sup>	43,7 ± 1,9 <sup>b</sup>	53,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	
<b>Proteínas</b> (g/100g)		10,7 ± 0,1 <sup>B</sup>	11,4 ± 0,5 <sup>A</sup>	8,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	9,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	
<b>Lipídeos</b> (g/100g)		7,6 ± 0,1 <sup>B</sup>	8,2 ± 0,2 <sup>A</sup>	6,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	
<b>Glicose</b> (g/100g)		13,3 ± 0,8 <sup>A</sup>	14,9 ± 0,7 <sup>A</sup>	18,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	18,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	
<b>Frutose</b> (g/100g)		18,7 ± 1,4 <sup>A</sup>	21,1 ± 1,3 <sup>A</sup>	26,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	26,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	
<b>Minerais</b>	<b>Ca</b> (g/kg)	1,3 ± 0,0 <sup>A</sup>	1,2 ± 0,0 <sup>B</sup>	1,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	
	<b>K</b> (g/kg)	5,2 ± 0,1 <sup>A</sup>	5,2 ± 0,1 <sup>A</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	
	<b>Mg</b> (g/kg)	0,9 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>B</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	
	<b>Na</b> (mg/kg)	50,2 ± 1,0 <sup>A</sup>	41,3 ± 1,2 <sup>B</sup>	32,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	30,4 ± 2,0 <sup>a</sup>	
	<b>Zn</b> (mg/kg)	105,8 ± 3,5 <sup>A</sup>	103,3 ± 1,0 <sup>A</sup>	63,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	96,2 ± 3,2 <sup>a</sup>	
	<b>Fe</b> (mg/kg)	13,3 ± 0,0 <sup>A</sup>	13,1 ± 0,0 <sup>B</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>b</sup>	9,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	
	<b>Mn</b> (mg/kg)	27,5 ± 0,4 <sup>B</sup>	37,5 ± 0,2 <sup>A</sup>	27,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	53,7 ± 3,9 <sup>a</sup>	
	<b>Cu</b> (mg/kg)	1,3 ± 0,2 <sup>A</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>A</sup>	0,6 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	
	<b>Vitaminas</b>	<b>α-tocoferol</b> (μg/g)	0,6 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>B</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>
		<b>tiamina</b> (mg/100g)	2,6 ± 0,1 <sup>A</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>B</sup>	1,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,0 <sup>a</sup>
		<b>riboflavina</b> (mg/100g)	3,2 ± 0,1 <sup>A</sup>	3,7 ± 1,0 <sup>A</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>niacina</b> (mg/100g)		0,6 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>B</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	
<b>nicotinamida</b> (mg/100g)		3,8 ± 0,1 <sup>A</sup>	3,6 ± 1,0 <sup>A</sup>	1,9 ± 0,0 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	
<b>piridoxina</b> (mg/100g)		0,2 ± 0,1 <sup>A</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	

Letras maiúsculas representam a comparação entre os tratamentos aplicados nas amostras coletadas em abril e letras minúsculas nas amostras coletadas em setembro. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula ou pela mesma letra minúscula são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ).

A influência dos tratamentos sobre o conteúdo de Ca, K, Mg, Na, Zn e Cu foi inconclusiva. Houve correlação positiva entre o teor de Zn e a capacidade antioxidante ( $r=0,830$ ,  $p=0,001$ ), assim como entre o teor de Cu e a capacidade antioxidante ( $r=0,769$ ,  $p=0,003$ ), por ambos os métodos (DPPH e ORAC), entretanto, Cu e Zn não podem ser considerados compostos antioxidantes. Estes minerais são co-fatores da cobre-zinco superóxido dismutase (Cu-Zn SOD), uma importante enzima antioxidante já relatada em plantas (LEE *et al.*, 2007), de modo que estes minerais podem ser indicadores de presença de Cu-Zn SOD nas amostras.

O teor de vitamina E foi menor ( $p<0,05$ ) nas amostras desidratadas em estufa. De acordo com Miquel *et al.* (2004), fatores como luz, oxigênio e temperatura são responsáveis pela degradação dos tocoferóis em alimentos. No Brasil, estudos de quantificação de  $\alpha$ -tocoferol em pólen apícola foram realizados apenas com amostras desidratadas em estufa a 42°C. Sob esta condição, o teor de vitamina E variou de 4,7 a 113,9  $\mu\text{g/g}$  (OLIVEIRA *et al.*, 2009; MELO; ALMEIDA-MURADIAN, 2010; SATTLER, 2013). A análise de correlação indicou que o teor de vitamina E estava fortemente correlacionado com o parâmetro  $b^*$  de cor ( $r=0,65$ ,  $p<0,05$ ), portanto, a medida desta coordenada poderia ser utilizada para presumir a presença de  $\alpha$ -tocoferol.

O efeito do tratamento sobre o teor de vitaminas do complexo B foi inconclusivo. Embora pesquisadores tenham sugerido que o aquecimento dos alimentos possa provocar perdas destas vitaminas (SUCUPIRA; XEREZ; SOUZA, 2012), tal fato não foi observado. Estudos com amostras de pólen apícola desidratado indicam variações nos teores de tiamina (0,5-1,8 mg/100 g), riboflavina (0,4-2,6 mg/100 g), niacina (0,7-3,9 mg/100 g), nicotinamida (2,4-10,7 mg/100 g), piridoxina (0,3-0,9 mg/100 g), piridoxal (0,1-6,7 mg/100 g) and piridoxol (0,1-0,2 mg/100g), de acordo com a origem botânica das amostras (ARRUDA *et al.*, 2013; SOUZA, 2014). Nota-se que os valores observados no presente estudo são semelhantes aos descritos na literatura. É importante considerar que uma porção de 25 g das amostras contém, pelo menos, 50% da ingestão diária recomendada de vitamina B<sub>6</sub> (1,3 mg/day, homens e mulheres, 31-50 anos) (USDA, 1998).

Houve variações nos parâmetros instrumentais  $L^*$  e  $b^*$  de cor de acordo com as condições de processamento. A influência do tratamento no parâmetro  $a^*$  foi observada apenas nas amostras coletadas em setembro. Os valores do parâmetro  $L^*$  indicam que as amostras tendem ao claro (valores acima de 50). Os valores das

coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  apontam uma tendência das amostras às tonalidades vermelha e amarela, visto que predominaram valores positivos para estas coordenadas. Visualmente, era nítida a predominância da cor amarela no pólen apícola desidratado após a trituração, portanto, era esperado a prevalência de valores positivos de  $b^*$ . Menores valores de  $b^*$  e maiores de  $a^*$ , nas parcelas submetidas a estufa, podem estar relacionados a ocorrência de reações pelo uso aquecimento e de circulação forçada de ar. Silva, Rosa e Villas-Boas (2009) mencionam que o aquecimento pode causar a oxidação de algumas substâncias, como os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são substâncias bioativas, não sintetizadas pelo organismo humano, de ação metabólica ou fisiológica específica e que, se presentes regularmente na dieta, contribuem para a prevenção de doenças (HORST; LAJOLO, 2011). São metabólitos secundários dos vegetais, cujos os perfis são espécie-específicos (CAMPOS *et al.*, 2008). No pólen apícola desidratado, o teor de fenólicos totais pode variar de 5,4 a 132,4 mg GAE/g (CARPES *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2010; VECCHIA, 2010; MORAIS *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2012), deste modo, os valores observados no presente estudo são consistentes com a literatura consultada.

As condições de desidratação influenciaram no teor de fenólicos totais (Tabela 2), sendo que os menores valores ( $p < 0,05$ ) foram observados nas amostras submetidas à desidratação em estufa. Tal fato pode estar relacionado com a atividade de enzimas específicas, tais como a polifenol-oxidase e a peroxidase. No processo de liofilização as amostras estavam congeladas quando processadas, ao passo que as parcelas desidratadas em estufa foram previamente descongeladas. O congelamento e descongelamento de um alimento podem causar danos celulares e, conseqüentemente, a liberação de enzimas capazes de oxidar compostos fenólicos (SILVA; ROSA; VILLAS-BOAS, 2009).

Pelo método DPPH, a capacidade antioxidante do pólen apícola desidratado pode variar de 135 a 2.814  $\mu\text{mol TE/g}$  (MARGHITAS *et al.*, 2009). Os resultados são, comumente, apresentados em  $\text{EC}_{50}$  (concentração mínima de extrato de amostra necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%) (CARPES *et al.*, 2008; CARPES *et al.*, 2009; CHANTARUDEE *et al.*, 2012), dificultando a comparação entre estudos. Arruda (2013) determinou a capacidade antioxidante pelo método ORAC e encontrou valores de 133 a 576  $\mu\text{mol TE/g}$  de pólen apícola

desidratado. De acordo com Marghitas *et al.* (2009), a ação dos compostos antioxidantes varia conforme o protocolo de medição, portanto, é importante utilizar mais de um método de análise, envolvendo diferentes condições de reação e mecanismos de ação.

**Tabela 2.** Teor de fenólicos totais e potencial biológico de pólen apícola desidratado em liofilizador ou estufa com aquecimento e circulação forçada de ar.

Parâmetros	Período de coleta				
	Abril/2012		Abril/2012		
	Estufa	Liofilizador	Estufa	Liofilizador	
<b>Fenólicos totais</b> (mg GAE/g)	19,7 ± 0,3 <sup>B</sup>	21,4 ± 0,1 <sup>A</sup>	9,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	10,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	
<b>Capacidade anti-inflamatória</b> (% de inibição)	7,8 ± 0,4 <sup>B</sup>	12,6 ± 1,8 <sup>A</sup>	13,6 ± 2,6 <sup>b</sup>	17,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	
<b>Capacidade antioxidante</b>	<b>DPPH</b>	63,9 ± 0,5 <sup>B</sup>	81,1 ± 3,7 <sup>A</sup>	31,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	41,1 ± 1,0 <sup>a</sup>
	<b>ORAC</b>	481,3 ± 6,1 <sup>B</sup>	559,3 ± 18,3 <sup>A</sup>	310,1 ± 10,3 <sup>b</sup>	367,8 ± 11,3 <sup>a</sup>
<b>Capacidade antimicrobiana<sup>1</sup></b> (CIM)	<b>Sp ESA12</b>	3,5 ± 0,8 <sup>A</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>A</sup>	4,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,7 <sup>a</sup>
	<b>Sp 12344</b>	2,9 ± 0,7 <sup>A</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>A</sup>	4,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,5 <sup>b</sup>
	<b>Sa ESA54</b>	3,8 ± 0,6 <sup>A</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>A</sup>	6,1 ± 1,0 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,8 <sup>b</sup>
	<b>Sa 25923</b>	3,2 ± 0,6 <sup>A</sup>	2,3 ± 0,3 <sup>A</sup>	4,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,6 <sup>a</sup>
	<b>Ec ESA72</b>	5,8 ± 0,8 <sup>A</sup>	4,6 ± 0,4 <sup>A</sup>	6,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,7 <sup>a</sup>
	<b>Ec 25922</b>	4,3 ± 0,5 <sup>A</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>B</sup>	4,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,2 <sup>b</sup>
	<b>K spp</b>	6,2 ± 0,9 <sup>A</sup>	4,5 ± 0,6 <sup>B</sup>	7,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,6 <sup>b</sup>
	<b>K BAA1705</b>	5,9 ± 0,8 <sup>A</sup>	3,4 ± 1,0 <sup>B</sup>	6,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>Ca ESA109</b>	25,3 ± 2,5 <sup>A</sup>	22,1 ± 2,6 <sup>A</sup>	27,2 ± 4,0 <sup>a</sup>	21,9 ± 4,0 <sup>a</sup>	
<b>Ca 60193</b>	22,6 ± 0,9 <sup>A</sup>	18,8 ± 0,9 <sup>B</sup>	22,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	17,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	

Letras maiúsculas representam a comparação entre os tratamentos aplicados nas amostras coletadas em abril e letras minúsculas nas amostras coletadas em setembro. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula ou pela mesma letra minúscula são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Sp: *Streptococcus pyogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; K: *Klebsiella*; Ca: *Candida albicans*.

A capacidade antioxidante (por ambos os métodos) foi maior nas amostras liofilizadas ( $p < 0,05$ ). A análise dos coeficientes de correlação indicou forte correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos totais (DPPH:  $r = 0,958$ ,  $p < 0,001$ ; ORAC:  $r = 0,916$ ,  $p < 0,001$ ). A correlação entre o teor de fenólicos e possíveis propriedades biológicas é controversa em amostras deste alimento. Pascoal *et al.* (2014) não encontraram correlação, enquanto Carpes *et al.* (2008) encontraram correlação positiva. Pode ser que haja influência não da concentração total destas substâncias na amostra, mas da presença de compostos fenólicos específicos, e que estariam relacionados com a origem botânica do pólen apícola.

O percentual de inibição da enzima hialuronidase foi maior ( $p < 0,05$ ) nas amostras liofilizadas, assim, pode-se dizer que estas têm maior potencial anti-inflamatório. As percentagens de inibição ( $7,8 \pm 0,4$  a  $17,9 \pm 1,4\%$ ) foram menores que as relatadas em estudo realizado por Pascoal *et al.* (2014) com amostras de pólen apícola desidratado ( $23,6 \pm 2,2$  a  $25,2 \pm 3,2\%$ ), provavelmente em razão do diferente perfil polínico das amostras.

Quanto a capacidade antimicrobiana, houve variações entre os tratamentos de acordo com o micro-organismo e, quando esta ocorreu, prevaleceu maior ação ( $p < 0,05$ ) nas amostras liofilizadas. Atividade contra bactérias e leveduras foi observada em todas as amostras, embora as bactérias tenham sido mais sensíveis. Graikou *et al.* (2011) analisaram pólen apícola desidratado produzido na Grécia e também observaram maior resistência das leveduras. A análise estatística apontou correlação negativa entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antimicrobiana contra bactérias (Tabela 3). Deve-se considerar que, embora a correlação seja negativa, a interpretação desta correlação positiva, isto porque quanto menor a CIM, menor a concentração pólen apícola desidratado necessária para inibir o crescimento microbiano. No geral, as condições de desidratação do pólen apícola influenciam na capacidade antimicrobiana das amostras contra *E. coli* 25922, *Klebsiella* spp, *Klebsiella* BAA1705 e *C. albicans* 60193.

Dada a influência das condições de processamento sobre o teor de fenólicos totais e, ainda, diante da correlação entre este teor e a capacidade antimicrobiana contra bactérias, pode-se inferir que a menor capacidade antimicrobiana observada nas amostras desidratadas em estufa esteja relacionada ao menor teor de compostos de fenólicos nestas amostras. Ademais, outros estudos serão necessários para entender a influência do tratamento na capacidade antimicrobiana contra leveduras.

Houve correlação entre os parâmetros instrumentais de cor e o teor de fenólicos totais, entre estes parâmetros e a capacidade antimicrobiana contra bactérias (exceto *E. coli* 25922 e *Klebsiella* BAA1705), bem como entre estes parâmetros e a capacidade antioxidante (por ambos os métodos) das amostras (Tabela 3). Em amostras de pólen apícola desidratado, este parece ser o primeiro estudo em que se buscou a correlação entre os valores  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e o teor de fenólicos e entre estes valores e as propriedades bioativas. A determinação dos parâmetros instrumentais de cor é um método simples e rápido, assim, a existência

de uma correlação pode auxiliar na seleção de amostras. Em méis, a avaliação da cor já é utilizada para indicar a origem botânica de algumas amostras (KUS *et al.*, 2014).

**Tabela 3.** Coeficientes de correlação de Speaman (P-valor) entre parâmetros instrumentais de cor, fenólicos totais e potencial farmacológico das amostras de pólen apícola desidratado.

	Ins. cor L*	Ins. cor a*	Ins. cor b*	Fenólicos	DPPH	ORAC	Inibição hial.
<b>Ins. cor L*</b>	1						
<b>Ins. cor a*</b>	-0,958 P < 0,001	1					
<b>Ins. cor b*</b>	0,741 P = 0,006	-0,629 P = 0,028	1				
<b>Fenólicos</b>	0,972 P < 0,001	-0,902 P < 0,001	0,727 P = 0,007	1			
<b>DPPH</b>	0,951 P < 0,001	-0,930 P < 0,001	0,727 P = 0,007	0,958 P < 0,001	1		
<b>ORAC</b>	0,944 P < 0,001	-0,930 P < 0,001	0,755 P = 0,005	0,916 P < 0,001	0,958 P < 0,001	1	
<b>Inibição hial.</b>	-0,315 P = 0,319	0,371 P = 0,236	0,259 P = 0,417	-0,371 P = 0,236	-0,308 P = 0,331	-0,301 P = 0,342	1
<b>Sp ESA12</b>	-0,811 P = 0,001	0,727 P = 0,007	-0,734 P = 0,007	-0,818 P = 0,001	-0,783 P = 0,003	-0,762 P = 0,004	0,266 P = 0,404
<b>Sp 12344</b>	-0,774 P = 0,003	0,690 P = 0,013	-0,823 P = 0,001	-0,767 P = 0,004	-0,697 P = 0,012	-0,774 P = 0,003	-0,032 P = 0,923
<b>Sa ESA54</b>	-0,839 P = 0,001	0,846 P = 0,001	-0,720 P = 0,008	-0,825 P = 0,001	-0,846 P = 0,001	-0,748 P = 0,005	0,049 P = 0,880
<b>Sa 25923</b>	-0,755 P = 0,005	0,699 P = 0,011	-0,587 P = 0,045	-0,762 P = 0,004	-0,727 P = 0,007	-0,573 P = 0,051	0,049 P = 0,880
<b>Ec ESA72</b>	-0,727 P = 0,007	0,594 P = 0,042	-0,769 P = 0,003	-0,762 P = 0,004	-0,664 P = 0,018	-0,643 P = 0,024	0,070 P = 0,829
<b>Ec 25922</b>	-0,552 P = 0,063	0,413 P = 0,183	-0,825 P = 0,001	-0,587 P = 0,045	-0,490 P = 0,106	-0,580 P = 0,048	-0,098 P = 0,762
<b>K spp</b>	-0,643 P = 0,024	0,636 P = 0,026	-0,783 P = 0,003	-0,643 P = 0,024	-0,699 P = 0,011	-0,720 P = 0,008	-0,070 P = 0,829
<b>K BAA1705</b>	-0,594 P = 0,042	0,441 P = 0,152	-0,916 P < 0,001	-0,636 P = 0,026	-0,587 P = 0,045	-0,643 P = 0,024	-0,196 P = 0,542
<b>Ca ESA109</b>	-0,392 P = 0,208	0,252 P = 0,430	-0,573 P = 0,051	-0,476 P = 0,118	-0,357 P = 0,255	-0,308 P = 0,331	-0,196 P = 0,542
<b>Ca 60193</b>	-0,287 P = 0,365	0,217 P = 0,498	-0,750 P = 0,005	-0,273 P = 0,390	-0,221 P = 0,491	-0,249 P = 0,436	-0,543 P = 0,068

Sp: *Streptococcus pyogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; K: *Klebsiella*; Ca: *Candida albicans*. Significance level ( $\alpha$ ) of 0.05

O crescimento de micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrótrofos, bolores e leveduras e coliformes totais é um indicador das condições de produção,

beneficiamento, armazenamento e distribuição de um alimento (Rocha, 2013). O resultado da análise destes micro-organismos é apresentado na Tabela 4. Quanto a influência do tratamento sobre estes indicadores, nota-se que os resultados foram inconclusivos, isto porque no primeiro ensaio os maiores valores de bolores e leveduras, coliformes totais e aeróbios mesófilos ( $p < 0,05$ ) foram observados nas amostras desidratadas em estufa. Em contrapartida, no segundo ensaio ocorreu o oposto para bolores e leveduras e coliformes totais e nenhuma influência significativa ( $p > 0,05$ ) dos tratamentos sobre o crescimento de aeróbios mesófilos.

Sabe-se que a presença de microrganismos no pólen apícola está relacionada a contaminação do produto ainda na colmeia ou durante o beneficiamento (NOGUEIRA *et al.*, 2012). A hipótese mais provável para os resultados encontrados é a contaminação das amostras entre a retirada da estufa, ou do liofilizador, e o envaze.

**Tabela 4.** População de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e bolores e leveduras em pólen apícola desidratado em liofilizador ou estufa com aquecimento e circulação forçada de ar.

Grupo de micro-organismos	Período de coleta			
	Abril/2012		Abril/2012	
	Estufa	Liofilizador	Estufa	Liofilizador
<b>Coliformes totais</b> (NMP/g)	47 ± 17 <sup>A</sup>	13 ± 5 <sup>B</sup>	123 ± 25 <sup>b</sup>	285 ± 61 <sup>a</sup>
<b>Aeróbios mesófilos</b> (UFC/g)	17 ± 8 <sup>A</sup>	< 10 <sup>B</sup>	< 10 <sup>a</sup>	< 10 <sup>a</sup>
<b>Psicrotróficos</b> (UFC/g)	< 10 <sup>A</sup>	< 10 <sup>A</sup>	< 10 <sup>a</sup>	< 10 <sup>a</sup>
<b>Bolores e leveduras</b> (UFC/g)	99 ± 31 <sup>A</sup>	16 ± 5 <sup>B</sup>	242 ± 52 <sup>b</sup>	935 ± 233 <sup>a</sup>

Letras maiúsculas representam a comparação entre os tratamentos aplicados nas amostras coletadas em abril e letras minúsculas nas amostras coletadas em setembro. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula ou pela mesma letra minúscula são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ).

Houve correlação negativa entre o teor de compostos fenólicos e o número de coliformes totais ( $r = -0,790$ ,  $p = 0,002$ ), bem como entre o teor destes compostos e a contagem de bolores e leveduras ( $r = -0,783$ ,  $p = 0,003$ ). Certos compostos fenólicos podem afetar o crescimento e o metabolismo bacteriano de acordo com a sua concentração no meio (PASCOAL *et al.*, 2014), portanto é possível que os valores destes micro-organismos nas amostras seria, de maneira geral, maior sem a presença destes compostos.

## 4 CONCLUSÃO

O uso de liofilização resultou em amostras com maior teor de proteínas, lipídeos, vitamina E e compostos fenólicos, assim como influenciou nos parâmetros instrumentais de cor. A desidratação em estufa com circulação forçada de ar teve influencia negativa sobre as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, porém, a ação antimicrobiana também esteve relacionada com a sensibilidade do micro-organismo.

Em geral, a liofilização pode ser uma alternativa viável para o processo atual, resultando em pólen apícola desidratado com maior valor nutricional e biológico. A correlação entre os parâmetros de cor  $L^*$   $a^*$   $b^*$  e certas propriedades biológicas deste alimento pode auxiliar na seleção da amostra para experimentos específicos. A qualidade microbiológica do produto não foi afetada pelo tratamento. Em pesquisas futuras, a análise sensorial de amostras tratadas sob estas condições é recomendada, de modo a identificar se a preferência do consumidor é afetada pelo processo de desidratação.

## 5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; ARRUDA, V.A.S.; BARRETO, L.M.R.C. **Manual de Controle de Qualidade do Pólen Apícola**. São Paulo: APACAME, 2012. 28p.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 17. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.

ARRUDA, V.A.S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica**. São Paulo, 2013. 192p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ARRUDA, V.A.S.; SANTOS-PEREIRA, A.A.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n.2, p.100-105, 2013.

BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; OLIVEIRA, E.S.; SILVA, R.A.; MAESTER, F.M.; ANDRELLA, R.R.S.; CARDOZO, G.M.B.Q. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.4, p.893-902, 2010.

BOGDANOV, S. **The bee pollen book: chapter 1**, 2012a. Disponível em: <www.bee-hexagon.net>. Acesso em: 15 fev. 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 2001. Seção 1, p.18.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CARPES, S.T.; PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil, **Química Nova**, v.31, n.7, p.1660-1664, 2008.

CARPES, S.T.; MOURÃO, G.B.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.3, p.220-229, 2009.

CHANTARUDEE, A.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A.; CHANCHAO, C. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.45, p.1-12, 2012.

DOMINGUEZ-VALHONDO, D; GIL, D.B; HERNANDEZ, M.T; GONZALEZ-GOMEZ, D. Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, n.10, p.2204-2211, 2011.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 6.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 182p.

FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; FILHO, H.G.; CURI, P.R.; GOMES DIERCKX, S.M.A.; FUNARI, A.R.M.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Composições Bromatológica e Mineral do Pólen Coletado por Abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.11, n.2, p. 88-93, 2003.

GRAIKOU, K.; KAPETA, S.; ALIGIANNIS, N.; SOTIROUDIS, G.; CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E.; CHINO, L. Chemical analysis of Greek pollen - antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. **Chemistry Central Journal**, v.5, n.33, p.1-9, 2011.

HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. **Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos**, 2011. Disponível em: <www.fcf.usp.br>. Acesso em: 02 abr. 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

HUMAN, H.; NICOLSON, S.W. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). **Phytochemistry**, v.67, n.14, p.1486-1492, 2006.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

IPQ. INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE. **NP 3788. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microorganismos a 30°C**. Costa de Caparica, 2002. 7p.

IPQ. INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE. **NP 2077. Carnes e produtos cárneos. Contagem de Bolores e Leveduras**. Costa de Caparica, 1985. 6p.

IPQ. INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE. **NP 2307. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microorganismos psicrófilos**. Costa de Caparica, 1987. 7p.

KÚS, P.M.; CONGIU, F.; TEPER, D.; SROKA, Z.; JERKOVIC, I.; TUBEROSO, C.I.G. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. **LWT – Food Science and Technology**, v.55, n.1, p.124-130, 2014.

LEE, Y.P.; KIM, S.H.; BANG, J.W.; LEE, H.S.; KWAK, S.S.; KWON, S.Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. **Plant Cell Reports**, v.26, n.5, p.591-598, 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.

MARGHITAS, L.A.; STANCIU, O.G.; DEZMIREAN, D.S.; BOBIS, O.; POPESCU, O.; BOGDANOV, S.; CAMPOS, M.G. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. **Food Chemistry**, v.115, n.3, p.878-883, 2009.

MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. **Química Nova**, v.33, n.3, p.514-518, 2010.

MENEZES, J.D.S.; MACIEL, L.F.; MIRANDA, M.S.; DRUZIAN, J.I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.233-242, 2010.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.127-130, 2001.

MIQUEL, E.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; CLEMENTE, G. Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. **International Dairy Journal**, v.14, n.11, p.1003-1011, 2004.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.5, p.1096-1101, 2011.

MORGANO, M.A.; MARTINS, M.C.T.; RABONATO, L.C.; MILANI, R.F.; YOTSUYANAGI, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, 727-736, 2012.

NOGUEIRA, C.; IGLESIAS, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.11173-11187, 2012.

OLIVEIRA, K.C.L.S.; MORIYA, M.; AZEDO, R.A.B.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; TEIXEIRA, E.W.; ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1099-1102, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4619-4626, 2001.

PARAMÁS, A.M.G; BÁREZ, J.A.G.; MARCOS, C.C.; GARCÍA-VILLANOVA, R.J.; SÁNCHEZ, J.S. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). **Food Chemistry**, v.95, n.1, p.148-156, 2006.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v.63, p.233-239, 2014.

QIAN, W.L.; KHAN, Z.; WATSON, D.G.; FEARNLEY, J. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, n.1, p.78-83, 2008.

ROCHA, J.F.M. **Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola**. Bragança, Portugal, 2013. 111f. Dissertação de Mestrado - Instituto Politécnico de Bragança.

SATTLER, J.A.G. **Quantificação das vitaminas antioxidantes E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A ( $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil**. São Paulo, 2013. 140p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SILVA, J.C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.5, p.1790-1795, 2012.

SILVA, M.V.; ROSA, C.I.L.F.; VILAS-BOAS, E.V.B. Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. **Boletim CEPPA**, v.27, p.83-96, 2009.

SOUZA, B.R. **Quantificação das vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) e vitâmeros das vitaminas B<sub>3</sub> e B<sub>6</sub> em amostras de pólen apícola desidratado provenientes da Região Sul do Brasil**. São Paulo, 2014. 125p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SUCUPIRA, N.R.; XEREZ, A.C.P.; SOUZA, P.H.M. Perdas vitamínicas durante o tratamento térmico dos alimentos. **Científica: ciências biológicas e da saúde**, v.14, n.2, p.121-128, 2012.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline**, 1998. Disponível em: <[http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI//DRI\\_Thiamin/thiamin\\_full\\_report.pdf](http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI//DRI_Thiamin/thiamin_full_report.pdf)>. Acesso em: 15 mai. 2015.

VECCHIA, P.D. **Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola (determinação de compostos fenólicos e flavonóides totais)**, 2010. Disponível em: <[www.eventos.cp.utfpr.edu.br](http://www.eventos.cp.utfpr.edu.br)>. Acesso em: 12 mai. 2011.

YANG, K.; WU, D.; YE, X.; LIU, D.; CHEN, J.; SUN, P. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n.3, p.708-718, 2013.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo permitiu elucidar o perfil físico-químico e propriedades biológicas de um grande número de amostras de pólen apícola desidratado, de modo que é possível selecionar amostras de acordo com características de interesse e conduzir pesquisas mais específicas. Um passo importante seria a análise sensorial dos produtos para identificar a preferência dos consumidores e quais características são determinantes para tal, além de estudos *in vivo* com amostras de elevado valor nutricional ou biológico. Além disso, deve-se avaliar a biodisponibilidade dos minerais presentes neste alimento.

O uso de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas permitiu identificar um grande número de compostos e mais amostras devem ser analisadas na busca por marcadores botânicos ou substâncias bioativas. Seria importante isolar e determinar o potencial apiterapêutico dos metabólitos secundários presentes no pólen apícola desidratado.

Sugere-se que mais estudos sejam realizados com amostras monoflorais, buscando não a influência da origem botânica sobre as características da amostra, mas também a influência do local onde ocorreu a coleta, condições climáticas e de solo e processamento.

# ANEXOS

**ANEXO I - Informações para os Membros da Banca Julgadora de Doutorado****UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Secretaria de Pós-Graduação**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

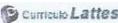
4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior  
Presidente da CPG/FCF/USP

## ANEXO II – Currículo Lattes




---



**Adriane Alexandre Machado de Melo**  
 Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2012016598652735>  
 Última atualização do currículo em 01/10/2015

---

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Medicina Veterinária (2004) e Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (2010), ambos pela Universidade Federal de Goiás, atualmente é doutoranda em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo. Tem experiência em Inspeção de Produtos de Origem Animal, Tecnologia de Carnes e Derivados, Embalagem Ativa, Produção e Processamento de Produtos Apícolas, Análises Químicas, Físicas, Microbiológicas e Sensoriais de Alimentos, identificação e quantificação de compostos bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas. Trabalhou por quatro anos em indústrias frigoríficas, inclusive em um dos maiores complexos industriais da América Latina (Perdigão Agroindustrial Unidade de Rio Verde/GO). Atuou no processo de recepção, abate humanitário e processamento de bovinos, suínos e aves. Foi professora de Tecnologia de Carnes e Derivados. Experiência em gerenciamento, gestão, controle de qualidade.

**(Texto informado pelo autor)**

**Links para Outras Bases:**  
[SciELO - Artigos em texto completo](#) 

---

Dados pessoais

Nome	Adriane Alexandre Machado de Melo
Filiação	Orozimbo Machado de Melo e Joana Alexandre Machado
Nascimento	07/06/1983 - Itajá/GO - Brasil
Carteira de Identidade	4379390 DGPC - GO - 28/09/1999
CPF	978.536.661-87

---

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorado em Ciências dos Alimentos.  
 Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
 com **período sanduíche** em Instituto Politécnico de Bragança, Portugal (Orientador : Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho)  
 Título: Caracterização físico-química, qualidade microbiológica, propriedades biológicas e origem botânica do pólen apícola desidratado  
 Orientador: Ligia Bicudo de Almeida Muradian   
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2008 - 2010** Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
 Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil  
 Título: Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada., Ano de obtenção: 2010  
 Orientador: Robson Maia Geraldine   
 Bolsista do(a): Universidade Federal de Goiás
- 2000 - 2004** Graduação em Medicina Veterinária.  
 Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil  
 Título: Fluxograma de abate e beneficiamento de suínos na empresa Perdigão Agroindustrial Unidade de Rio Verde  
 Orientador: Fabiano José Ferreira de Sant'Ana

---

Formação complementar

- 2015** Curso de curta duração em Redação Acadêmica para Pós-graduação.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2015 - 2015** How to write a Scientific Article.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF/USP, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Métodos para Determinar a Capacidade Antioxidante.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos/ UNICAMP, FEA/ UNICAMP, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.  
ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Didática Básica para Treinamento.  
SENAI - Unidade Vila Canaã, Goiânia/ GO, SENAI, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Fábrica de Ração.  
Associação Goiana de Avicultura, AGA, Goiania, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Indústria de Aves - GRITTA.  
Associação Goiana de Avicultura, AGA, Goiania, Brasil
- 2008 - 2008** Qualificação Profissional em Processamento de Soja.  
Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário do Estado de Goiás, AGENCIARURAL, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Negociação Avançada.  
Perdigão - Filial Rio Verde, PERDIGÃO, Rio Verde, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Liderança Educadora - Como ser um líder educador.  
Perdigão - Filial Rio Verde, PERDIGÃO, Rio Verde, Brasil
- 2005 - 2006** Curso de curta duração em Formação de Ferramenteiros (especialista em PDCA).  
Perdigão - Filial Rio Verde, PERDIGÃO, Rio Verde, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Análise Sensorial.  
Perdigão - Filial Rio Verde, PERDIGÃO, Rio Verde, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Capacitação em Comunicação.  
Perdigão - Filial Rio Verde, PERDIGÃO, Rio Verde, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Oficial de Bem-Estar Animal.  
Perdigão - Filial Rio Verde e Universidade de Bristol, PERDIGÃO RVE, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Inseminação Artificial em Bovinos.  
Fundação Bradesco, BRADESCO, Brasil

#### Atuação profissional

##### 1. Universidade de São Paulo - USP

###### Vínculo Institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Professor voluntário, Regime: Parcial
- 2012 - 2012** Vínculo: Estágio remunerado , Enquadramento funcional: Estagiária PAE , Carga horária: 6, Regime: Parcial
- 2012 - 2012** Vínculo: Estágio Não Remunerado , Enquadramento funcional: Estagiária PAE , Carga horária: 6, Regime: Parcial
- 2011 - Atual** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação/Bolsista FAPESP, Regime: Dedicção exclusiva

##### 2. Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Bragança - ESA-IPB

###### Vínculo institucional

- 2014 - 2015** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista BEPE/ FAPESP, Regime: Dedicção exclusiva

## 3. Universidade Federal de Goiás - UFG

Vinculo  
institucional

- 2011 - 2011** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Voluntário , Carga horária: 4, Regime: Parcial
- 2009 - 2009** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação , Carga horária: 1, Regime: Parcial
- 2009 - 2010** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação , Carga horária: 10, Regime: Parcial
- 2008 - 2008** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação , Carga horária: 1, Regime: Parcial
- 2008 - 2008** Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação , Carga horária: 2, Regime: Parcial

## 4. SENAI - Unidade Vila Canaã, Goiânia/ GO - SENAI

Vinculo  
institucional

- 2010 - 2010** Vínculo: Prestador de Serviços Autônomo , Enquadramento funcional: Professora, Regime: Parcial

## 5. ReComendo Consultoria e Assessoria Ltda - RECOMENDO

Vinculo  
institucional

- 2008 - 2010** Vínculo: Prestador de Serviços Autônomo , Enquadramento funcional: Consultora em Segurança Alimentar , Carga horária: 3, Regime: Parcial

## 6. Goiás Carne Alimentos S.A. - GC

Vinculo  
institucional

- 2007 - 2007** Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Supervisora da Área Quente , Carga horária: 44, Regime: Integral

## 7. Perdigão - Filial Rio Verde - PERDIGÃO

Vinculo  
institucional

- 2006 - 2006** Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Supervisora de Setor , Carga horária: 44, Regime: Integral
- 2005 - 2006** Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Médica Veterinária Jr. , Carga horária: 44, Regime: Integral
- 2004 - 2005** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 44, Regime: Integral

## 8. Agropecuária Rio Paraíso LTDA - RIO PARAÍSO

Vinculo  
institucional

- 2003 - 2003** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária, Regime: Parcial

## Projetos

Projetos de  
pesquisa

- 2012 - 2014** Caracterização físico-química, qualidade microbiológica, propriedades biológicas e origem botânica do pólen apícola desidratado

Descrição: O estudo propõe a caracterização de amostras de pólen apícola desidratado, coletadas em diferentes estados brasileiros

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);  
Integrantes: Adriane Alexandre Machado de Melo; Ligia Bicudo de Almeida Muradian (Responsável); Elias da Silva Araújo; Ortrud Monika Barth Schatzmayr; Alex da Silva de Freitas  
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

**2011 - 2011** Aproveitamento de descartes de tomate cereja híbridos vermelho e amarelo no desenvolvimento de novos produtos: tomate seco, tomate em pó, geléia, doce em massa, doce em calda, molho e catchup.

Descrição: O projeto teve por objetivo criar alternativas para o aproveitamento de tomates da variedade cereja, híbridos vermelho e amarelo, descartados do consumo in natura por apresentarem pequenos defeitos.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (4); Doutorado (1);  
Integrantes: Adriane Alexandre Machado de Melo; Fernanda Salamoni Becker; Clarissa Damiani (Responsável); Flávio Alves da Silva

#### Revisor de periódico

---

1. Chemistry Central Journal

Vínculo

**2013 - Atual** Regime: Parcial

#### Áreas de atuação

---

1. Inspeção de Produtos de Origem Animal
2. Avaliação e Controle de Qualidade de Alimentos
3. Embalagens de Produtos Alimentares
4. Microbiologia de Alimentos
5. Tecnologia de Produtos de Origem Animal
6. Bromatologia

#### Idiomas

---

**Inglês** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

**Espanhol** Compreende Bem , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Bem

#### Prêmios e títulos

---

**2013** Trabalho "Teor de umidade e processos de desidratação de amostras de pólen apícola desidratado brasileiro" premiado no II Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen, FEBAMEL e CEPLAC

**2010** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás

**2004** Médica Veterinária, Universidade Federal de Goiás

#### Produção

---

Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. [doi](#) **DE-MELO, A.A.M**, ESTEVINHO, M.L.M.F., SATTLER, J.A.G, SOUZA, B. R., FREITAS, A. S., BARTH, O. M., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology*. [UCR](#), v.65, p.808 - 815, 2016.
2. **DE-MELO, A.A.M**, MATSUDA, A. H., FREITAS, A. S., BARTH, O. M., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Capacidade antioxidante da própolis. *Pesquisa Agropecuária Tropical (Online)*. , v.44, p.341 - 348, 2014.
3. [doi](#) BECKER, F. S., DAMIANI, C., **DE-MELO, A.A.M**, BORGES, P. R. S., VILAS-BOAS, E. V. B.  
Incorporation of Buriti Endocarp Flour in Gluten-free Whole Cookies as Potential Source of Dietary Fiber. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht)*. [ISCI](#), v.69, p.1 - 7, 2014.
4. [doi](#) ANANIAS, K. R., **MELO, A.A.M.**, MOURA, C. J.  
Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* L. honey from central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)*. [SCOP](#), v.44, p.679 - 683, 2013.
5. [doi](#) MENDES, N. S. R., GOMES-RUFFI, C.R, LAGE, M. E., BECKER, F. S., **MELO, A.A.M.**, SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Oxidative stability of cereal bars made with fruit peels and baru nuts packaged in different types of packaging. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Online)*. [ISCI](#), v.33, p.730 - 736, 2013.
6. **DE-MELO, A.A.M**, MATSUDA, A. H., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*. , v.71, p.540 - 548, 2012.
7. [doi](#) **MELO, ADRIANE ALEXANDRE MACHADO DE**, GERALDINE, ROBSON MAIA, SILVEIRA, MIRIAM FONTES ARAUJO, TORRES, MARIA CÉLIA LOPES, REZENDE, CÍNTIA SILVA MINAFRA E, FERNANDES, THIAGO HENRIQUE, OLIVEIRA, ANTONIO NONATO DE  
Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)*. [SCOP](#), v.43, p.1419 - 1427, 2012.
8. ANANIAS, K. R., **DE-MELO, A.A.M**, BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Adequação das práticas de fabricação em indústrias de panificação da cidade de Goiânia - GO. *Higiene Alimentar.* , v.25, p.77 - 79, 2011.
9. **DE-MELO, A.A.M**, ANANIAS, K. R., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Análise das condições higiênico-sanitárias em restaurantes de um município do Estado de Goiás. *Higiene Alimentar.* , v.25, p.79 - 81, 2011.
10. BECKER, F. S., ANANIAS, K. R., **DE-MELO, A.A.M**, DAMIANI, C.  
Avaliação de implantação de boas práticas de fabricação em estabelecimentos tipo fast-food, Goiás, Brasil. *Higiene Alimentar.* , v.25, p.103 - 105, 2011.
11. ANANIAS, K. R., **DE-MELO, A.A.M**, BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Buffet: qualidade dos serviços oferecidos na cidade de Goiânia, GO. *Higiene Alimentar.* , v.25, p.113 - 115, 2011.
12. BECKER, F. S., ANANIAS, K. R., **DE-MELO, A.A.M**, DAMIANI, C.  
Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias em pamonharias de Goiânia - GO. *Higiene Alimentar.* , v.25, p.131 - 132, 2011.
13. **DE-MELO, A.A.M**, ANANIAS, K. R., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Implantação de BPF como pré-requisito para o sistema APPCC em fábricas de gelados comestíveis. *Higiene Alimentar.* , v.25, p.143 - 144, 2011.

#### Artigos aceitos para publicação

1. **DE-MELO, ADRIANE ALEXANDRE MACHADO, ESTEVINHO, MARIA LETICIA MIRANDA FERNANDES, DE ALMEIDA-MURADIAN, LIGIA BICUDO**  
A diagnosis of the microbiological quality of dehydrated bee-pollen produced in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*. 2015.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. ANANIAS, K. R., MELO, A.A.M., BECKER, F. C., TAKEUCHI, K. P., GERALDINE, R. M., MOURA, C. J.  
Avaliação das boas práticas em unidades de extração de mel na microrregião de Pires do Rio, estado de Goiás In: VI Congresso de Pesquisa Ensino e Extensão/ VI Seminário de Pós-Graduação da UFG-Mestrado. 2009, Goiânia.  
**Anais do VI Congresso de Pesquisa Ensino e Extensão/ VI Seminário de Pós-Graduação da UFG-Mestrado.**, 2009. p.6231 - 6235
2. MELO, A.A.M., ANDONINI, D., GARCIA, M. C., ANANIAS, K. R., BECKER, F. C., TORRES, M. C. L., GERALDINE, R. M.  
Perfil sensorial de iogurte tradicional, light e de soja, sabor frutas vermelhas In: VI Congresso de Pesquisa Ensino e Extensão/ VI Seminário de Pós-Graduação da UFG-Mestrado, 2009, Goiânia.  
**Anais do VI Congresso de Pesquisa Ensino e Extensão/ VI Seminário de Pós-Graduação da UFG-Mestrado.**, 2009. p.6923 - 6927
3. BECKER, F. C., MOURA, C. J., MELO, A.A.M., ANANIAS, K. R.  
Uso do ciclo PDCA para solução de problemas na linha de embalagem à vácuo de carne bovina crua em um frigorífico no estado de Goiás In: V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2009, São Paulo.  
**V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes.**, 2009.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. RAMOS, L.A, **DE MELO, A.A.M**, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Capacidade do pólen apícola desidratado de desativar radicais peroxila pelo método ORAC In: 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, 2014, São Paulo.  
**22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP.**, 2014.
2. ATOJI, A.O., **DE MELO, A.A.M**, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Composição centesimal e mineral do pólen apícola desidratado produzido em sete Estados brasileiros In: 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, 2014, São Paulo.  
**22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP.**, 2014.
3. **DE MELO, A.A.M**, ESTEVINHO, M.L.M.F., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Effect of gamma-irradiation on the microbiological quality of dehydrated bee-pollen In: III International Symposium on Bee Products, 2014, Opatija.  
**International Symposium on Bee Products 3rd edition - Annual meeting of the International Honey Commission (IHC): Book of abstracts.** Rijeka: Faculty of Medicine, University of Rijeka, 2014. p.107 - 107
4. **DE-MELO, A.A.M**, TOLENTINO, G., ESTEVINHO, M.L.M.F., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Influência do processo de desidratação sobre a atividade antimicrobiana do pólen apícola desidratado In: III Congresso Ibérico de Apicultura, 2014, Mirandela.  
**Livro de Resumos do III Congresso Ibérico de Apicultura.** Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2014. v.1. p.97 - 97
5. **DE MELO, A.A.M**, ESTEVINHO, M.L.M.F., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Microbiological evaluation of dehydrated bee-pollen produced in Brazil In: Sixth European Conference of Apidology, 2014, Murcia.

- Sixth European Conference of Apidology.** Murcia: Universidad de Murcia. Servicio de Publicaciones, 2014. p.205 - 206
6. ALMEIDA-MURADIAN, L. B., DE-MELO, A.A.M, PEREIRA, A. P., ESTEVINHO, M.L.M.F.  
Antimicrobial activity of dehydrated bee pollen produced in four brazilian states against microorganisms with clinical importance  
In: XXXXIII International Apicultural Congress, 2013, Kyiv.  
**Apimondia - Scientific Program/Posters.** , 2013.
  7. DE-MELO, A.A.M, NAGAI, M. K., CHAN, J., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Chemical composition, total phenolic compounds and antioxidant activity of dehydrated bee pollen produced in four brazilian states  
In: XXXXIII International Apicultural Congress, 2013, Kyiv.  
**Apimondia - Scientific Program/Posters.** , 2013.
  8. TAVARES, B.O., MELO, A. A. M., SILVA, T. L. L., CARVALHO, V.F., VIEIRA, E.C.S., BECKER, F. S., SILVA, F. A., DAMIANI, C.  
Aceitação de molho de tomate cereja híbrido amarelo In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.  
**Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2012.
  9. SILVA, T. L. L., VIEIRA, E.C.S., MELO, A. A. M., CARVALHO, V.F., BECKER, F. S., SILVA, F. A., DAMIANI, C.  
Análise sensorial de catchup de tomate cereja híbrido amarelo  
In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.  
**Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2012.
  10. VIEIRA, E.C.S., SILVA, T. L. L., MELO, A. A. M., CARVALHO, V.F., BECKER, F. S., SILVA, F. A., DAMIANI, C.  
Análise sensorial de doce em calda de tomate cereja híbrido amarelo, produto de descarte industrial In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.  
**Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2012.
  11. GARCIA, L.G.L., MELO, A.A.M., SILVA, T. L. L., CARVALHO, V.F., VIEIRA, E.C.S., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Análise sensorial de geléia de tomate cereja híbrido amarelo In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.  
**Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2012.
  12. VIEIRA, E.C.S., SILVA, T. L. L., MELO, A. A. M., CARVALHO, V. F. C., BECKER, F. S., SILVA, F. A., DAMIANI, C.  
Análise sensorial de tomate cereja seco híbrido vermelho, produto de descarte industrial In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.  
**Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2012.
  13. SILVA, T. L. L., MELO, A. A. M., CARVALHO, V.F., VIEIRA, E.C.S., BECKER, F. S., SILVA, F. A., DAMIANI, C.  
Análise sensorial do tomate cereja seco híbrido amarelo In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.  
**Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2012.
  14. MELO, A.A.M., MEIRA, D. F. S., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Antioxidant activity of bee pollen produced in two Brazilian states  
In: 5th European Conference of Apidology, 2012, Halle an der Saale.  
**EurBee 5 - 5th European Conference of Apidology.** , 2012. p.223 - 223
  15. MELO, A.A.M., MEIRA, D. F. S., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.

Antioxidant activity of dehydrated bee pollen produced in Rio Grande do Sul state, Brazil In: II International Symposium on Bee Products/ Annual Meeting of IHC, 2012, Bragança.

**II International Symposium on Bee Products/ Annual Meeting of IHC/ Book of Abstracts.** , 2012. p.75 - 75

16. SATTTLER, J.A.G, **MELO, A.A.M.**, SOARES, E. S., SANTOS, L. B., MEIRA, D. F. S., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Chemical composition of dehydrated bee pollen produced in Brazilian State Paraná and Santa Catarina In: II International Symposium on Bee Products/ Annual Meeting of IHC, 2012, Bragança.  
**II International Symposium on Bee Products/ Annual Meeting of IHC/ Book of Abstracts.** , 2012. p.46 - 46
17. SATTTLER, J.A.G, **MELO, A.A.M.**, SOARES, E. S., SANTOS, L. B., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Chemical composition of dried bee pollen from state of Rio Grande do Sul, Brazil In: 5th European Conference of Apidology, 2012, Halle an der Saale.  
**EurBee 5 - 5th European Conference of Apidology.** , 2012. p.253 - 253
18. **MELO, A.A.M.**, MEIRA, D. F. S., CHAN, J., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Comparação entre métodos de extração de compostos antioxidantes do pólen apícola desidratado In: 11º Encontro de Química de Alimentos, 2012, Bragança.  
**11º Encontro de Química de Alimentos - Qualidade dos alimentos: novos desafios/ Resumos.** , 2012. p.65 - 65
19. **MELO, A.A.M.**, BECKER, F. S., MENDES, N. S. R., LAVRINHA E SILVA, T. L., AGUIAR, P. S. L., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Avaliação de cor de tomate cereja híbrido amarelo seco e in natura In: 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Araxá.  
**Resumos do 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2011. p.4 -
20. **MELO, A.A.M.**, BECKER, F. S., MENDES, N. S. R., LAVRINHA E SILVA, T. L., AGUIAR, P. S. L., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Avaliação de parâmetros de qualidade de molho de tomate cereja híbrido amarelo In: 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Araxá.  
**Resumos do 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2011. p.5 -
21. **MELO, A.A.M.**, BECKER, F. S., AGUIAR, P. S. L., LAVRINHA E SILVA, T. L., MENDES, N. S. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Caracterização físico-química de geléia de tomate tipo cereja vermelho In: 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Araxá.  
**Resumos do 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2011. p.7 -
22. **MELO, A.A.M.**, BECKER, F. S., AGUIAR, P. S. L., LAVRINHA E SILVA, T. L., MENDES, N. S. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Geléia de tomate cereja vermelho: parâmetros instrumentais de cor In: 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Araxá.  
**Resumos do 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2011. p.14 -
23. **MELO, A.A.M.**, BECKER, F. S., MENDES, N. S. R., LAVRINHA E SILVA, T. L., AGUIAR, P. S. L., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Parâmetros instrumentais de cor de molho de tomate cereja híbrido amarelo In: 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Araxá.  
**Resumos do 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2011.

p.18 -

24. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., AGUIAR, P. S. L., LAVRINHA E SILVA, T. L., MENDES, N. S. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Variação de cor de tomate cereja vermelho seco e in natura In: 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Araxá.  
**Resumos do 1º SINPECTA - Simpósio Nacional: Pesquisa em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2011. p.21 -
25. AGUIAR, P. S. L., BECKER, F. S., MELO, A.A.M., MONTEIRO, A., FERNANDES, T. H., SILVA, F. A., ASQUIERI, E. R., DAMIANI, C.  
Atividade antioxidante e fenóis totais em doce em massa de tomate In: IV Congresso Brasileiro de Tomate Industrial, 2010, Goiânia.  
**Anais do IV Congresso Brasileiro de Tomate Industrial.** , 2010.
26. MENDES, N. S. R., BECKER, F. S., MELO, A.A.M., MONTEIRO, A., FERNANDES, T. H., SILVA, F. A., ASQUIERI, E. R., DAMIANI, C.  
Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de geléia de tomate In: IV Congresso Brasileiro de Tomate Industrial, 2010, Goiânia.  
**Anais do IV Congresso Brasileiro de Tomate Industrial.** , 2010.

**Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. CARVALHO, V.F., MELO, A.A.M., SILVA, T. L. L., VIEIRA, E.C.S., TOGUCHI, M.Y., DAMIANI, C.  
Aceitabilidade do doce em massa de tomate cereja amarelo: uma alternativa para o desperdício In: 4º Simpósio de Segurança Alimentar, 2012, Gramado.  
**Anais do 4º Simpósio de Segurança Alimentar.** , 2012.
2. DAMIANI, C., ANANIAS, K. R., BECKER, F. S., SILVA, T. L. L., MELO, A.A.M., SILVA, F.A  
Análise das boas práticas de fabricação (BPF) em restaurante self-service de shopping center de Goiânia-GO In: 4º Simpósio de Segurança Alimentar, 2012, Gramado.  
**Anais do 4º Simpósio de Segurança Alimentar.** , 2012.
3. SILVA, F.A, ANANIAS, K. R., BECKER, F. S., SILVA, T. L. L., MELO, A. A. M., DAMIANI, C.  
Condições higiênico-sanitárias em restaurante tipo fast food de frutos do mar em Goiânia-GO In: 4º Simpósio de Segurança Alimentar, 2012, Gramado.  
**Anais do 4º Simpósio de Segurança Alimentar.** , 2012.
4. SILVA, T. L. L., ANANIAS, K. R., BECKER, F. S., MELO, A.A.M., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias em comércio de comida árabe na cidade de Goiânia-GO In: 4º Simpósio de Segurança Alimentar, 2012, Gramado.  
**Anais do 4º Simpósio de Segurança Alimentar.** , 2012.
5. SILVA, T. L. L., ANANIAS, K. R., BECKER, F. S., MELO, A.A.M., SILVA, F. A., DAMIANI, C.  
Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias em comércio fast food de panquecas e waffles na cidade de Goiânia-GO In: 4º Simpósio de Segurança Alimentar, 2012, Gramado.  
**Anais do 4º Simpósio de Segurança Alimentar.** , 2012.
6. BECKER, F. S., TAVARES, J. S., MELO, A.A.M., SOARES JUNIOR, M. S., DAMIANI, C., EIFERT, E. C.  
Alterações morfológicas de farinhas de arroz submetidas ao processo de extrusão In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE.** , 2011.
7. BECKER, F. S., TAVARES, J. S., MELO, A.A.M., SOARES JUNIOR, M. S., DAMIANI, C., EIFERT, E. C.

Alterações na composição centesimal de farinhas de arroz submetidas ao processo de extrusão In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.

**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**

8. LU, D.L, MARTINS, B.B., MARQUES, M. T. R., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Alterações nos parâmetros químicos de mistura para brigadeiro light, após processamento In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
9. MARTINS, B.B., LU, D.L, SILVA, L.R., MARQUES, M. T. R., MELO, A.A.M., DAMIANI, C.  
Análise sensorial de doce tipo brigadeiro com caloria reduzida In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
10. DAMIANI, C., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., ANANIAS, K. R., SILVA, F.A  
Aproveitamento de descartes de tomate cereja vermelho na elaboração de molho tipo catchup In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
11. SOARES JUNIOR, M. S., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SILVA, F.A, CALIARI, M., DAMIANI, C.  
Aproveitamento de frutos de descarte na elaboração de doce em massa de tomate cereja vermelho In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
12. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., BAIOCCHI, M.L.M., SILVA, F.A, CALIARI, M., DAMIANI, C.  
Aproveitamento de tomates, variedade cereja, descartados pela indústria de beneficiamento para elaboração de geléia In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
13. MENDES, N. S. R., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., ASQUIERI, E. R., DAMIANI, C., RUFFI, C.R.G.  
Atividade antioxidante de barra de cereais com baru, acrescido de cascas de frutas secas In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
14. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., COSTA, N. V., ASQUIERI, E. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Atividade antioxidante em molho e geléia de tomate da variedade cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
15. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., COSTA, N. V., ASQUIERI, E. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Atividade antioxidante em molho tipo catchup produzido com tomate cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.

**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**

16. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., ALMEIDA, T. L., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Atividade antioxidante em tomate em pó elaborado com frutos da variedade cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
17. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., ALMEIDA, T. L., ANANIAS, K. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Atividade antioxidante em tomate variedade cereja, híbrido amarelo, submetido a processo de secagem In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
18. DAMIANI, C., MELO, A. A. M., BECKER, F. S., ASQUIERI, E. R., RODRIGUES, L. F., VILAS BOAS, E. V. B.  
Atividade antioxidante em tomates cultivar cereja seco e em pó elaborados com resíduo da indústria de beneficiamento In: XVII Encontro nacional de analistas de alimentos/ III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.  
**Anais do XVII ENAAL e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. , 2011.**
19. DAMIANI, C., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., ANANIAS, K. R., SILVA, F.A  
Avaliação de catchup produzido com descartes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) variedade cereja vermelho In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
20. SOARES JUNIOR, M. S., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SILVA, F.A, CALIARI, M., DAMIANI, C.  
Avaliação de parâmetros de qualidade de doce em massa de tomate tipo cereja vermelho In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
21. SILVA, F.A, MELO, A.A.M., BECKER, F. S., LAVRINHA E SILVA, T. L., DAMIANI, C.  
Avaliação física e química de doce de tomate cereja em calda produzido com descartes da indústria de beneficiamento In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
22. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., PASSOS, B. M., LU, D.L, SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Avaliação físico-química de doce de tomate cereja, híbrido amarelo, em calda In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
23. DAMIANI, C., BECKER, F. S., MELO, A. A. M., FERNANDES, P. M., CALIARI, M., BASSINELLO, P. Z., EIFERT, E. C., SOARES-JÚNIOR, M. S.  
Avaliação sensorial de aparência crua de sementes crioulas de feijões-fava *Phaseolus lunatus* L. In: XVII Encontro nacional de analistas de alimentos/ III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.  
**XVII ENAAL e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. , 2011.**
24. CALIARI, M., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SOARES JUNIOR, M. S., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Caracterização física e química de molho elaborado com

descartes da indústria de tomates cereja in natura In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.

**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**

25. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., FERREIRA, P. P., SILVA, F.A, LAVRINHA E SILVA, T. L., DAMIANI, C.  
Caracterização físico-química de tomate em pó, variedade cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
26. BECKER, F. S., MELO, A. A. M., DAMIANI, C., FERNANDES, P. M., CALIARI, M., BASSINELLO, P. Z., EIFERT, E. C., SOARES JUNIOR, M. S.  
Caracterização química de feijões-fava crioulos cultivados em sistema orgânico In: XVII Encontro nacional de analistas de alimentos/ III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.  
**Anais do XVII ENAAL e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. , 2011.**
27. CALIARI, M., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SOARES JUNIOR, M. S., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Composição centesimal de molho de tomates cereja vermelho elaborado a partir de frutos de descarte In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
28. MARTINS, B.B., LU, D.L, RIOS, F.P., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Composição centesimal e valor energético total de pó para doce tipo brigadeiro light In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
29. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., LAVRINHA E SILVA, T. L., FERREIRA, P. P., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Composição centesimal e valor energético total de tomate em pó elaborado com a variedade cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
30. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., MEDEIROS, N.X., ANANIAS, K. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Composição química de molho tipo catchup elaborado com tomate cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
31. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., PASSOS, B. M., MENDES, N. S. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Desenvolvimento e análise química de doce de tomate cereja, híbrido amarelo, em calda In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
32. MENDES, N. S. R., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., DAMIANI, C., RUFFI, C.R.G.  
Desenvolvimento e caracterização de barra de cereais com baru, acrescida de cascas de frutas secas In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**

33. MARTINS, B.B., LU, D.L., RIOS, F.P., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Desenvolvimento e composição química de doce tipo brigadeiro light In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
34. MELO, A.A.M., AGUIAR, P. S. L., BECKER, F. S., SILVA, F.A, LAVRINHA E SILVA, T. L., DAMIANI, C.  
Doce em massa de tomate cereja, híbrido amarelo: uma alternativa para frutos descartados do consumo in natura In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
35. BECKER, F. S., TAVARES, J. S., MELO, A.A.M., SOARES JUNIOR, M. S., DAMIANI, C., EIFERT, E. C.  
Efeito da extrusão na granulometria da farinhas de arroz In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
36. SILVA, F.A, MELO, A.A.M., BECKER, F. S., LAVRINHA E SILVA, T. L., DAMIANI, C.  
Elaboração de doce de tomate cereja em calda a partir de frutos de descarte da indústria de beneficiamento In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
37. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SILVEIRA, M. F. A., TAKEUCHI, K. P., TORRES, M. C. L., GERALDINE, R. M.  
Filme ativo a base de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
38. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., TAVARES, J. S., SILVA, F.A, AGUIAR, P. S. L., DAMIANI, C.  
Geléia de tomate produzida com frutos da variedade cereja descartados pela indústria de beneficiamento In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
39. ANANIAS, K. R., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Implantação de boas práticas de fabricação em comércios ambulantes da cidade de Goiânia-GO In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
40. ANANIAS, K. R., MELO, A.A.M., BECKER, F. S., DAMIANI, C.  
Implantação de boas práticas de fabricação em serviços de alimentação da cidade de Porto Velho-RO In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
41. DAMIANI, C., BECKER, F. S., DE MELO, A.A.M, FERNANDES, P. M., CALIARI, M., BASSINELLO, P. Z., EIFERT, E. C., SOARES-JÚNIOR, M. S.  
Morfologia de feijões-fava crioulos cultivados em sistema de produção orgânico na região de Goiânia - GO In: XVII Encontro nacional de analistas de alimentos/ III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.  
**XVII ENAAL e III Congresso Latino Americano de Analistas**

de Alimentos. , 2011.

42. BECKER, F. S., MELO, A. A. M., DAMIANI, C., VERA, R., VILAS BOAS, E. V. B.  
Obtenção e determinação da capacidade higroscópica de farinha de endocarpo de Buriti In: XVII Encontro nacional de analistas de alimentos/ III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.  
**Anais do XVII ENAAL e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. , 2011.**
43. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., BAIOCCHI, M.L.M., ANANIAS, K. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Parâmetros físico-químicos de geléia de tomate variedade cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
44. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., MEDEIROS, N.X., SILVA, F.A, TAVARES, J. S., DAMIANI, C.  
Parâmetros físico-químicos de molho tipo catchup elaborado com tomate cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
45. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., LAVRINHA E SILVA, T. L., COELHO, L.B., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Parâmetros físicos e químicos de tomate variedade cereja, híbridos vermelho e amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA 2011 - RECIFE PE. , 2011.**
46. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., AGUIAR, P. S. L., SILVA, F.A, SOARES JUNIOR, M. S., DAMIANI, C.  
Parâmetros químicos de doce em massa de tomate variedade cereja, híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
47. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., TAVARES, J. S., SOARES, N.R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Parâmetros químicos de tomate seco variedade cereja, híbridos vermelho e amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
48. MELO, A.A.M., LAVRINHA E SILVA, T. L., BECKER, F. S., MENDES, N. S. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Parâmetros químicos e instrumentais de cor de tomate em pó da variedade cereja, elaborado com descartes industriais In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
49. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., AGUIAR, P. S. L., SOARES, N.R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Produção de tomate seco com frutos da variedade cereja, híbridos vermelho e amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE. , 2011.**
50. MELO, A.A.M., LAVRINHA E SILVA, T. L., BECKER, F. S., MENDES, N. S. R., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Tomate em pó: alternativa para o aproveitamento de tomates cereja descartados do consumo in natura In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de

Alimentos, 2011, Recife.

**III SICTA - RECIFE PE.**, 2011.

51. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SILVA, F.A, MENDES, N. S. R., ANANIAS, K. R., DAMIANI, C.  
Valor nutricional de molho de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* Mill.) híbrido amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE.**, 2011.
52. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., LAVRINHA E SILVA, T. L., COELHO, L.B., SILVA, F.A, DAMIANI, C.  
Valor nutricional de tomate variedade cereja, híbridos vermelho e amarelo In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos, 2011, Recife.  
**III SICTA - RECIFE PE.**, 2011.

#### Artigos em revistas (Magazine)

1. DE MELO, A.A.M, NAGAI, M. K., CHAN, J., ARAUJO, E. S., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Teor de umidade e processos de desidratação de amostras de pólen apícola desidratado brasileiro. *Magistra*. Cruz das Almas, p.4 - 4, 2013.
2. MELO, A.A.M., MEIRA, D. F. S., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Atividade antioxidante do pólen apícola desidratado avaliada por diferentes métodos de extração. *Mensagem Doce* (Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Européias). São Paulo, p.59 - 59, 2012.
3. SATTTLER, J.A.G, MELO, A.A.M., SOUZA., E. S., MEIRA, D. F. S., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
Quantificação de vitamina E em pólen apícola desidratado do Estado do Rio Grande do Sul. *Mensagem Doce* (Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Européias). São Paulo, p.57 - 57, 2012.

#### Apresentação de trabalho e palestra

1. DE MELO, A.A.M, ESTEVINHO, M.L.M.F., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Effect of gamma-irradiation on the microbiological quality of dehydrated bee-pollen**, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
2. DE-MELO, A.A.M, TOLENTINO, G., ESTEVINHO, M.L.M.F., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Influência do processo de desidratação sobre a atividade antimicrobiana do pólen apícola desidratado**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
3. DE-MELO, A.A.M, ESTEVINHO, M.L.M.F., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Microbiological evaluation of dehydrated bee-pollen produced in Brazil**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
4. NAGAI, M. K., DE MELO, AAM, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Chemical composition, total phenolic and flavonoids content of dehydrated bee pollen**, 2013. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
5. DE-MELO, A.A.M, NAGAI, M. K., CHAN, J., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Chemical composition, total phenolic compounds and antioxidant activity of dehydrated bee pollen produced in four Brazilian States**, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
6. DE-MELO, A.A.M, NAGAI, M. K., CHAN, J., ARAUJO, E. S., ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Teor de umidade e processos de desidratação de amostras**

- de pólen apícola desidratado brasileiro, 2013.  
(Seminário, Apresentação de Trabalho)
7. MELO, A.A.M., MEIRA, D. F. S., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Antioxidant activity of bee pollen produced in two Brazilian states**, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  8. MELO, A.A.M., MEIRA, D. F. S., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Antioxidant activity of dehydrated bee pollen produced in Rio Grande do Sul state, Brazil**, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
  9. MELO, A.A.M., MEIRA, D. F. S., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Atividade antioxidante do pólen apícola desidratado avaliada por diferentes métodos de extração**, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  10. MELO, A.A.M., MEIRA, D. F. S., CHAN, J., SATTTLER, J.A.G, ALMEIDA-MURADIAN, L. B.  
**Comparação entre métodos de extração de compostos antioxidantes do pólen apícola desidratado**, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho)
  11. MELO, A.A.M., AGUIAR, P. S. L., BECKER, F. S., SILVA, F.A, SILVA, T. L. L., DAMIANI, C.  
**Doce em massa de tomate cereja, híbrido amarelo: uma alternativa para frutos descartados do consumo in natura**, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
  12. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SILVEIRA, M. F. A., TAKEUCHI, K. P., TORRES, M. C. L., GERALDINE, R. M.  
**Filme ativo a base de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
  13. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., AGUIAR, P. S. L., SILVA, F.A, SOARES JUNIOR, M. S., DAMIANI, C.  
**Parâmetros químicos de doce em massa de tomate variedade cereja, híbrido amarelo**, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
  14. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., SILVA, F.A, MENDES, N. S. R., ANANIAS, K. R., DAMIANI, C.  
**Valor nutricional de molho de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* Mill.) híbrido amarelo**, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
  15. MELO, A.A.M., ANDONINI, D., GARCIA, M. C., ANANIAS, K. R., BECKER, F. C., TORRES, M. C. L., GERALDINE, R. M.  
**Perfil Sensorial de Iogurte Tradicional, Light e de Soja, Sabor Frutas Vermelhas**, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  16. BECKER, F. C., MOURA, C. J., MELO, A.A.M., ANANIAS, K. R.  
**Uso do ciclo PDCA para solução de problemas na linha de embalagem à vácuo de carne bovina crua em um frigorífico no estado de Goiás**, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  17. QUEIROZ, J. A. C. C., MARINHO, H. M. T., VANIN, V. M., ANDRADE, M. G. S., MELO, A. A. M., CARVALHO, A. G., PASQUIM, L., ASSIS, P. R., NETO, A. L., ROSA, B. C., BRAGA, C. A. S. B., MOREIRA, C. N. M.  
**Eficácia da homeopatia com extrato da planta *Thuya occidentalis* no tratamento da papilomatose bovina**, 2003. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  18. QUEIROZ, J. A. C. C., MARINHO, H. M. T., VANIN, V. M., ANDRADE, M. G. S., MELO, A. A. M., CARVALHO, A. G., PASQUIM, L., ASSIS, P. R., NETO, A. L., CARVALHO, B.  
**Tratamento da papilomatose bovina com utilização da homeopatia com extrato da planta *Thuya occidentalis***, 2003. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

#### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. ALMEIDA-MURADIAN, L. B., DE MELO, A.A.M, SATTLER, J.A.G  
**Cientistas comparam propriedades e efeitos de pólen apícola**, 2015
2. ALMEIDA-MURADIAN, L. B., DE MELO, A.A.M, SATTLER, J.A.G  
**Estudo compara propriedades de pólen apícola de todo o país**, 2015

#### Demais produções técnicas

1. MELO, A.A.M., BECKER, F. S.  
**Treinamento para usuários do Portal de Periódicos da CAPES**, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
2. MELO, A.A.M., ANANIAS, K. R.  
**Impacto do Processo de Abate na Qualidade da Carne, Tecnologia de Maturação da Carne Bovina e BPF no Beneficiamento de Mel de Abelha Apis mellifera**, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
3. MELO, A.A.M., GARCIA, R. Á  
**Treinamento para usuários do Portal de Periódicos da CAPES**, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
4. MELO, A.A.M., BECKER, F. S., TAVARES, J. S.  
**Treinamento para usuários do Portal de Periódicos da CAPES**, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
5. MELO, A.A.M.  
**Exposição de Animais Silvestres**, 2003. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

#### Orientações e Supervisões

---

##### Orientações e supervisões

##### Orientações e supervisões em andamento

##### Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Monalisa Machado. **Vitaminas do complexo B: tiamina, riboflavina, niacina e piridoxina e as metodologias analíticas empregados em suas determinações**. 2015. Curso (Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas

#### Eventos

---

##### Eventos

##### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III International Symposium on Bee Products**, 2014. (Simpósio)  
Effect of gamma-irradiation on the microbiological quality of dehydrated bee-pollen.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Congresso Ibérico de Apicultura**, 2014. (Congresso)  
Influência do processo de desidratação sobre a atividade antimicrobiana do pólen apícola desidratado.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Sixth European Conference of Apidology**, 2014. (Congresso)  
Microbiological evaluation of dehydrated bee-pollen produced in Brazil.

4. **Workshop de Produção e Industrialização de Pólen Apícola**, 2014. (Outra)
5. **III International Symposium on Bee Products**, 2014. (Simpósio)
6. **III Congresso Ibérico de Apicultura**, 2014. (Congresso)
7. **Sixth European Conference of Apidology**, 2014. (Congresso)
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXXIII International Apicultural Congress**, 2013. (Congresso)  
Chemical composition, total phenolic compounds and antioxidant activity of dehydrated bee pollen produced in four Brazilian states.
9. **12º Evento da Série de Workshops Internacionais Sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde**, 2013. (Outra)
10. **XXXXIII International Apicultural Congress**, 2013. (Congresso)
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **5th European Congress of Apidology**, 2012. (Congresso)  
Antioxidant activity of bee pollen produced in two Brazilian states.
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II International Symposium on Bee Products/ Annual Meeting of IHC**, 2012. (Simpósio)  
Antioxidant activity of dehydrated bee pollen produced in Rio Grande do Sul state, Brazil.
13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **19º Congresso Brasileiro de Apicultura - 5º Congresso Brasileiro de Meliponicultura**, 2012. (Congresso)  
Atividade antioxidante do pólen apícola desidratado avaliada por diferentes métodos de extração.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **11º Encontro de Química dos Alimentos**, 2012. (Encontro)  
Comparação entre métodos de extração de compostos antioxidantes do pólen apícola desidratado.
15. Conferencista no(a) **19º Congresso Brasileiro de Apicultura - 5º Congresso Brasileiro de Meliponicultura**, 2012. (Congresso)  
Pólen Apícola na Nutrição Humana.
16. **V Workshop de Atualização em Nutrição Nutri Jr. USP**, 2012. (Outra)
17. **II International Symposium on Bee Products/ Annual Meeting of IHC**, 2012. (Simpósio)
18. **19º Congresso Brasileiro de Apicultura - 5º Congresso Brasileiro de Meliponicultura**, 2012. (Congresso)
19. **11º Encontro de Química dos Alimentos**, 2012. (Encontro)
20. **5th European Congress of Apidology**, 2012. (Congresso)
21. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos**, 2011. (Simpósio)  
Trabalho 1: Filme ativo a base de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de alecrim (Rosmarinus

- officinalis L.)/ Trabalho 2: Valor nutricional de molho de tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* Mill.) híbrido amarelo..
22. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos**, 2011. (Simpósio)  
Trabalho 3: Doce em massa de tomate cereja, híbrido amarelo: uma alternativa para frutos descartados do consumo in natura.  
Trabalho 4: Parâmetros químicos de doce em massa de tomate variedade cereja, híbrido amarelo.
  23. Conferencista no(a) **II Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**, 2010. (Outra)  
Produção e Beneficiamento de Mel.
  24. **Seminário de Saúde Pública Veterinária: saúde e meio ambiente**, 2010. (Seminário)
  25. **III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ II Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais/ IV Seminário de Ciência de Alimentos**, 2010. (Simpósio)
  26. Apresentação Oral no(a) **VI Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX**, 2009. (Congresso)  
Trabalho apresentado: Perfil sensorial de iogurte tradicional, light e de soja, sabor frutas vermelhas.
  27. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes**, 2009. (Congresso)  
Trabalho apresentado: Uso do ciclo PDCA para solução de problemas na linha de embalagem à vácuo de carne bovina crua em um frigorífico no estado de Goiás.
  28. **VI Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX**, 2009. (Congresso)
  29. **V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes**, 2009. (Congresso)
  30. **Seminário da Qualidade Total Perdígão**, 2006. (Seminário)
  31. **Semana Nacional Perdígão de Prevenção de Acidentes no Trabalho (SENAPAT)**, 2006. (Outra)
  32. Conferencista no(a) **I Circuito de Atualização em Qualidade e Segurança na Cadeia Agroalimentar**, 2005. (Encontro)  
Ministrou a palestra: Qualidade e Segurança na Cadeia Alimentar - Bem-Estar Animal no Frigorífico de Suínos.
  33. **Festival do Leitão**, 2005. (Encontro)
  34. **IV Encontro Técnico em Suinocultura**, 2004. (Encontro)
  35. **7ª Rodada Goiana de Tecnologia em Manejo de Suínos**, 2003. (Encontro)
  36. **II Semana de Veterinária (SEMAVET)**, 2003. (Outra)
  37. **11º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos**, 2003. (Congresso)
  38. **Pré-Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos**, 2003. (Outra)
  39. **I Semana da Veterinária (SEMAVET)**, 2002. (Outra)

## Citações

**SciELO****Total de trabalhos:** 1**Total de citações:** 1

Adriane Alexandre Machado De Melo

**SCOPUS****Total de trabalhos:** 2**Total de citações:** 5

Adriane Alexandre Machado De Melo

**Outras****Total de trabalhos:** 5**Total de citações:** 8

Adriane Alexandre Machado De Melo

## Totais de produção

**Produção bibliográfica**

Artigos completos publicados em periódico	13
Artigos aceitos para publicação	1
Revistas (Magazines)	3
Trabalhos publicados em anais de eventos	81
Apresentações de trabalhos (Congresso)	9
Apresentações de trabalhos (Seminário)	1
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	7
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

**Produção técnica**

Curso de curta duração ministrado (outro)	5
Programa de Rádio ou TV (entrevista)	2

**Orientações**

Orientação em andamento (trabalho de conclusão de curso de graduação)	1
---	---

**Eventos**

Participações em eventos (congresso)	16
Participações em eventos (seminário)	2
Participações em eventos (simpósio)	7
Participações em eventos (encontro)	6
Participações em eventos (outra)	8

## Outras informações relevantes

- 1 Bolsista pela Universidade Federal de Goiás - Mestrado (2008-2010); Supervisora na Campanha Anti-Rábica Animal, no município de Jataí, Goiás, em 20/09/2003.

## ANEXO III – Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

## FICHA DO ALUNO

9131 - 7766709/1 - **Adriane Alexandre Machado de Melo**

**Email:** adriane.melo@usp.br  
**Data de Nascimento:** 07/06/1983  
**Cédula de Identidade:** RG - 4379390 - GO  
**Local de Nascimento:** Estado de Goiás  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Médico Veterinário - Universidade Federal de Goiás - Goiás - Brasil - 2005  
**Mestrado:** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (1) - Universidade Federal de Goiás - Goiás - Brasil - 2010

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Ciência dos Alimentos  
**Área:** Bromatologia  
**Data de Matrícula:** 10/06/2011  
**Início da Contagem de Prazo:** 10/06/2011  
**Data Limite para o Depósito:** 08/10/2015  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Ligia Bicudo de Almeida Muradian - 10/06/2011 até o presente. Email: ligiabi@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 10/06/2011  
**Prorrogação(ões):** 120 dias  
 Período de 10/06/2015 até 08/10/2015  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 28/08/2013  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 10/06/2011  
 Prorrogação em 27/03/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

**Impresso em:** 29/09/2015 00:54:23



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Documento sem validade oficial

**FICHA DO ALUNO**

**9131 - 7766709/1 - Adriane Alexandre Machado de Melo**

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
MAE5755-6/3	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	08/08/2011	25/11/2011	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5803-1/4	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	09/08/2011	22/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5102-2/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2011	25/09/2011	60	4	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BIB5706-5/1	Prospecção de Fármacos de Origem Vegetal (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	22/11/2011	90	6	100	B	N	Concluída
FBF5708-5/1	Relação entre Estrutura Química e Atividade Biológica	23/09/2011	16/12/2011	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5888-4/2	Microrganismos Patogênicos em Alimentos II	17/10/2011	27/11/2011	90	0	-	-	N	Turma cancelada
HNT5739-2/1	Experimento com Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	05/03/2012	14/05/2012	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-3/5	Aprimoramento Didático	06/03/2012	02/04/2012	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5751-7/1	Bioquímica Avançada (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	06/03/2012	29/05/2012	180	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMF5825-4/3	Seminários Gerais de Farmacologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/03/2012	27/06/2012	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5723-5/2	Conservação de Alimentos por Processos Térmicos	13/03/2012	15/05/2012	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BTC5743-2/7	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	14/03/2012	26/06/2012	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
EDM5791-5/8	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/03/2012	29/06/2012	120	8	83	A	N	Concluída
FBA5871-7/3	Análise de Vitaminas em Alimentos: Aspectos Atuais	24/10/2012	04/12/2012	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
<b>Disciplinas:</b>	0	20	20
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	20	20

**Créditos Atribuídos à Tese: 167**

**Observações:**

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008..

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

**Impresso em:** 29/09/2015 00:54:23

## ANEXO IV – Dados do equipamento Ciros Vision EOP



### Certificado de Manutenção # 23042013

Cliente: CAMPO Fertilidade do Solo e Nutrição Vegetal Ltda. Rua Lindolfo Garcia Adjunto, 1000 – Paracatu- MG - Brasil		Data: 23/ABR/2013
Instrumento: Ciros Vision EOP		n° série: 117156/06
Local: Dependências do cliente	Condições Ambientais Temp: 22 ± 3°C / URA: ≤75%	

Item 1 - Sistemas Óticos

- Limpeza da lente da Ótica UV.
- Limpeza e alinhamento da interface OPI.
- Verificação do funcionamento dos sensores CCDs.
- Verificação da transparência na região do UV.

Item 2 - Sistema eletrônico e computador

- Limpeza geral, verificação das fontes de alimentação, ventiladores e conexões elétricas.
- Verificação do sistema de controle da movimentação X;Y;Z e atuação de sensores de fim de curso.
- Verificação do funcionamento do circuito de controle de temperatura da ótica e acionamento da refrigeração.

Item 3 - Gerador

- Limpeza geral, verificação das conexões elétricas, verificação do sistema de refrigeração, ignição, circuitos de segurança e regulagem.
- Ajuste e otimização do nebulizador e fluxo do argônio.

Item 4 - Testes Analíticos

- Teste de repetitividade, desvio padrão relativo (RSD), BEC, BG e intensidade mínima. Baseado na norma ISO17025. Laudo abaixo.

Elemento	$\lambda$ (nm)	BEC máximo (ppm)	BEC obtido (ppm)	RSD esperado (%)	RSD obtido (%)	BG int. água >500	Tipo da ótica
Mn	257.16	0,020	0,008	<1,00	0,74	9727	Mono
P	178.29	0,800	0,675	<1,00	0,74	2834	Mono

O equipamento encontra-se dentro da especificação do Fabricante:  Sim  Não

Eng° Paulo Roberto de Moura Domingos  
SPECTRO Sul Americana Comércio Ltda.

Página 1/1

Este certificado somente pode ser reproduzido por completo.

Os valores encontrados se referem exclusivamente para o equipamento mencionado acima no cabeçalho.

SPECTRO Sul Americana Comércio Ltda - Av. Moema, 477/485 - São Paulo (SP) –  
Tel:(11)5055 4466/Fax:(11)5051 6008/e-mail: [service@spectrosul.com.br](mailto:service@spectrosul.com.br)

## ANEXO V – Parâmetros das curvas de calibração para análise de minerais



www.campo.com.br

CENTRO DE TECNOLOGIA AGRÍCOLA E AMBIENTAL

**Condição de Medição**

Parâmetros do Plasma/Sistema de Introdução		Parâmetro do Tempo de Medição	
Potência Plasma:	1450 [W]	Estratégia:	Padrão
Vel. Bomba:	2	Modo de Uso:	Normal
Vazão Coolant:	12.00 [L/min]	Tempo Total [s]:	25.20
Vazão Auxiliar:	1.00 [L/min]	Tempo Líquido [s]:	24.00
Vazão Nebuliz.:	1.00 [L/min]	Tempo de Estabilização [s]:	0.00
Vazão Gás Adic.:	0.00 [L/min]		
Vazão Oxigênio:	0.000 [L/min]		

Posição Relativa da Tocha  
 Horizontal: 0.0 [mm]    Vertical: 0.0 [mm]    Distância: 0.0 [mm]

Parâmetros de Prefluxo da Bomba  
 Prefluxo Rápido[s]: 25    Vel. Fluxo Rápido: 4    Prefluxo Total[s]: 30    Vel Fluxo Análise: 2

Condição  
 Usar SASSy     Correção de Branco            Valores Correntes

Parâmetro do Dispositivo:	
Item	Valor
Optic Temp.	17.98 °C
Gen. Exhaust	222.20 Imp/s
Cooling Water	9.90 Imp/s
Gen. Characteristics	1129
Hours of Operation	1222

Parâmetros	LDs	Unidades
Cálcio	0,017	mg/kg
Magnésio	0,00686	mg/kg
Potássio	0,0098	mg/kg
Ferro	0,50	mg/kg
Sódio	0,00116	mg/kg
Manganês	0,326	mg/kg
Cobre	0,145	mg/kg
Zinco	0,0874	mg/kg

### Recuperação Padrão 1 Macro e Micro

### Recuperação Padrão 2 Macro e Micro

Elemento	Recuperação	Elemento	Recuperação
Cálcio	96 %	Cálcio	104 %
Magnésio	105 %	Magnésio	105 %
Potássio	102 %	Potássio	104 %
Ferro	99 %	Ferro	101 %
Sódio	95 %	Sódio	95 %
Manganês	105 %	Manganês	95 %
Cobre	103 %	Cobre	95 %
Zinco	95 %	Zinco	101 %

ANEXO VI - Artigo publicado no periódico *Letters in Applied Microbiology*

## ORIGINAL ARTICLE

**A diagnosis of the microbiological quality of dehydrated bee-pollen produced in Brazil**A.A.M. De-Melo<sup>1</sup>, M.L.M.F. Estevinho<sup>2</sup> and L.B. Almeida-Muradian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Food Analysis, Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup> CIMO-Mountain Research Center, Department of Biology and Biotechnology, Polytechnic Institute of Bragança, Bragança, Portugal

**Significance and Impact of the Study:** Contamination of bee-pollen can occur during production, collection and processing, but there are few studies of the microbiological quality of this product. Brazil is an important producer of dehydrated bee-pollen, therefore, a diagnosis of the microbiological status is important to ensure the safety of many consumers. *Salmonella* sp., genus *Clostridium*, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and even some yeast species are micro-organisms of public health concern and their presence must be monitored. Furthermore, the determination of spoilage micro-organisms indicates whether the production and the processing practices carried out by beekeepers and warehouses were adequate.

**Keywords**

apicultural, *Apis mellifera*, bee-pollen, microbiological quality, pathogens, spoilage micro-organisms.

**Correspondence**

Ligia Bicudo de Almeida Muradian, Laboratório de Análise de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 13-A, CEP: 05508-000, São Paulo, SP, Brazil.  
E-mail: ligiabi@usp.br

2015/0936: received 11 May 2015, revised 25 July 2015 and accepted 6 August 2015

doi:10.1111/lam.12480

**Abstract**

Bee-pollen is an apicultural product with potential for medical and nutritional applications; therefore, its microbiology quality should be monitored. In this context, the objective of this study was to diagnose the microbiological quality of 45 dehydrated bee-pollen samples collected from November 2011 to December 2013 in nine Brazilian States. All the samples were negative for sulphite-reducing *Clostridium* spores, *Salmonella*, coagulase-positive *Staphylococcus* and *Escherichia coli*, which are micro-organisms of public health concern. Total aerobic mesophilic micro-organism counts ranged from <10 to  $1 \cdot 10 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup>, with psychrotroph counts ranging from <10 to  $1 \cdot 12 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup> and total coliforms from <10 to  $2 \cdot 80 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>, while the values for yeasts and moulds were between <10 to  $7 \cdot 67 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>. According to the literature, the microbiota observed in this study were typical; however, it is important to consider that these micro-organisms may cause spoilage and diminish shelf life, reason by which quality control programs should be implemented.

**Introduction**

Bee-pollen is the result of the agglutination of different pollen grains collected by bees from flowers, as well as salivary secretions and small amounts of nectar and/or honey (Brazilian Legislation, 2001; Campos *et al.* 2008). The consumption of this food is driven by the demand for natural products, complementary to dietary or therapeutic effects (Barreto *et al.* 2005). In addition, there is a growing concern with the sanitary quality of food. To meet the demand for bee-pollen and to prevent harm to

consumer health, permanent controls in the beekeeping chain and the implementation of good production and processing practices by beekeepers and warehouses are essential.

There are few studies of the microbiological quality of dehydrated bee-pollen, and we are aware of only two publications analysing samples collected in Brazil (Barreto *et al.* 2005; Hervatin 2009). There is no specific international legislation for this product and Brazilian legislation establishes limits only for physico-chemical parameters such moisture, protein, lipid, ash, total sugars, free acidity

and pH (Brazilian Legislation, 2001). The lack of regulation of the microbiological quality of bee-pollen may be related to the absence of diagnostics, attesting the need for limitations.

Given the requirement for a diagnosis of the sanitary status of bee-pollen produced in Brazil, this study evaluated the microbiological quality of dehydrated bee-pollen samples from different Brazilian States.

## Results and discussion

The choice of microbiological indicators to determine the sanitary quality of the samples was based on previous studies (Campos *et al.* 2008; Estevinho *et al.* 2012; Feás *et al.* 2012; Nogueira *et al.* 2012; Puig-Peña *et al.* 2012). The results are shown in Table 1. The aerobic mesophilic micro-organism counts ranged from  $<10$  to  $1.10 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup>, psychrotrophs from  $<10$  to  $1.12 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>, yeasts and moulds from  $<10$  to  $7.67 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup> and total coliforms from  $<10$  to  $2.80 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>. The highest counts were observed for aerobic mesophilic micro-organisms. There was a variation in the microbiological quality between the samples, even among those collected and processed in the same apiary. In a sample collected in Mato Grosso State it was observed the higher aerobic mesophilic count ( $1.10 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup>), for psychrotrophs the highest value was observed in a dehydrated bee-pollen from Paraná State ( $1.12 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>). Two samples, one from São Paulo State and one from Bahia State, had the highest counts of yeasts and moulds ( $7.67 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>). The highest value of total coliform was observed in a different sample collected in Bahia State ( $2.80 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>) (Table 2). In samples from the same State were observed variation in the counts of micro-organisms. It must be considered that each apiary is a unit of production and adopts different collection and processing practices.

The diagnosis of the microbiological quality of a food allows the evaluation of processing conditions, storage and distribution (Rocha 2013). The presence of micro-organisms in dehydrated bee-pollen is related to inadequate hygienic practices during the steps of manipulation

during harvesting and processing, and the handling and contamination of floral pollen grains on the plant or by bees (Barreto *et al.* 2005; Hervatin 2009; Nogueira *et al.* 2012). In the production process, a critical moment is during the time that bee-pollen *in natura* remains in the collection traps fixed in the hive entrance because the grains are in contact with air, dust and other dirt. Certain seasons and exposure to high humidity and temperature also favour microbial growth (González *et al.* 2005).

The proliferation of micro-organisms in a food matrix depends on favourable conditions. Estevinho *et al.* (2012) observed a positive correlation between water activity ( $a_w$ ) and the population of yeasts and moulds. The  $a_w$  in dehydrated bee-pollen varies from 0.25 to 0.60 (Bastos *et al.* 2003; Estevinho *et al.* 2012; Nogueira *et al.* 2012; Rocha 2013) and it is a limiting factor for microbial proliferation in dehydrated bee-pollen (Estevinho *et al.* 2012). There are two hypotheses for the presence of viable micro-organisms in samples of dehydrated bee-pollen: that the low temperature used in the dehydration process is insufficient to remove micro-organisms and that contamination of the product occurs during the processing steps after dehydration (Barreto *et al.* 2005; Hervatin 2009).

The aerobic mesophilic micro-organism count is commonly used as a general indicator of food quality. Microbiological diagnostics for dehydrated bee-pollen indicate counts in the range of  $<10$  to  $10^4$  CFU g<sup>-1</sup> (Estevinho *et al.* 2012; Feás *et al.* 2012; Hani *et al.* 2012; Nogueira *et al.* 2012), although values above  $10^4$  CFU g<sup>-1</sup> have been reported (Puig-Peña *et al.* 2012). Based on the literature, it was expected that the number of total psychrotrophs would be lower due to storage and marketing at room temperature, which we confirmed. Total coliforms are also indicators of contamination during the production stages, and the collection and processing of food, but they are the best indication of the presence of pathogens of enteric origin, such as *Escherichia coli*. Reports of total coliforms in this matrix indicate values  $<10$ – $10^4$  CFU g<sup>-1</sup> (Hani *et al.* 2012; Rocha 2013). Counts of yeasts and moulds in dehydrated bee-pollen samples

**Table 1** Percentage of the dehydrated bee-pollen samples in each range of determination.

CFU g <sup>-1</sup> /MPN g <sup>-1</sup>	Aerobic mesophilic, %	Psychrotrophs, %	<i>Staphylococcus aureus</i> , %	Yeasts and moulds, %	Total coliforms, %	<i>Escherichia coli</i> , %
<10	6.67	57.78	100	15.56	33.33	100
10–100	15.56	35.56	–	37.78	15.56	–
101–1000	53.33	4.44	–	31.11	37.78	–
1001–10000	22.22	2.22	–	15.56	13.33	–
Above 10001	2.22	–	–	–	–	–

**Table 2** Counting range of micro-organisms in dehydrated bee-pollen samples according to the Brazilian State

Origin/Brazilian State	Number of samples	Aerobic mesophilic (CFU g <sup>-1</sup> )	Psychotrophs (CFU g <sup>-1</sup> )	Yeasts and moulds (CFU g <sup>-1</sup> )	Total coliforms (MPN g <sup>-1</sup> )
Bahia	14	2.50 × 10 to 2.13 × 10 <sup>3</sup>	<10 to 5.00 × 10	2.00 × 10 to 7.67 × 10 <sup>3</sup>	<10 to 2.80 × 10 <sup>3</sup>
São Paulo	13	<10 to 3.53 × 10 <sup>3</sup>	<10 to 9.80 × 10	<10 to 7.67 × 10 <sup>3</sup>	<10 to 1.67 × 10 <sup>3</sup>
Paraná	4	1.11 × 10 <sup>2</sup> to 1.50 × 10 <sup>3</sup>	<10 to 1.12 × 10 <sup>3</sup>	3.70 × 10 to 4.00 × 10 <sup>3</sup>	5.00 × 10 to 1.40 × 10 <sup>3</sup>
Rio Grande do Norte	4	<10 to 3.50 × 10 <sup>2</sup>	<10	2.40 × 10 to 4.50 × 10 <sup>2</sup>	<10 to 2.20 × 10
Rio Grande do Sul	3	3.70 × 10 <sup>2</sup> to 7.42 × 10 <sup>2</sup>	<10 to 1.70 × 10	2.30 × 10 to 2.17 × 10 <sup>2</sup>	6.00 × 10 <sup>2</sup> to 2.27 × 10 <sup>3</sup>
Sergipe	2	6.84 × 10 <sup>2</sup> to 7.64 × 10 <sup>2</sup>	<10 to 1.82 × 10 <sup>2</sup>	2.72 × 10 <sup>2</sup> to 2.80 × 10 <sup>2</sup>	<10
Santa Catarina	2	4.80 × 10 to 6.80 × 10	<10 to 1.30 × 10	<10 to 2.20 × 10	<10 to 6.70 × 10
Mato Grosso	2	1.94 × 10 <sup>2</sup> to 1.10 × 10 <sup>4</sup>	<10 to 2.70 × 10	<10 to 8.70 × 10	6.70 × 10 to 3.33 × 10 <sup>2</sup>
Mato Grosso do Sul	1	4.80 × 10 <sup>3</sup>	4.70 × 10	6.70 × 10 <sup>2</sup>	2.67 × 10 <sup>2</sup>

indicate values between <10–10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup> (Barreto *et al.* 2005; Santos *et al.* 2010; Hani *et al.* 2012; Rocha 2013).

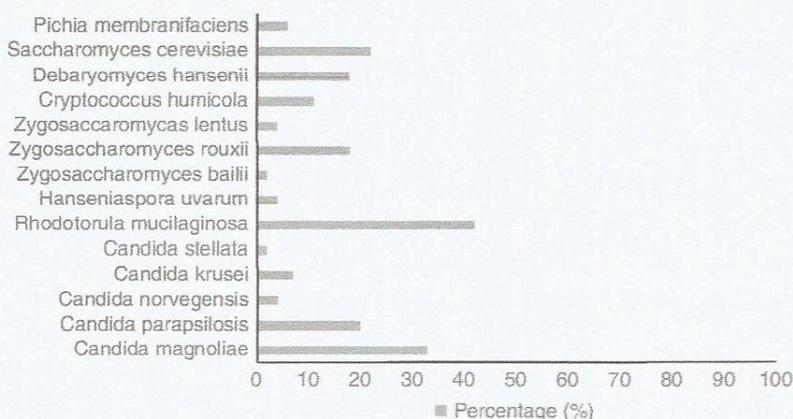
All samples were negative for sulphide-reducing clostridia spores and *Salmonella* sp. and did not show growth of *E. coli* and coagulase-positive *Staphylococcus*. This is an important result because these micro-organisms are potentially pathogenic and of interest to public health. *Clostridium perfringens* gastroenteritis is caused by eating food contaminated with enterotoxin produced by the bacteria and the most common symptoms are diarrhoea and abdominal pain (Monma *et al.* 2015). Botulinum neurotoxin produced by *C. botulinum* can cause a serious neuroparalytic illness (Vasquez 2009). *Salmonella* sp. is the cause of one of the most common diseases transmitted by food, with global distribution. Infection by *Salmonella* sp. can cause gastrointestinal disease and, in more severe cases, septicæmia and meningitis (Chiappini *et al.* 2002). *Escherichia coli*, besides a micro-organism indicator of hygiene during production and processing and possibly the presence of other micro-organisms of enteric origin (Franco and Landgraf 2009), is potentially pathogenic because some strains acquire specific virulence factors responsible for diarrhoea, acute inflammation, haemorrhagic colitis, urinary tract infections, septicæmia and neonatal meningitis (Kaper *et al.* 2004; Müller *et al.* 2007). *Staphylococcus aureus* is a coagulase-positive *Staphylococcus* that produces a thermostable enterotoxin that when ingested causes food poisoning (Franco and Landgraf 2009).

Few countries have microbiological criteria for marketing dehydrated bee-pollen. Researchers at the International Honey Commission (IHC), an international commission whose objectives are to propose quality criteria and an international standard of identity and quality for bee-pollen, recommended limits for total aerobic micro-organisms (<10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup>), yeasts and moulds (<5 × 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup>), Enterobacteriaceae (max. 10<sup>2</sup> CFU g<sup>-1</sup>), *E. coli* (absence in 1 g), *Salmonella* sp. (absence in 10 g) and *Staph. aureus* (absence in 1 g) (Campos *et al.*

2008). Using the limits established by IHC, all the samples analysed were within the standard.

Fourteen species of yeast were identified in 26 samples (57.7%). No growth of these micro-organisms or correspondence with the patterns provided by the commercial system was observed in the other samples. Of the 14 identified species, five belonged to the genus *Candida* (*C. magnoliae*, *C. parapsilopsis*, *C. norvegensis*, *C. krusei*, *C. stellata*) and three to the genus *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii*, *Z. rouxii*, *Z. lentus*). The other species were *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Cryptococcus humicola*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia membranifaciens*. The occurrence of each species in the 45 samples tested is shown in Fig. 1.

Among the identified yeast, the genus *Candida* predominates. This genus comprises diverse commensal micro-organisms that inhabit the gastrointestinal tract primarily in humans, but it is also part of the vaginal microflora and can be found in the urethra and the lungs. These yeasts can become pathogenic if there is an imbalance in their relationship with the host, so they are called opportunistic. Although *C. albicans* is considered the most important pathogenic yeast in humans, other species were identified in recent decades in infectious processes, including *C. parapsilopsis*, *C. norvegensis* and *C. krusei* (Giolo and Svidzinski 2010). *Rhodotorula* species are opportunistic pathogens able to colonize and infect susceptible patients. *Rhodotorula mucilaginosa* is commonly isolated from foods and beverages but the most cases of infection with *Rhodotorula* spp. are fungemia associated with catheter use (Wirth and Goldani 2012). Although considered a deteriorating agent, *Cryptococcus humicola* has been described as a cryptococcosis agent in immunosuppressed patients, although it is not the most common species associated with this pathology (Harris *et al.* 2011). Opportunistic pathogens cause infection only in special circumstances. Eating the food contaminated with these micro-organisms will not necessarily result in infection. According to Bishop (2012), in individuals with immuno-



**Figure 1** Occurrence of yeasts isolated in 45 dehydrated bee-pollen collected in nine Brazilian States.

suppression can occur a population imbalance of these opportunistic pathogens, resulting in infection. This imbalance can also occur due to stress or changes in intestinal pH.

*Zygosaccharomyces rouxii* was also found in commercial samples of dehydrated bee-pollen commercialized in Portugal and Spain (Nogueira et al. 2012). The *Z. rouxii* is a spoilage micro-organism known for its high tolerance to osmotic stress (Pribylova et al. 2007). *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens* and *Hanseniaspora uvarum* deteriorate foods by fermentation (Moreira et al. 2011; Nogueira et al. 2012). *Debaryomyces hansenii* has been found in different foods of low water activity and products with elevated sugar content. This species is also associated with deterioration processes (Breuer and Harms 2006).

Although, as far as we know, only one study identifying yeast in bee-pollen has been published (Nogueira et al. 2012), the presence of these micro-organisms in honey has been extensively reported (Teixeira et al. 2003; Carvalho et al. 2005). Considering that both are bee products, it is possible that the bee itself is the source of contamination or contamination that occurs because of the wide distribution of these micro-organisms in nature, and consequently, are present on pollen grains. In this study, the presence of yeast in the samples seems unrelated to the season or region where the dehydrated bee-pollen were produced, since these micro-organisms have been identified in products from all nine States and in different seasons.

This is the most comprehensive study of the microbiological quality of dehydrated bee-pollen produced in Brazil, including a large number of samples and analyses. The values for groups of aerobic mesophilic micro-organisms, psychrotrophs, total coliforms and moulds and yeasts are in agreement with the results reported in the literature and are considered acceptable by the IHC. The absence of pathogenic bacteria is a positive result,

although the identification of potentially pathogenic yeast is of concern. It is necessary to create health quality criteria for bee-pollen and to require more attention from producers and warehouses to management practices in the field and processing to prevent endangering the health of consumers and to increase the shelf life of the product.

#### Material and methods

The study was conducted in the Microbiology Laboratory (ML) of the Agrarian Superior School/Polytechnic Institute of Bragança, Portugal. Samples were submitted from beekeepers and warehouses linked to the Brazilian Confederation of Apicultural or State Associations, as well as randomly purchased on the market for investigative purposes. Forty-five bee-pollen samples from *Apis mellifera* bees, dehydrated and ready for consumption, were collected between November 2011 and December 2013 in 22 apiaries in nine Brazilian States (Table 3) and sent to the Food Analysis Laboratory of the Faculty of Pharmaceutical Sciences/University of São Paulo (São Paulo, Brazil). Samples were coded and stored at 0°C. Groups of samples were sent at room temperature to the ML (five groups, shipping time: up to 5 days), then stored at 0°C until analysed.

The packages were opened in a laminar flow cabinet and homogenized to obtain a  $10 \pm 0.2$  g portion for analysis. The portion was placed aseptically into sterile bags and homogenized in a presterilized Stomacher Lab-Blender (Seward type 400, London, UK) for 1 min with 90 ml of sterilized peptone water (HiMedia, Mumbai, India). Serial dilutions were also prepared using peptone water (1 : 10, v/v).

The aerobic mesophilic micro-organism count was performed 48 h after the incorporation of 1 ml of each dilution in plate count agar (PCA) (HiMedia, Mumbai,

**Table 3** Sample code, collection date, origin and apiary of the 45 dehydrated bee-pollen samples

Sample code	Collection date	Origin/Brazilian state	Apiary*
1	November/11 to December/11	Rio Grande do Norte	A
2	December/11	Santa Catarina	B
3	12–20/April/12	Sergipe	C
4	21/April to 11/May/12	Sergipe	C
5	19/June/12	Bahia	D
6	21/June/12	Bahia	E
7	23/July/12	Bahia	D
8	01/August/12	Bahia	D
9	12/August/12	Bahia	D
10	September/12	Santa Catarina	F
11	03/September/12	São Paulo	G
12	14/September/12	Paraná	H
13	18/September/12	Bahia	E
14	23/September/12	Bahia	D
15	25/September/12	Rio Grande do Norte	A
16	01/October/12	Rio Grande do Norte	I
17	03/October/12	São Paulo	G
18	05/October/12	Rio Grande do Norte	J
19	06/October/12	Bahia	D
20	15–30/October/12	Rio Grande do Sul	K
21	16/October/12	São Paulo	G
22	25/October to 08/nov/12	São Paulo	G
23	01–20/nov/12	Rio Grande do Sul	K
24	20/November to 04/December/12	São Paulo	G
25	25/November to 10/December/12	Rio Grande do Sul	K
26	28/November/12	Bahia	L
27†	December/12	São Paulo	M
28	December/12	Mato Grosso	N
29	06–13/December/12	São Paulo	G
30	08–15/January/13	São Paulo	G
31	18–25/January/13	São Paulo	G
32	11/February/2013	Bahia	L
33	26/April to 04/May/13	Bahia	O
34	25/April to 01/May/13	Bahia	P
35†	May/13	Paraná	Q
36	June/13	Mato Grosso	R
37	June/13	Bahia	S
38†	June/13	São Paulo	M
39	June/13	Bahia	T
40†	September/13	São Paulo	U
41	05/September/13	Mato Grosso do Sul	V
42†	November/13	Paraná	X
43†	November/13	São Paulo	U
44†	December/13	São Paulo	U
45†	December/13	Paraná	Q

\*Equal letters in this column indicate samples collected in the same apiary.

†Samples purchased on the market.

India) and incubation at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (Portuguese Standard, 2002a). The count was determined using the formula:

$$\text{CFU g}^{-1} = \sum C / [V * (n_1 + 0.1n_2) * d]$$

where:  $\sum C$  = sum of colonies counted on all plates (15–150 colonies);

$V$  = volume of inoculum inoculated in each plate;

$n_1$  = number of plates on which the first dilution was counted;

$n_2$  = number of plates on which the second dilution was counted;

$d$  = dilution from which the first counts were obtained.

To count the total number of psychrotrophs, 0.1 ml aliquots of the dilutions were inoculated onto the surface of Petri dishes containing solidified PCA and incubated at  $6.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for 10 days (Cousin *et al.* 2001). Yeasts and moulds were counted according to ISO 21572-2:2008 (2008), where 0.1 ml of the dilutions was seeded onto the surface of Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (HiMedia, Mumbai, India) acidified with tartaric acid and then incubated at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  for 5 days. The results were expressed as colony forming unit per g of dehydrated bee-pollen (CFU  $\text{g}^{-1}$ ).

Yeasts were identified using an API 20C AUX system (BioMerieux, Hazelwood, MO, USA) with a pattern of strains previously identified by PCR for comparison. Previously, the cultures were isolated in Petri dishes containing Sabouraud agar (HiMedia, Mumbai, India) after incubation for 48 h at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Each strain was inoculated into 2 ml of sodium chloride solution (0.85%, w/v) to achieve turbidity visually equivalent to a 2 McFarland turbidity standard. Then, 100  $\mu\text{l}$  of this preparation was inoculated into tubes containing C medium, and the contents were transferred to the corresponding API 20C AUX yeast panel. Each panel was incubated at  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  for 48 h. Identification was performed according to the manufacturer's instructions (Nogueira *et al.* 2012).

The enumeration of total coliforms and *E. coli* was performed using a SimPlate of BioControl kit (AOAC, 2000). The culture medium was prepared following the manufacturer's instructions. Then, 1 ml of the dilution was inoculated in culture medium and vortexed. The inocula were transferred to the kit plates and the plates were incubated at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  for 24–48 h. Wells where the colour changed from blue to pink after incubation were considered positive for total coliforms, and these were considered positive for *E. coli* if they fluoresced under a UV lamp (Viber Lourma, Merck, Paris, France, TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>) at a wavelength of 365 nm. The number of wells positive for total coliforms and *E. coli* were converted to the most probable

number per g of dehydrated bee-pollen (MPN g<sup>-1</sup>) according to the table provided by the manufacturer.

Determination of coagulase-positive *Staphylococcus* was performed as described in Portuguese Standard (2002b). First, 0.1 ml aliquots of the dilutions were inoculated by spreading on Baird-Parker agar (HiMedia, Mumbai, India) enriched with egg yolk and incubated for 24 h at 37 ± 2°C. Typical and atypical colonies were inoculated into tubes containing brain heart infusion broth (VWR, Denver, CO, USA) and incubated for 24 h at 37 ± 2°C. Finally, we proceeded to the coagulase test using rabbit serum (Merck, Darmstadt, Germany). The results were expressed as colony forming units per g of dehydrated bee-pollen (CFU g<sup>-1</sup>).

The occurrence of sulphite-reducing clostridia spores was determined as described in the ISO 15213:2003 (2003). First, 10, 5 and 1 ml samples of the initial dilution were placed into sterilized test tubes and subjected to heating in a water bath at 80°C for 10 min. The contents of the tubes were poured into Petri dishes and then incorporated into culture Iron Sulphite Agar (HiMedia, Mumbai, India) previously prepared according to the manufacturer's instructions. The incubation occurred at 37 ± 2°C for 48 h under anaerobic conditions. Plates with characteristic black colonies were considered positive. The results were expressed as the presence or absence of sulphite-reducing clostridia spores in 0.01 g of sample.

To determine the occurrence of *Salmonella* sp., we used the 1–2 TEST kit (BioControl) (AOAC, 2000) prepared according to the manufacturer's instructions. A 100 µl initial dilution was added to the kit, followed by incubation for 14–30 h at 37 ± 2°C. The results were defined as positive for *Salmonella* sp. upon the formation of a white band, i.e. U-shaped or meniscus-shaped. The results were expressed as the presence or absence of *Salmonella* sp. in 25 g of dehydrated bee-pollen.

The results were shown as mean and standard deviation of three replicates. The dates were submitted to ANOVA with a F test and, when relevant, a Tukey's HSD test with  $\alpha = 0.05$ . The *Statistical Analysis System* 6.0 program was used for the calculations.

### Acknowledgements

The authors are grateful to State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support (FAPESP process 2011/51741-5) and scholarship granted to Adriane Alexandre Machado de Melo (FAPESP process 2013/23179-6).

### Conflict of Interest

The authors have no conflict of interests.

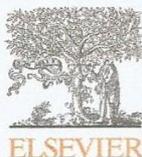
### References

- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*, 17th edn. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- Barreto, L.M.R.C., Funari, S.R.C. and Orsi, R.O. (2005) Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete Estados brasileiros e do Distrito Federal. *Boletim de Indústria Animal* **62**, 167–175.
- Bastos, D.H.M., Rocha, C.L., Cunha, I.B.S., Carvalho, P.O. and Torres, E.A.S. (2003) Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais - Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* **62**, 239–244.
- Bishop, P. (2012) Eucaryotic microorganisms: fungi, protozoa and multicellular parasites. In *Microbiology and Infection Control for Health Professionals*, 5th edn ed. Lee, G.M. pp.110–134. Frenchs Forest, NSW: Pearson Australia.
- Brazilian Legislation of 19 January 2001 implementing Normative Instruction 3/MAPA/Brazil that approved the Technical Regulations of Identity and Quality of bee venom, beeswax, royal jelly, lyophilized royal jelly, bee-pollen, propolis and propolis extract. Union Official Diary section 1, 23.01.2001. p.18.
- Breuer, U. and Harms, H. (2006) *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **23**, 415–437.
- Campos, M.G.R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L.B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C. and Ferreira, F. (2008) Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J Apicult Res* **47**, 156–163.
- Carvalho, C.M., Rocha, A., Estevinho, M.L.F. and Choupina, A. (2005) Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the its region. *Cienc Tecnol Aliment* **5**, 11–17.
- Chiappini, E., Galli, L., Pecile, P., Vierucci, A. and Martino, M. (2002) Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among *Salmonella* enterica isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea. *Clin Ther* **24**, 1585–1594.
- Cousin, M.A., Jay, J.M. and Vasavada, P.C. (2001) Psychrotrophic microorganisms. In *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*, ed. Downes, F.P. and Ito, K. pp. 159–166. Washington, DC: American Public Health Association.
- Estevinho, M.L., Rodrigues, S., Pereira, A.P. and Feás, X. (2012) Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int J Food Sci Technol* **47**, 429–435.
- Feás, X., Vázquez-Tato, M.P., Estevinho, L., Seijas, J.A. and Iglesias, A. (2012) Organic bee pollen: bioactive compounds, antioxidante activity and microbiological quality. *Molecules* **17**, 8359–8377.
- Franco, B.D.G.M. and Landgraf, M. (2009) *Microbiologia dos alimentos*, 6th edn. São Paulo, BR: Atheneu.
- Giolo, M.P. and Svidzinski, T.I.E. (2010) Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab* **46**, 225–234.

- González, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A. and Jiménez, M. (2005) Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int J Food Microbiol* **105**, 1–9.
- Hani, B., Dalila, B., Saliha, D., Daound, H., Moulound, G. and Seddik, K. (2012) Microbiological sanitary aspects of pollen. *Adv Environ Biol* **6**, 1415–1420.
- Harris, J.R., Lockhart, S.R., Debess, E., Marsden-Haug, N., Goldoft, M., Wohrle, R., Lee, S., Smelser, C. et al. (2011) *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clin Infect Dis* **53**, 1188–1195.
- Hervatin, H.L. (2009) *Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas* (Master's thesis). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. Available at: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000469566>
- ISO - International Organization for Standardization (2003) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions*. Approved Standard 15213:2003. Winterthur, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO - International Organization for Standardization (2008) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*. Approved Standard 21572-2:2008. Winterthur, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Kaper, J.B., Nataro, J.O. and Mobley, H.L.T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123–140.
- Monma, C., Hatakeyama, K., Obata, H., Yokoyama, K., Konishi, N., Itoh, T. and Kai, A. (2015) Four food-borne outbreaks caused by a new type of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol* **53**, 859–867.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T. and Vasconcelos, I. (2011) Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* **22**, 662–667.
- Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschäpe, H. and Schmidt, M.A. (2007) Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3380–3390.
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X. and Estevinho, L.M. (2012) Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *Int J Mol Sci* **13**, 11173–11187.
- Portuguese Standard (2002a) *Food microbiology - general rules for count of microorganism at 30°C*. Approved Standard NP-3788. Portugal: Portuguese Quality Institute.
- Portuguese Standard (2002b) *Food microbiology - General rules for count of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 1: Technique including confirmation of colonies*. Approved Standard NP-4400-1. Portugal: Portuguese Quality Institute.
- Pribylova, L., Montigny, J. and Sychrova, H. (2007) Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast* **24**, 171–180.
- Puig-Peña, Y., Del-Risco-Ríos, C.A., Álvarez-Rivera, V.P., Leiva-Castillo, V. and García-Neninger, R. (2012) Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. *Rev CENIC Cien Biol* **43**, 23–27.
- Rocha, J.F.M. (2013). *Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola* (Master's thesis). Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal. Available at: <http://hdl.handle.net/10198/9289>
- Santos, L.O., Silveira, N.F.A., Leite, R.S.F. and Borguini, R.G. (2010). *Avaliação microbiológica do pólen apícola comercializado no estado de São Paulo*. In: IV Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica. Campinas – Brazil. Available at: [www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010](http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010)
- Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Nicoli, J.R., Antonini, Y., Martins, R.P., Lachance, M. and Rosa, C.A. (2003) *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 339–343.
- Vasquez, Y. (2009) Infant botulism: a review of two cases reported in 2008 from El Paso, Texas. *J Appl Res* **9**, 52–56.
- Wirth, F. and Goldani, L.Z. (2012) Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspectives Infect Dis*, **2012**, 1–7.

## ANEXO VII - Artigo publicado no periodico LWT - Food Science and Technology

LWT - Food Science and Technology 65 (2016) 808–815



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

## Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters



Adriane Alexandre Machado De-Melo <sup>a,\*</sup>, Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho <sup>b</sup>,  
 José Augusto Gasparotto Sattler <sup>a</sup>, Bianca Rodrigues Souza <sup>a</sup>, Alex da Silva Freitas <sup>c</sup>,  
 Ortrud Monika Barth <sup>d</sup>, Ligia Bicudo Almeida-Muradian <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Food Analysis, Department of Food and Experimental Nutrition, Pharmaceutical Sciences School, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> CIMO-Mountain Research Center, Department of Biology and Biotechnology, Polytechnic Institute of Bragança, Bragança, Portugal

<sup>c</sup> Laboratory of Marine Geology, Federal Fluminense University, Niterói, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Palynology, Department of Geology, Institute of Geosciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 May 2015

Received in revised form

2 September 2015

Accepted 6 September 2015

Available online 9 September 2015

## Keywords:

Dehydration methods

Bee products

Nutritional value

Biological properties

Microbiological quality

## Chemical compounds studied in this article:

 $\alpha$ -Tocopherol (PubChem CID: 14985)

Thiamine (PubChem CID: 1130)

Riboflavin (PubChem CID: 493570)

Iron (PubChem CID: 23925)

Copper (PubChem CID: 23978)

Zinc (PubChem CID: 23994)

Magnesium (PubChem CID: 5462224)

DPPH

Free radical (PubChem CID: 2735032)

## ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the physical, chemical and biological parameters and the microbiological quality of bee-pollen samples treated with different dehydration processes and to correlate the results. The samples came mainly from *Eucalyptus* (Myrtaceae) and *Eupatorium* (Asteraceae) plants. The dehydration conditions of the samples influenced the L\*a\*b\* colour parameters and the biological value. Unlike the protein and lipid content, the glucose and fructose content were unaffected. The vitamin E content ( $27.2 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ ,  $27.5 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ ) in oven-dehydrated samples with forced air circulation was significantly lower ( $P < 0.05$ ) compared with lyophilized samples ( $37.5 \pm 0.2 \text{ g/100 g}$ ,  $53.7 \pm 3.9 \text{ g/100 g}$ ). Overall, the results were inconclusive for vitamin B complex, minerals and microbiological indicators. There was a positive correlation between the colour parameters L\* and b\* and the total phenolic content, as well as between phenolic content and the antioxidant and antimicrobial capacity. The data indicate that lyophilization might be a viable alternative to the current process, resulting in dehydrated bee-pollen with higher biological activity.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Bee-pollen results from the agglutination of hundreds of pollen grains collected from flowers by bees. The bees add small amounts of salivary secretions, nectar and/or honey to the pollen grains

(Brasil, 2001; Campos et al., 2008). Bee-pollen contains different amounts of reducing and non-reducing sugars (Qian, Khan, Watson, & Fearnley, 2008), fibres (Funari et al., 2003), essential aminoacids (Paramás, Báez, Marcos, García-Villanova, & Sánchez, 2006), saturated and unsaturated fatty acids (Human & Nicolson, 2006; Yang et al., 2013), minerals (Morgano et al., 2012; Yang et al., 2013), vitamins (Arruda, Santos-Pereira, Freitas, Barth, & Almeida-Muradian, 2013; Melo & Almeida-Muradian, 2010; Oliveira et al., 2009) and bioactive metabolites such as phenolic compounds (Carpes et al., 2008). Pharmacological properties are attributed to the phenolics, such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, hepatoprotective and antiallergenic properties (Campos et al., 2008; Medeiros et al., 2008; Nogueira,

\* Corresponding author. Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 13-A, CEP: 05580-000, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail addresses: [adriane.melo@usp.br](mailto:adriane.melo@usp.br) (A.A.M. De-Melo), [leticia@ipb.pt](mailto:leticia@ipb.pt) (M.L.M.F. Estevinho), [jagasparotto@gmail.com](mailto:jagasparotto@gmail.com) (J.A.G. Sattler), [bianca.alimentos@gmail.com](mailto:bianca.alimentos@gmail.com) (B.R. Souza), [alexsilfre@gmail.com](mailto:alexsilfre@gmail.com) (A.S. Freitas), [monikabarth@gmail.com](mailto:monikabarth@gmail.com) (O.M. Barth), [ligiabi@usp.br](mailto:ligiabi@usp.br) (L.B. Almeida-Muradian).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014>

0023-6438/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Iglesias, Feás, & Estevinho, 2012; Pascoal, Rodrigues, Teixeira, Feás, & Estevinho, 2014).

The beekeepers collect bee-pollen from the hives and transport it to the processing unit. Generally, processing involves cleaning, freezing, thawing, dehydration, packaging, transportation and marketing. The purpose of the dehydration process is to increase the product shelf life. *In nature*, bee-pollen contains 20–30 g/100 g of water (moisture) and has a water activity from 0.66 to 0.82, which provides a favourable matrix for the proliferation of microorganisms and possible chemical and enzymatic reactions (Campos et al., 2008; Franco & Landgraf, 2009; Rocha, 2013). Once dehydrated, the bee-pollen is designated as “dehydrated bee-pollen”, for which Brazilian legislation establishes a maximum temperature of 42 °C for the process (Barreto, Funari, & Orsi, 2005; Brasil, 2001). The use of an electric oven for dehydrating bee-pollen might be related to equipment costs, since other efficient conservation alternatives such as lyophilization are scarcely used. Because the results of dehydration conditions on the quality of bee-pollen are poorly understood, the purpose of this study was to compare the use of an electric oven with forced air circulation and a lyophilizer on the physical, chemical, biological and microbiological quality of dehydrated bee-pollen produced in Brazil, as well to correlate the results.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bee-pollen samples

Bee-pollen samples produced by *Apis mellifera* were collected from an apiary in São Paulo, Brazil, in April/2012 and September/2012. Pollen analysis of the bee-pollen collected in April indicated the predominance of *Eucalyptus* with some Asteraceae/Linguliflora and *Mimosa caesalpiniaefolia*. In the bee-pollen collected in September, the genus *Eupatorium* was predominant, with a lesser content of *Piper*, *Elephantopus*, *Eucalyptus*, Cyperaceae and Anacardiaceae. The pollen analysis was performed according to the method described by Barth et al. (2010). After collection, the product was frozen at –20 °C in the apiary then sent to the MN Própolis (Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil), a food company that commercialize bee-pollen dehydrated in electric oven with forced air circulation and recently implemented the process of dehydration by lyophilization. Each sample was divided into two aliquots and processed under the conditions adopted by the company. One aliquot was frozen at –40 °C then dehydrated in a vacuum lyophilizer (FD-TFD-80LF4, Edwards) for 18 h. The other aliquot was thawed at room temperature and dried in an electric oven with forced air circulation (ESA 1368, Sercon) at 42 °C for 24–52 h. For the oven drying, the variation in processing time occurred because the trays were removed when the moisture in the product reached a value close to that observed in the sample subjected to lyophilization (6–8 g/100 g). The samples were vacuum packed in food-grade polyethylene bags, then sent to the Laboratory of Food Analysis of the Pharmaceutical Science School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, where they were stored at room temperature and away from light for 30 days. Part of the experiment was conducted in the Laboratory of Microbiology of the Agrarian School, Polytechnic Institute of Bragança, Bragança, Portugal. Immediately before each analysis, the samples were crushed and sieved through a 0.595-mm sieve.

### 2.2. Total nitrogen – protein content

The total nitrogen content was determined by micro-Kjeldahl method from 100 mg of sample. A factor of 6.25 was used to convert nitrogen to crude protein (Almeida-Muradian, Arruda, & Barreto, 2012; AOAC, 2000).

### 2.3. Ethereal extract – lipid content

Lipid content was determined according to the Soxhlet intermittent method (Almeida-Muradian et al., 2012), based on lipid extraction by diethyl ether from 2 g of material.

### 2.4. Glucose and fructose determination

The extraction and determination of the sugars glucose and fructose were performed using the method described by Almeida-Muradian et al. (2012) with a high performance liquid chromatography system (Shimadzu, Software LC Solution V.1.25 SP2) composed of a pump (LC-20AT), an auto sampler and a fluorescence detector (RF-10AXL). The separation occurred in a mobile phase composed of acetonitrile and water (85:15, mL: mL) at a flow rate of 1 mL/min, with a 20  $\mu$ L injection volume into a NH<sub>2</sub> normal phase column [Shim-pack (CLC-Sil), 5  $\mu$ m, 25 cm  $\times$  4.6 mm, guard column 10 cm  $\times$  4.6 mm]. Refractive index detection was used. The column temperature was maintained at 40 °C. Quantification was performed by external standard curve using at least five concentration levels for each standard.

### 2.5. Determination of minerals

Minerals were extracted by acid digestion (nitric acid and perchloric acid, 2:1, mL: mL) in an open system from 500 mg of sample (Malavolta, Vitti, & Oliveira, 1989). The sodium (Na), calcium (Ca), potassium (K), copper (Cu), magnesium (Mg) and zinc (Zn) concentrations were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Ciros Vision EOP, Spectro) as described by Morgano et al. (2012), with the following operating parameters: forward power of 1.45 kW; cooling air flow rate of 12 L/min; auxiliary argon flow of 1 L/min; nebulizer air flow rate of 1 L/min and sample flow rate of 2 mL/min. The wavelengths were specific for each element and a calibration curve was prepared with different concentrations of each mineral.

### 2.6. Determination of vitamin E

The determination of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) was performed as described by Melo and Almeida-Muradian (2010) using a high performance liquid chromatography system (Shimadzu, Software LC Solution V.1.25 SP2) composed of a pump (LC-20AT), an auto sampler and a fluorescence detector (RF-10AXL) with a 295 nm excitation wavelength and a 330 nm emission wavelength. A 25 cm silica Shim-pack CLC-Sil column (Shimadzu) with a pre-filtered and degassed mobile phase consisting of hexane and isopropyl alcohol (99:1, mL: mL) and 1.5 mL/min flow rate was used. The  $\alpha$ -tocopherol was identified by comparison of the retention time of the standard synthetic  $\alpha$ -tocopherol and quantified using an external standard curve of at least five concentration levels.

### 2.7. Determination of B complex vitamin

Arruda et al. (2013) validated methods for the extraction and identification of vitamin B complex vitamins in bee-pollen. These methods, operating parameters and the same equipment were used to determine the values of thiamine (vitamin B<sub>1</sub>), riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>), niacin and niacinamide (vitamin PP or B<sub>3</sub>), pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxol (vitamin B<sub>6</sub>).

### 2.8. Ethanolic extracts (ETE)

Ethanolic extracts (ETE) were prepared as described by Carpes et al. (2008), with modifications. The compounds were extracted from a 2 g sample with 25 mL of ethanol solution (ethanol: distilled

water, 70:30, mL: mL) in a water bath at 70 °C for 30 min with 105 rpm agitation. The extract was filtered by a quality filter (porosity: 3 microns) into a 25 mL volumetric flask and the volume was adjusted with ethanol solution (ethanol: distilled water, 70:30, mL: mL), then stored in amber glass at -4 °C until analysed. All extractions were performed in triplicate.

### 2.9. Total phenolic content

The total phenolic content was determined as described by Carpes et al. (2008), with the following modifications: the ETE was diluted in ethanol solution (ethanol:distilled water, 70:30, mL: mL) rather than water and all readings were performed with a spectrophotometer operating at 20 °C. A gallic acid standard curve was constructed and the results were expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of dehydrated bee-pollen.

### 2.10. Antioxidant capacity

Two methods were used to determine the antioxidant capacity of the samples: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. In the DPPH method is measured the reduction of this radical by receiving an electron or a hydrogen atom from antioxidant. The ORAC assay indicate the radical scavenging ability of antioxidant against peroxy radical generated from 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH).

#### 2.10.1. DPPH method

The antioxidant capacity of the samples was determined by the DPPH method according to the procedure described by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995), with modifications. An aliquot of 1.5 mL of a methanol solution of DPPH• (with an absorbance at 517 nm between 0.600 and 0.700) was added to a test tube containing 0.5 mL of ETE diluted in ethanol solution (ethanol: distilled water, 70:30, mL: mL). The tubes were incubated at room temperature away from light for 30 min, and then read in a spectrophotometer (UV 1650 PC, Shimadzu) at an absorbance of 517 nm at 20 °C. Different solutions were made from each ETE, and the percentage discoloration (PD) was calculated according to the formula proposed by Mensor et al. (2001):

Solutions of Trolox® at concentrations of 6.25; 12.5; 25; 50; 75 and 100 µmol/L were prepared to construct a standard curve of concentration  $\times$  PD. The results were expressed in µmol of Trolox® equivalents (TE) per g of dehydrated bee-pollen.

#### 2.10.2. ORAC method

The ORAC determination was done by the method described by Ou, Hampsch-Woodill, and Prior (2001) with modifications proposed by Huang, Ou, and Prior (2005). The ETE were diluted in ethanol solution (ethanol: distilled water, 70:30, mL: mL) and a 25 µL aliquot was analysed with Fluorescein at  $40 \times 10^{-9}$  mol/L, AAPH at 0.153 mol/L, a plate reader (Synergy HT – Bio Tek Instruments) and working temperature of 37 °C. Solutions of Trolox® at concentrations 6.25; 12.5; 25; 50; 75 and 100 µmol/L were prepared to construct a standard curve. The relative value of ORAC was calculated based on a linear regression equation between the concentration of Trolox® and the area under the fluorescence curve automatically generated by the instrument. The results were expressed in µmol of Trolox® equivalent (TE) per g of dehydrated bee-pollen.

### 2.11. Anti-inflammatory capacity

The percentage of inhibition of the enzyme hyaluronidase was used as an indirect measurement of the anti-inflammatory capacity of the samples. The methodology described by Silva, Rodrigues, Feás,

and Estevinho (2012) was used and methanol extracts was prepared as described by Morais, Moreira, Feás, and Estevinho (2011). Reactions contained 50 µL of dehydrated bee-pollen extract and 50 µL ( $5.833 \times 10^{-6}$  kat) of hyaluronidase (Type IV-S: bovine tests).

### 2.12. Antimicrobial capacity

Antimicrobial capacity of the samples was determined against Gram negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC; *E. coli* ESA72; *Klebsiella* ATCC; *Klebsiella* ESA61), Gram positive bacteria (*Streptococcus pyogenes* ATCC; *S. pyogenes* ESA12; *Staphylococcus aureus* ATCC; *S. aureus* ESA54) and yeasts (*Candida albicans* ATCC; *C. albicans* ESA109). The microorganisms were isolated from biological fluids and identified in the Northeast Hospital Centre, Bragança, Portugal. Bacteria and yeasts were plated on Mueller-Hinton medium with glycerol solution (glycerol: distilled water, 20:80, mL: mL) and stored at -70 °C. For analysis, the bacteria were plated on nutrient agar ( $37 \pm 1$  °C, 24 h) and yeasts on solid Yeast Nitrogen Base medium ( $25 \pm 1$  °C; 48 h). The inoculum was transferred to an Erlenmeyer flask containing a sodium chloride solution (0.85 g/100 mL of distilled water) and adjusted to 0.5 on the MacFarland scale as confirmed by a spectrophotometric (Varian UV-Visible Spectrophotometer, Cary 50 Scan) reading at 580 nm for bacteria and 640 nm for yeasts. Cell suspensions were finally diluted to  $10^4$  CFU/mL for use in the activity assays. Tests were carried out according to the procedure described by Morais et al. (2011). Fluconazole and gentamycin were used as positive controls. The results were expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) which was defined as the lowest concentration of dehydrated bee-pollen extract that inhibited visible growth of microorganisms.

### 2.13. Microbiological quality

Counts of yeasts and molds (IPQ, 1985), mesophilic microorganisms (IPQ, 2002) and psychrotrophics (IPQ, 1987) were made and the results expressed as colony forming units per g of dehydrated bee-pollen (CFU/g). The enumeration of total coliforms was done with a SimPlate kit (BioControl) (AOAC, 2000) and the results were expressed as the most probable numbers of coliforms per gram of bee-pollen (MPN/g).

### 2.14. Lab instrumental colour parameters

The instrumental colour parameters were determined by reflectance on a ColorQuest XE equipment (Hunterlab, serial number: CQX 2329) operating CIE L\*a\*b\* (L\*: 0 to 100, a\*: - blue to + red, and b\*: - green to + yellow) with Universal Software V4.10. Each sample was analysed in a 50-mm quartz cuvette and the results were expressed as L\*a\*b\* parameters.

### 2.15. Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate, and the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. To identify treatment effects, comparisons were made using the nonparametric Kruskal-Wallis test and the data compared (post hoc) two by two by the non-parametric Mann Whitney test for each variable. The relationship between variables was assessed by Spearman's correlation. All comparisons used a significance level ( $\alpha$ ) of 0.05.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physicochemical parameters

The physicochemical parameters of the samples are presented in Table 1. Studies indicate that in the dehydrated bee-pollen the

protein content can vary from 10 to 45 g/100 g, fructose from 12 to 24 g/100 g, glucose from 7 to 22 g/100 g, lipids from 1 to 13 g/100 g and ash from 0.5 to 6 g/100 g (Arruda et al., 2013; Campos et al., 2008; Nogueira et al., 2012; Qian et al., 2008). The lipid and glucose content observed in the samples of this study were consistent with the values cited above. However, the protein content was below 10 g/100 g and the fructose content was above 24 g/100 g in the samples collected in September, which may be related to botanical origin of the samples (Campos et al., 2008).

No significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed for glucose and fructose values between the two processes. These carbohydrates are probably stable under both conditions applied. A significantly lower level ( $P < 0.05$ ) of proteins in samples dehydrated in electric oven indicates that heating (even at moderate temperatures) and the presence of gases (such as oxygen) can induce loss of these compounds. Significantly higher ( $P < 0.05$ ) lipids were observed in the lyophilized samples. Processing conditions can change the structure of the grains, which may or may not facilitate the extraction of the compounds. Freeze drying seems to facilitate the extraction of bee-pollen lipids when compared with an electric oven with forced air circulation (Domínguez-Valhondo, Gil, Hernández & González-Gómez, 2011).

In previous studies with dehydrated bee-pollen samples, different amounts of K (3.2–20 g/kg), Ca (0.2–3.5 g/kg), Mg (0.2–3 g/kg), Na (1–862 mg/kg), Zn (30–250 mg/kg) and Cu (2–20 mg/kg) were observed (Funari et al., 2003; Carpes, Mourão, Alencar, & Masson, 2009; Bogdanov, 2012; Morgano et al., 2012; Yang et al., 2013). The values observed in this study are consistent with literature, except the potassium content ( $2.6 \pm 0.1$  g/kg). The mineral content can vary according to differences on the floral origin of pollen and on the plant growth conditions, such as soil and geographic origin (Carpes et al., 2009). The influence of treatment on Ca, K, Mg, Na, Zn and Cu content was inconclusive. It was identified a positive correlation between Zn content and the antioxidant capacity ( $R = 0.830$ ,  $P = 0.001$ ) and the Cu content and the antioxidant capacity ( $R = 0.769$ ,  $P = 0.003$ ) for both methods (DPPH and ORAC), however, Cu and Zn can not be considered as antioxidants compounds. These minerals are cofactors for copper, zinc superoxide dismutase (Cu–Zn SOD), an important antioxidant enzyme already reported in plants (Lee et al., 2007); therefore, Cu and Zn might be indicators of presence of the Cu–Zn SOD in these bee-pollen samples.

The vitamin E content was lower ( $P < 0.05$ ) in samples dehydrated in an electric oven. According to Miquel, Alegria, Barberá, Farré, and Clemente (2004) factors such as light, oxygen and temperature are responsible for degradation of tocopherols. In Brazil, studies evaluating the presence of  $\alpha$ -tocopherol in bee-pollen were performed only with samples treated in an oven at 42 °C. Under this condition, the vitamin E content varied from 4.7 to 113.9  $\mu\text{g/g}$  (Melo & Almeida-Muradian, 2010; Oliveira et al., 2009; Sattler, 2013). Correlation analysis (Spearman) showed that the vitamin E content is strongly ( $R = 0.65$ ,  $P < 0.05$ ) associated with the colour parameter  $b^*$  (yellow colour) so yellow bee pollen samples could be presumably characterized by the presence of  $\alpha$ -tocopherol.

Treatment effects on the content of B complex vitamins were inconclusive. Although heating can cause a loss of these vitamins in foods (Sucupira, Xerez, & Souza, 2012), this was not completely observed in this study. Studies with dehydrated bee-pollen samples indicated variation in the amount of thiamine (0.5–1.8 mg/100 g), riboflavin (0.4–2.6 mg/100 g), niacin (0.7–3.9 mg/100 g), nicotinamide (2.4–10.7 mg/100 g), pyridoxine (0.3–0.9 mg/100 g), pyridoxal (0.1–6.7 mg/100 g) and pyridoxol (0.1–0.2 mg/100 g) according to botanical origin of the samples (Arruda et al., 2013; Souza, 2014). The values described in this study are consistent with the literature. It should be noted that a 25 g sample contains at least 50% of the recommended daily intake of vitamin B<sub>6</sub> (1.3 mg/

day, males and females, 31–50 y) (USDA, 1998).

There were variations in the colour parameters  $L^*$  and  $b^*$  with the processing conditions. The influence of treatment on the parameter  $a^*$  was observed only in the sample collected in September. The parameter  $L^*$  indicates the darkness or lightness of the colour and, in general, the samples tend to have lighter ( $L^*$  values above 50). It was also observed that the samples tended towards red and yellow (i.e., had predominantly positive values of the parameters  $a^*$  and  $b^*$ ) (Table 1).

The predominance of yellow colour in dehydrated bee-pollen after grinding is visually obvious; therefore, the prevalence of positive values of  $b^*$  was expected. Smaller  $b^*$  values and higher  $a^*$  values in samples heated in the electric oven might be related to the occurrence of reactions during heating with air circulation. Silva, Rosa, and Vilas-Boas (2009) mentioned that heating can cause the oxidation of some compounds such as phenolics.

### 3.2. Biological activity indicators

Phenolic compounds are bioactive substances not synthesized by the human body that have specific metabolic or physiological actions and contribute to disease prevention if regularly present in the diet (Horst & Lajolo, 2011). Those compounds are secondary metabolites of vegetables whose profiles are species-specific (Campos et al., 2008). In dehydrated bee-pollen, the total phenolic content can vary from 5.4 to 132.4 mg GAE/g (Carpes et al., 2008; Menezes, Maciel, Miranda, & Druzian, 2010; Morais et al., 2011; Nogueira et al., 2012; Vecchia, Pegaro, Carpes, & Pegaro, 2009); therefore, the results of this study were consistent with literature. Treatment effects (i.e., the influence of processing) were observed on the phenolic content (Table 2), with the lowest levels observed in the samples treated in an electric oven ( $P < 0.05$ ). This may be related to the activity of specific enzymes such as polyphenol oxidase and peroxidase. For lyophilization, the samples were frozen when processed, whereas the portions dried in the electric oven had been previously thawed. Freezing and thawing a food matrix can cause cellular damage and therefore the release of enzymes that oxidize phenols (Silva et al., 2009).

As reported in previous studies of the dehydrated bee-pollen samples, the antioxidant capacity determined by DPPH method can vary from 135 to 2.814  $\mu\text{mol TE/g}$  (Marghitas et al., 2009). The results are usually reported as EC50 (minimum concentration required for of bee-pollen extracts to reduce the initial concentration of the DPPH by 50%) (Carpes et al., 2008, 2009; Chantarudee et al., 2012), making it difficult to compare studies. Arruda (2013) measured by ORAC method and found values of 133–576  $\mu\text{mol TE/g}$  of dehydrated bee-pollen. According to Marghitas et al. (2009), antioxidants compounds respond differently in various measurement methods, therefore it is important to compare different analytical methods involving specific reaction conditions and mechanisms of action.

The antioxidant capacity (by both methods) was higher in lyophilized samples ( $P < 0.05$ ). An analysis of the coefficients indicated a strong positive correlation between the antioxidant capacity and the total phenolic content (Table 3). The relationship between phenolic content and possible therapeutic properties is controversial for bee-pollen. Pascoal et al. (2014) found no relationship, whereas Carpes et al. (2008) found a positive relationship. It may be that there is a great influence not of the total concentration of these substances in the sample, but the presence of specific phenolic compounds related to botanical origin of bee-pollen.

The inhibition of the hyaluronidase activity was higher ( $P < 0.05$ ) in the lyophilized samples, therefore it can be inferred that the lyophilized samples have greater anti-inflammatory potential. The inhibition percentages ( $7.8 \pm 0.4$  to  $17.9 \pm 1.4\%$ ) were lower than those reported for some dehydrated bee-pollen samples

in another study ( $23.6 \pm 2.2$  and  $25.2 \pm 3.2\%$ ) (Pascoal et al., 2014), probably also because the botanical origin of the samples were different. Variations among treatments in the antimicrobial capacity according to the microorganism were evident, and indicated higher effectiveness ( $P < 0.05$ ) in the lyophilized samples.

Antimicrobial capacity against bacteria and yeasts was observed in all the samples, although the bacteria were more sensitive than yeasts. Graikou et al. (2011) analysed dehydrated bee-pollen produced in Greece and also observed a higher resistance of yeasts. Statistical analysis showed a negative correlation between total phenolic content and the antimicrobial capacity of the samples against bacteria (Table 3). It is noteworthy that, although the statistical analysis indicated a negative correlation, the interpretation of this correlation is positive because the lower the MIC, the lower the concentration of dehydrated bee-pollen required to inhibit microbial growth. It can be said that dehydration conditions influence the antimicrobial capacity of the samples only against *E. coli* ATCC, *Klebsiella* spp, *Klebsiella* ATCC and *C. albicans* ATCC. The processing conditions influenced the phenolic content (Table 2) and these compounds were directly related to antimicrobial ability against bacteria (Table 3), therefore it is possible that the lowest antimicrobial potential of the samples dehydrated in an electric oven is related to the lower content of phenolic compounds. Moreover, further studies are required to understand the influence of treatment on the antimicrobial capacity against the yeast.

Correlation analysis indicated a correlation of instrumental colour parameters, phenolic content, antimicrobial capacity against bacteria (excluding *E. coli* ATCC and *Klebsiella* ATCC) and antioxidant capacity (Table 3). This is the first study that has established a correlation between the  $L^* a^* b^*$  colour parameters with phenolic content and bioactive properties of bee-pollen samples. The instrumental analysis of colour is simple and fast, thus a correlation between this analysis and other characteristics of dehydrated bee-pollen could be used to select samples without a need for complex and time consuming analysis. On the basis of colour, the botanical source of nectar in honey can be distinguished in some cases (Kús et al., 2014).

### 3.3. Microbiological quality

The growth of aerobic mesophilic microorganisms, psychrophiles, molds and yeasts and total coliforms is an indicator of the production conditions, processing, storage and distribution of food (Rocha, 2013). An analysis of these micro-organisms is presented in Table 4. The results regarding the influence of treatment on these indicators were inconclusive in this study. For the sample collected during April, the largest values of molds and yeasts, total coliforms and aerobic mesophilic microorganisms were observed in the product dried in an electric oven. For the sample collected during

September, the largest values of molds and yeasts and total coliforms were observed in the lyophilized bee-pollen, and there was no significant influence ( $P > 0.05$ ) of the treatments on the growth of aerobic mesophilic microorganisms. It is known that the presence of microorganisms in the bee-pollen is related to contamination of the product while in the hive or during processing (Nogueira et al., 2012). It is possible that the samples became contaminated after removed from the electric oven or the lyophilizer and before packaging.

Correlation analysis indicated a negative correlation between the phenolic content and total coliforms ( $R = -0.790$ ,  $P = 0.002$ ) and the growth of molds and yeasts ( $R = -0.783$ ,  $P = 0.003$ ). Certain phenolics can affect bacterial growth and metabolism according to the concentration in the medium (Pascoal et al., 2014); therefore, it is possible that the values for these micro-organisms would be generally smaller in the samples in which certain phenolics are present or with high phenolic content.

## 4. Conclusions

Lyophilization resulted in higher levels of proteins, lipids, vitamin E and phenolic compounds, as well an influence on the instrumental colour parameters. Drying in an electric oven had a negative influence on antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties, although antimicrobial action is also related to the sensitivity of the microorganism. In general, the use of lyophilization might be a viable alternative to the current process, resulting in dehydrated bee-pollen with higher nutritional and biological properties. The correlation between the colour parameters  $L^* a^* b^*$  and certain biological properties of dehydrated bee-pollen can facilitate the sample selection for specific experiments. The microbiological quality of the product was not affected by treatment. In future research, a sensory analysis of treated samples under these conditions is recommended to identify whether consumer preference is affected by dehydration process.

## Acknowledgements

The authors are grateful to State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support (FAPESP process 2011/51741-5) and scholarship granted to AAM De-Melo (FAPESP process 2011/11746-8 and FAPESP process 2013/23179-6). For a scholarship granted to OM Barth from the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Process 304067/2013-0). To the MN Própolis company that supplied the samples.

## Appendix A.1

**Table 1**  
Instrumental parameters of colour and nutritive value (dry-matter basis) of bee-pollen samples dehydrated in electric oven and lyophilized.

Parameters		Collection period			
		April 2012		September 2012	
		Electric oven	Lyophilized	Electric oven	Lyophilized
Inst. colour	$L^*$ (0–100)	$51.1 \pm 0.4^B$	$58.4 \pm 0.4^A$	$42.8 \pm 1.8^B$	$49.9 \pm 0.5^B$
	$a^*$ (– or +)	$8.5 \pm 0.1^A$	$8.4 \pm 0.1^A$	$11.3 \pm 1.0^A$	$9.1 \pm 0.2^B$
	$b^*$ (– or +)	$48.1 \pm 0.3^B$	$56.1 \pm 0.3^A$	$43.7 \pm 1.9^B$	$53.7 \pm 0.4^A$
Proteins (g/100 g)		$10.7 \pm 0.1^B$	$11.4 \pm 0.5^A$	$8.3 \pm 0.1^B$	$9.6 \pm 0.1^A$
Lipids (g/100 g)		$7.6 \pm 0.1^B$	$8.2 \pm 0.2^A$	$6.6 \pm 0.3^B$	$7.8 \pm 0.3^A$
Glucose (g/100 g)		$13.3 \pm 0.8^A$	$14.9 \pm 0.7^A$	$18.2 \pm 0.5^A$	$18.2 \pm 0.2^A$
Fructose (g/100 g)		$18.7 \pm 1.4^A$	$21.1 \pm 1.3^A$	$26.4 \pm 0.7^A$	$26.9 \pm 0.5^A$
Minerals	Ca (g/kg)	$1.3 \pm 0.0^A$	$1.2 \pm 0.0^B$	$1.7 \pm 0.0^A$	$1.7 \pm 0.0^A$
	K (g/kg)	$5.2 \pm 0.1^A$	$5.2 \pm 0.1^A$	$2.6 \pm 0.1^B$	$4.2 \pm 0.1^A$
	Mg (g/kg)	$0.9 \pm 0.0^A$	$0.8 \pm 0.0^B$	$0.5 \pm 0.0^B$	$0.8 \pm 0.0^A$
	Na (mg/kg)	$50.2 \pm 1.0^A$	$41.3 \pm 1.2^B$	$32.5 \pm 0.8^A$	$30.4 \pm 2.0^A$

Table 1 (continued)

Parameters		Collection period			
		April 2012		September 2012	
		Electric oven	Lyophilized	Electric oven	Lyophilized
Vitamins	Zn (mg/kg)	105.8 ± 3.5 <sup>A</sup>	103.3 ± 1.0 <sup>A</sup>	63.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	96.2 ± 3.2 <sup>2</sup>
	Cu(mg/kg)	13.3 ± 0.0 <sup>A</sup>	13.1 ± 0.0 <sup>B</sup>	8.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	9.8 ± 0.6 <sup>a</sup>
	α-tocopherol (μg/g)	27.5 ± 0.4 <sup>B</sup>	37.5 ± 0.2 <sup>A</sup>	27.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	53.7 ± 3.9 <sup>a</sup>
	thiamine (mg/100 g)	1.3 ± 0.2 <sup>A</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>A</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>
	riboflavin(mg/100 g)	0.6 ± 0.0 <sup>A</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>B</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>
	niacin (mg/100 g)	2.6 ± 0.1 <sup>A</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>B</sup>	1.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.0 <sup>a</sup>
	Niacinamide (mg/100 g)	3.2 ± 0.1 <sup>A</sup>	3.7 ± 1.0 <sup>A</sup>	3.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
	Pyridoxamine (mg/100 g)	0.6 ± 0.0 <sup>A</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>B</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>
	Pyridoxal (mg/100 g)	3.8 ± 0.1 <sup>A</sup>	3.6 ± 1.0 <sup>A</sup>	1.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.0 <sup>a</sup>
	Pyridoxol (mg/100 g)	0.2 ± 0.1 <sup>A</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>A</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>

Values correspond to the average ± standard deviation of three replicates.

Capital letters represent the treatments applied on bee-pollen collected in April and small letters on the product collected in September. Averages followed by the same capital letter or the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

$$PD (\%) = \{1 - [Abs_{sample} - Abs_{SC}/Abs_{control}]\} \times 100 \quad A.1$$

where:  $Abs_{sample}$  = absorbance of the sample (dilution analysed; DPPH solution);

$Abs_{SC}$  = absorbance of the specific control (dilution analysed; methanol);

$Abs_{control}$  = absorbance of the control (metanol; DPPH solution).

Table 2

Total phenolics and pharmacological potential of bee-pollen samples dehydrated in electric oven and lyophilized, in dry-matter basis.

Parameters		Collection period				
		April 2012		September 2012		
		Electric oven	Lyophilized	Electric oven	Lyophilized	
Total phenolics (mg GAE/g)		19.7 ± 0.3 <sup>B</sup>	21.4 ± 0.1 <sup>A</sup>	9.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	10.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	
Anti-inflammatory capacity (% inhibition)		7.8 ± 0.4 <sup>B</sup>	12.6 ± 1.8 <sup>A</sup>	13.6 ± 2.6 <sup>b</sup>	17.9 ± 1.4 <sup>a</sup>	
Antioxidant capacity		DPPH (μmol TE/g)	63.9 ± 0.5 <sup>B</sup>	81.1 ± 3.7 <sup>A</sup>	31.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	41.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
		ORAC (μmol TE/g)	481.3 ± 6.1 <sup>B</sup>	559.3 ± 18.3 <sup>A</sup>	310.1 ± 10.3 <sup>b</sup>	367.8 ± 11.3 <sup>a</sup>
Antimicrobial capacity <sup>1</sup> (MIC) <sup>2</sup>		<i>Sp</i> ESA12	3.5 ± 0.8 <sup>A</sup>	2.5 ± 0.5 <sup>A</sup>	4.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.7 <sup>a</sup>
		<i>Sp</i> ATCC	2.9 ± 0.7 <sup>A</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>A</sup>	4.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.5 <sup>b</sup>
		<i>Sa</i> ESA54	3.8 ± 0.6 <sup>A</sup>	3.1 ± 0.3 <sup>A</sup>	6.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.8 <sup>b</sup>
		<i>Sa</i> ATCC	3.2 ± 0.6 <sup>A</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>A</sup>	4.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
		<i>Ec</i> ESA72	5.8 ± 0.8 <sup>A</sup>	4.6 ± 0.4 <sup>A</sup>	6.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.7 <sup>a</sup>
		<i>Ec</i> ATCC	4.3 ± 0.5 <sup>A</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>B</sup>	4.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.2 <sup>b</sup>
		<i>K</i> spp	6.2 ± 0.9 <sup>A</sup>	4.5 ± 0.6 <sup>B</sup>	7.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.6 <sup>b</sup>
		<i>K</i> ATCC	5.9 ± 0.8 <sup>A</sup>	3.4 ± 1.0 <sup>B</sup>	6.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.6 <sup>b</sup>
		<i>Ca</i> ESA109	25.3 ± 2.5 <sup>A</sup>	22.1 ± 2.6 <sup>A</sup>	27.2 ± 4.0 <sup>a</sup>	21.9 ± 4.0 <sup>a</sup>
		<i>Ca</i> ATCC	22.6 ± 0.9 <sup>A</sup>	18.8 ± 0.9 <sup>B</sup>	22.8 ± 1.5 <sup>a</sup>	17.9 ± 0.5 <sup>b</sup>

Values correspond to the average ± standard deviation of three replicates.

Capital letters represent the treatments applied on bee-pollen collected in April and small letters on the product collected in September. Averages followed by the same capital letter or the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

<sup>1</sup>*Sp*: Streptococcus pyogenes; *Sa*: Staphylococcus aureus; *Ec*: Escherichia coli; *K*: Klebsiella; *Ca*: Candida albicans.

<sup>2</sup>MIC: minimum inhibitory concentration (the lowest concentration of dehydrated bee-pollen extract that inhibited visible growth of microorganisms).

### Appendix B.1

Table 3

Speaman's correlation coefficients (P-value) between instrumental parameters of colour, total phenolics and pharmacological potential of dehydrated bee-pollen samples.

	Ins. colour L*	Ins. colour a*	Ins. colour b*	Phenolics	DPPH	ORAC	Hyal. Inhibition
Ins. colour L*	1						
Ins. colour a*	-0.958	1					
	P < 0.001						
Ins. colour b*	0.741	-0.629	1				
	P = 0.006	P = 0.028					
Phenolics	0.972	-0.902	0.727	1			
	P < 0.001	P < 0.001	P = 0.007				

(continued on next page)

Table 3 (continued)

	Ins. colour L*	Ins. colour a*	Ins. colour b*	Phenolics	DPPH	ORAC	Hyal. Inhibition
DPPH	0.951 P < 0.001	-0.930 P < 0.001	0.727 P = 0.07	0.958 P < 0.001	1		
ORAC	0.944 P < 0.001	-0.930 P < 0.001	0.755 P = 0.005	0.916 P < 0.001	0.958 P < 0.001	1	
Hyal. inhibition	-0.315 P = 0.319	0.371 P = 0.236	0.259 P = 0.417	-0.371 P = 0.236	-0.308 P = 0.331	-0.301 P = 0.342	1
Sp ESA12	-0.811 P = 0.001	0.727 P = 0.007	-0.734 P = 0.007	-0.818 P = 0.001	-0.783 P = 0.003	-0.762 P = 0.004	0.266 P = 0.404
Sp ATCC	-0.774 P = 0.003	0.690 P = 0.013	-0.823 P = 0.001	-0.767 P = 0.004	-0.697 P = 0.012	-0.774 P = 0.003	-0.032 P = 0.923
Sa ESA54	-0.839 P = 0.001	0.846 P = 0.001	-0.720 P = 0.008	-0.825 P = 0.001	-0.846 P = 0.001	-0.748 P = 0.005	0.049 P = 0.880
Sa ATCC	-0.755 P = 0.005	0.699 P = 0.011	-0.587 P = 0.045	-0.762 P = 0.004	-0.727 P = 0.007	-0.573 P = 0.051	0.049 P = 0.880
Ec ESA72	-0.727 P = 0.007	0.594 P = 0.042	-0.769 P = 0.003	-0.762 P = 0.004	-0.664 P = 0.018	-0.643 P = 0.024	0.070 P = 0.829
Ec ATCC	-0.552 P = 0.063	0.413 P = 0.183	-0.825 P = 0.001	-0.587 P = 0.045	-0.490 P = 0.106	-0.580 P = 0.048	-0.098 P = 0.762
K spp	-0.643 P = 0.024	0.636 P = 0.026	-0.783 P = 0.003	-0.643 P = 0.024	-0.699 P = 0.011	-0.720 P = 0.008	-0.070 P = 0.829
K ATCC	-0.594 P = 0.042	0.441 P = 0.152	-0.916 P < 0.001	-0.636 P = 0.026	-0.587 P = 0.045	-0.643 P = 0.024	-0.196 P = 0.542
Ca ESA109	-0.392 P = 0.208	0.252 P = 0.430	-0.573 P = 0.051	-0.476 P = 0.118	-0.357 P = 0.255	-0.308 P = 0.331	-0.196 P = 0.542
Ca ATCC	-0.287 P = 0.365	0.217 P = 0.498	-0.750 P = 0.005	-0.273 P = 0.390	-0.221 P = 0.491	-0.249 P = 0.436	-0.543 P = 0.068

Sp: *Streptococcus pyogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; K: *Klebsiella*; Ca: *Candida albicans*.  
Significance level ( $\alpha$ ) of 0.05.

## Appendix C.1

Table 4

Most probable number of total coliforms and count of aerobic mesophilic, psychrotrophs, yeasts and molds in bee-pollen samples dehydrated in electric oven and lyophilized

Microorganism	Collection period			
	April 2012		September 2012	
	Electric oven	Lyophilized	Electric oven	Lyophilized
Total coliforms (MPN/g)	47 ± 17 <sup>A</sup>	13 ± 5 <sup>B</sup>	123 ± 25 <sup>b</sup>	285 ± 61 <sup>a</sup>
Aerobic mesophilic (CFU/g)	17 ± 8 <sup>A</sup>	<10 <sup>B</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>
Psychrotrophs (CFU/g)	<10 <sup>A</sup>	<10 <sup>A</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>
Yeasts and molds (CFU/g)	99 ± 31 <sup>A</sup>	16 ± 5 <sup>B</sup>	242 ± 52 <sup>b</sup>	935 ± 233 <sup>a</sup>

Values correspond to the average ± standard deviation of three replicates.

Capital letters represent the treatments applied on bee-pollen collected in April and small letters on the product collected in September. Averages followed by the same capital letter or the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

## Appendix D.1

### References

- A.O.A.C. (2000). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (17th ed.). Gaithersburg.
- Almeida-Muradian, L. B., Arruda, V. A. S., & Barreto, L. M. R. C. (2012). *Manual de Controle de Qualidade do Pólen Apícola*. São Paulo: APACAME.
- Arruda, V. A. S. (2013). *Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica* (Doctor's thesis). Retrieved from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-22062015-172352/es.php> Accessed 30.08.15.
- Arruda, V. A. S., Santos-Pereira, A. A., Freitas, A. S., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2013). Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(2), 100–105.
- Barreto, L. M. R. C., Funari, S. R. C., & Orsi, R. O. (2005). *Pólen apícola: perfil da produção no Brasil*. Congresso de Apicultura do Mercosur. Retrieved from <http://pt.scribd.com/doc/23836092/14-polen-apicola-brasil#scribd> Accessed 24.01.15.
- Barth, O. M., Freitas, A. S., Oliveira, E. S., Silva, R. A., Maester, F. M., Andrella, R. R. S., et al. (2010). Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(4), 893–902.
- Bogdanov, S. (2012). *The bee pollen book: Chapter 1*. Retrieved from [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net) Accessed 22.06.15.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Brasil. (2001). *Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 que aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real hiofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis*. Retrieved from <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarEgislaaoFederal> Accessed 24.01.15.
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., et al. (2008). Pollen composition and standardization of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47, 156–163.
- Carpes, S. T., Mourão, G. B., Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12(3), 220–229.
- Carpes, S. T., Prado, 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(7), 1660–1664.
- Chantaruddee, A., Phuwapraisirisan, P., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., et al. (2012). Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(45), 1–12.
- Domínguez-Vaihondo, D., Gil, D. B., Hernandez, M. T., & Gonzalez-Gomez, D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(10), 2204–2211.
- Franco, B. D. G. M., & Landgraf, M. (2009). *Microbiologia dos Alimentos* (6th ed.). São Paulo: Atheneu.
- Funari, S. R. C., Rocha, H. C., Sforzini, J. M., Filho, H. G., Curi, P. R., Gomes-Dierckx, S. M. A., et al. (2003). Composições bromatológica e mineral do pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, 11, 88–93.
- Graikou, K., Kapeta, S., Aligiannis, N., Sotiropoulos, G., Chondrogianni, N., Gonos, E., et al. (2011). Chemical analysis of Greek pollen – antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chemistry Central Journal*, 5(33), 1–9.
- Horst, M. A., & Lajolo, F. M. (2011). *Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos*. 2011. Retrieved from [www.fcf.usp.br](http://www.fcf.usp.br) Accessed 02.04.11.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- Human, H., & Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greathedii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67(14), 1486–1492.
- IPQ. (1985). *Carnes e produtos cárneos. Contagem de Bactérias e Leveduras: NP 2077. Costa de Caparica*.
- IPQ. (1987). *Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de micro-organismos psicrotópicos: NP 2307. Costa de Caparica*.
- IPQ. (2002). *Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de micro-organismos a 30°C: NP 3788. Costa de Caparica*.
- Kús, P. M., Congiu, F., Teper, D., Srška, Z., Jerkovic, I., & Tuberoso, C. I. G. (2014). Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT – Food Science and Technology*, 55(1), 124–130.
- Lee, Y. P., Kim, S. H., Bang, J. W., Lee, H. S., Kwak, S. S., & Kwon, S. Y. (2007). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 26(5), 591–598.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., & Oliveira, S. A. (1989). *Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato.
- Marghitas, L. A., Stanciu, O. G., Dezmircan, D. S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S., et al. (2009). *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115(3), 878–883.
- Medeiros, K. C. P., Figueiredo, C. A. V., Figueiredo, T. B., Freire, K. R. L., Santos, F. A. R., Alcantara-Neves, N. M., et al. (2008). Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 41–46.
- Melo, I. L. P., & Almeida-Muradian, L. B. (2010). Stability of antioxidant vitamins in bee pollen samples. *Química Nova*, 33(3), 514–518.
- Menezes, J. D. S., Maciel, L. F., Miranda, M. S., & Druzian, J. I. (2010). Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69(2), 233–242.
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. C., Reis, A. S., Santos, T. C., Coube, C. S., et al. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2), 127–130.
- Miquel, E., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., & Clemente, G. (2004). Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *International Dairy Journal*, 14(11), 1003–1011.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Esteveinho, I. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1096–1101.
- Morgano, M. A., Martins, M. C. T., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Yotsuyanagi, K., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2012). A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(4), 727–736.
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Esteveinho, I. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11173–11187.
- Oliveira, K. C. L. S., Moriya, M., Azedo, R. A. B., Almeida-Muradian, L. B., Teixeira, E. W., Alves, M. L. T. M. F., et al. (2009). Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. *Química Nova*, 32(5), 1099–1102.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626.
- Paramás, A. M. G., Báñez, 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(1), 148–156.
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Esteveinho, I. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 233–239.
- Qian, W. L., Khan, Z., Watson, D. G., & Fearnley, J. (2008). Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 78–83.
- Rocha, J. F. M. (2013). *Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola* (Master's thesis). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10198/9289> Accessed 24.01.15 Accessed 26.01.15.
- Sattler, J. A. G. (2013). *Quantificação das vitaminas antioxidantes E (α-, β-, γ-, δ-tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A (α-, β-Caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil* (Master's thesis). Retrieved from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/td-18032014-151137/es.php> Accessed 28.06.15.
- Silva, J. C., Rodrigues, S., Feás, X., & Esteveinho, I. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1790–1795.
- Silva, M. V., Rosa, C. I. L. F., & Vilas-Boas, E. V. B. (2009). Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. *Boletim CEPPA*, 27, 83–96.
- Souza, B. R. (2014). *Quantification of B complex vitamins (B1, B2) and vitamers of vitamins B3 and B6 in dehydrated bee pollen samples from Southern Brazil* (Master's thesis). Retrieved from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/td-27052015-141055/pt-br.php> Accessed 28.08.15.
- Sucupira, N. R., Xerez, A. C. P., & Souza, P. H. M. (2012). Perdas vitamínicas durante o tratamento térmico dos alimentos. *Científica: ciências biológicas e da saúde*, 14(2), 121–128.
- USDA - United States Department of Agriculture. (1998). *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*. Retrieved from [http://www.nal.usda.gov/tnic/DRI//DRI\\_Thiamin/thiamin\\_full\\_report.pdf](http://www.nal.usda.gov/tnic/DRI//DRI_Thiamin/thiamin_full_report.pdf) Accessed 15.05.15.
- Vecchia, P. D., Pegaro, B., Carpes, S. T., & Pegaro, A. (2009). *Determinação de compostos fenólicos e flavonóides em pólen apícola coletado em Mandirituba-PR. Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica*. Retrieved from [www.utpr.edu.br](http://www.utpr.edu.br) Accessed 13.03.13.
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 708–718.

# APÊNDICES

## APÊNDICE I

Parâmetros instrumentais de cor de 56 amostras de pólen apícola desidratado.

Amostra	Parâmetros Instrumentais de Cor <sup>1</sup>			
	L*	a*	b*	Chroma
A1	65,61 ± 0,37	5,02 ± 0,27	37,45 ± 0,44	37,80 ± 0,47
B1	65,57 ± 0,40	3,07 ± 0,13	33,66 ± 0,09	33,80 ± 0,10
C1	60,21 ± 0,59	5,65 ± 0,29	53,00 ± 0,52	53,30 ± 0,44
C2	60,30 ± 0,78	5,82 ± 0,31	55,40 ± 0,35	55,70 ± 0,26
C3	59,93 ± 0,58	7,21 ± 0,38	56,95 ± 0,73	57,40 ± 0,58
D5	50,21 ± 1,04	12,98 ± 0,05	58,56 ± 1,14	59,98 ± 1,13
E1	70,85 ± 0,70	1,67 ± 0,15	35,20 ± 0,14	35,24 ± 0,15
E2	66,05 ± 0,17	3,98 ± 0,14	47,53 ± 0,14	47,70 ± 0,13
E3	67,76 ± 0,41	2,74 ± 0,16	38,92 ± 0,15	39,02 ± 0,16
E4	65,81 ± 0,06	4,23 ± 0,21	40,77 ± 0,09	40,99 ± 0,09
E5	64,86 ± 0,84	4,01 ± 0,37	41,58 ± 0,31	41,77 ± 0,28
E6	64,86 ± 0,86	3,22 ± 0,24	37,64 ± 0,06	37,78 ± 0,06
E7	69,01 ± 0,48	2,98 ± 0,25	38,75 ± 0,27	38,87 ± 0,29
F2	69,86 ± 0,24	1,65 ± 0,10	34,95 ± 0,42	34,99 ± 0,42
G1	70,45 ± 0,57	2,12 ± 0,21	35,33 ± 0,47	35,40 ± 0,48
G2	72,35 ± 0,61	1,03 ± 0,08	34,35 ± 0,24	34,37 ± 0,24
G3	67,06 ± 0,56	3,44 ± 0,26	40,05 ± 0,20	40,20 ± 0,22
G4	65,73 ± 0,95	5,08 ± 0,36	43,13 ± 0,31	43,43 ± 0,30
G5	66,87 ± 0,22	3,19 ± 0,21	40,17 ± 0,18	40,30 ± 0,20
G6	68,63 ± 0,50	4,18 ± 0,27	51,06 ± 0,44	51,23 ± 0,46
G7	71,07 ± 0,44	1,84 ± 0,17	36,52 ± 0,17	36,56 ± 0,18
G8	70,02 ± 0,57	2,52 ± 0,17	37,20 ± 0,12	37,29 ± 0,13
G9	70,65 ± 0,19	1,89 ± 0,06	36,73 ± 0,10	36,78 ± 0,10
G10	69,18 ± 0,49	2,86 ± 0,02	38,10 ± 0,18	38,20 ± 0,18
G11	70,84 ± 0,48	1,65 ± 0,05	35,80 ± 0,17	35,84 ± 0,17
H1	63,73 ± 0,15	4,87 ± 0,08	49,85 ± 0,25	50,09 ± 0,25
I1	68,74 ± 0,50	3,16 ± 0,15	36,71 ± 0,29	36,85 ± 0,31
K1	68,06 ± 0,19	2,45 ± 0,03	43,93 ± 0,15	44,00 ± 0,15
K2	63,81 ± 0,22	4,32 ± 0,05	44,31 ± 0,41	44,52 ± 0,41
K3	63,80 ± 0,36	5,58 ± 0,32	45,05 ± 0,67	45,39 ± 0,70
K4	68,48 ± 0,67	3,24 ± 0,29	48,16 ± 0,34	48,27 ± 0,35
L1	51,82 ± 0,12	16,90 ± 0,14	60,19 ± 0,63	62,52 ± 0,64
L3	60,85 ± 0,48	5,01 ± 0,21	42,04 ± 0,08	42,34 ± 0,08
M1	68,62 ± 0,63	2,16 ± 0,20	38,65 ± 0,18	38,72 ± 0,19
M2	68,90 ± 0,55	1,28 ± 0,10	39,63 ± 0,25	39,65 ± 0,26
N1	62,56 ± 0,22	8,72 ± 0,07	56,53 ± 0,09	57,20 ± 0,10
O1	64,57 ± 0,24	5,55 ± 0,03	42,23 ± 0,18	42,60 ± 0,18
Q1	71,82 ± 0,28	1,48 ± 0,07	34,85 ± 0,14	34,89 ± 0,14
R1	70,33 ± 0,27	1,23 ± 0,07	31,72 ± 0,23	31,74 ± 0,24
S1	63,60 ± 0,48	5,44 ± 0,21	40,16 ± 0,75	40,53 ± 0,77
S2	57,76 ± 0,02	6,65 ± 0,14	44,09 ± 0,50	44,59 ± 0,52
S3	48,97 ± 0,02	10,65 ± 0,15	44,77 ± 0,14	46,02 ± 0,14
S6	49,84 ± 0,20	10,60 ± 0,04	48,24 ± 0,12	49,39 ± 0,12
U1	70,40 ± 0,54	1,37 ± 0,13	36,78 ± 0,06	36,81 ± 0,06
V1	71,67 ± 0,18	1,29 ± 0,05	33,94 ± 0,10	33,96 ± 0,10
X1	72,16 ± 0,06	1,07 ± 0,15	34,98 ± 0,40	34,99 ± 0,40

(Continua)

Continuação...

Amostra	Parâmetros Instrumentais de Cor <sup>1</sup>			
	L*	a*	b*	Chroma
Z1	65,60 ± 0,40	5,54 ± 0,25	48,52 ± 1,40	48,84 ± 1,42
AA1	61,60 ± 0,29	11,75 ± 0,21	63,18 ± 0,74	64,26 ± 0,73
AA2	60,88 ± 0,31	7,75 ± 0,18	54,39 ± 0,61	54,94 ± 0,62
AB1	58,33 ± 0,53	9,11 ± 0,28	56,02 ± 0,98	56,76 ± 1,01
AC1	54,39 ± 0,42	10,57 ± 0,18	48,16 ± 0,53	49,31 ± 0,53
AC2	57,09 ± 0,30	9,07 ± 0,07	51,54 ± 0,55	52,33 ± 0,55
AC3	57,34 ± 1,02	8,76 ± 0,22	51,51 ± 0,65	52,25 ± 0,60
AD1	55,77 ± 0,54	10,53 ± 0,46	47,09 ± 0,74	48,26 ± 0,81
AD2	57,89 ± 0,44	9,58 ± 0,21	48,87 ± 0,15	49,80 ± 0,18

<sup>1</sup>L\*: 0 (preto) a 100 (branco), a\*: - (verde) a + (vermelho); b\*: - (azul) a + (amarelo); C: Chroma (intensidade da cor).

## APÊNDICE II

Comparação entre diferentes Regiões de origem do pólen apícola desidratado.

Parâmetro	Região		
	Nordeste (n=18)	Sul (n=14)	Sudeste (n=22)
Proteínas	14,54 <sup>b</sup>	19,22 <sup>a</sup>	13,30 <sup>b</sup>
Lipídeos	5,89 <sup>c</sup>	8,48 <sup>a</sup>	6,98 <sup>b</sup>
Cinzas	3,09 <sup>a</sup>	2,84 <sup>ab</sup>	2,82 <sup>b</sup>
Carboidratos	76,49 <sup>a</sup>	69,46 <sup>b</sup>	76,90 <sup>a</sup>
Cálcio	2,68 <sup>a</sup>	1,74 <sup>b</sup>	2,12 <sup>b</sup>
Potássio	7,32 <sup>a</sup>	6,30 <sup>b</sup>	6,24 <sup>b</sup>
Magnésio	1,71	1,50	1,43
Sódio	118,02 <sup>a</sup>	52,62 <sup>b</sup>	55,41 <sup>b</sup>
Zinco	76,90 <sup>a</sup>	69,74 <sup>ab</sup>	63,80 <sup>b</sup>
Ferro	85,22 <sup>b</sup>	154,79 <sup>ab</sup>	263,08 <sup>a</sup>
Manganês	75,26 <sup>b</sup>	79,81 <sup>b</sup>	120,97 <sup>a</sup>
Cobre	13,45	14,23	13,60
L*	68,49 <sup>a</sup>	61,74 <sup>b</sup>	61,99 <sup>b</sup>
a*	2,54 <sup>b</sup>	7,03 <sup>a</sup>	6,08 <sup>a</sup>
b*	37,43 <sup>c</sup>	52,07 <sup>a</sup>	43,48 <sup>b</sup>
C	37,53 <sup>c</sup>	52,62 <sup>a</sup>	44,00 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus pyogenes</i> ESA12	3,41 <sup>b</sup>	3,34 <sup>b</sup>	4,20 <sup>a</sup>
<i>S. pyogenes</i> 12344	2,28	2,39	2,84
<i>Staphylococcus aureus</i> ESA54	4,39 <sup>b</sup>	4,42 <sup>b</sup>	5,24 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> 25923	3,52 <sup>ab</sup>	3,24 <sup>b</sup>	3,98 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> ESA72	5,42	5,10	5,70
<i>E. coli</i> 25922	4,16	3,70	4,33
<i>Klebsiella</i> spp	6,09	5,99	6,49
<i>Klebsiella</i> BAA1705	4,62	4,35	4,88
<i>Candida albicans</i> ESA109	15,44	15,72	14,50
<i>C. albicans</i> 60193	12,60	12,52	11,21
DPPH	45,04 <sup>b</sup>	73,33 <sup>a</sup>	27,47 <sup>b</sup>
ORAC	260,44 <sup>b</sup>	327,29 <sup>a</sup>	246,86 <sup>b</sup>
Fenólicos totais	12,63 <sup>b</sup>	16,25 <sup>a</sup>	12,23 <sup>b</sup>
Flavonóides totais	4,04 <sup>ab</sup>	4,89 <sup>a</sup>	2,62 <sup>b</sup>
Ácido gálico	0,00	0,15	0,07
Ácido protocatéquico	0,07 <sup>b</sup>	0,15 <sup>ab</sup>	0,60 <sup>a</sup>
Catequina	1,31	1,80	0,68
Ácido clorogênico	1,90 <sup>a</sup>	0,00	1,35 <sup>b</sup>
Ácido vanílico	0,95	0,78	1,95
Ácido caféico	0,00	0,37	0,09
Epicatequina	0,16	0,30	0,25
Ácido β-resorcílico	5,75	42,86	11,88
Ácido siríngico	1,29	0,71	0,23
Ácido p-cumárico	0,04 <sup>b</sup>	2,50 <sup>a</sup>	3,04 <sup>a</sup>
Ácido ferúlico	0,21	1,56	0,24
Ácido sinápico	0,01	0,00	0,01
Naringina	0,46	1,53	0,49
Rutina	6,23	8,79	26,40
Ácido cinâmico	0,65 <sup>b</sup>	4,44 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>
Naringenina	2,84 <sup>b</sup>	8,69 <sup>ab</sup>	24,86 <sup>a</sup>
Quercetina	12,64 <sup>a</sup>	7,85 <sup>ab</sup>	3,55 <sup>b</sup>
Kaempferol	4,39	8,21	1,11

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *LSD Fisher*.

## APÊNDICE III

Comparação entre pólen apícola desidratado monofloral e heterofloral.

Parâmetro	Classificação		Diferença Relativa (%)
	Monofloral* (n=19)	Heterofloral* (n=37)	
Proteínas	16,29	14,92	8,42
Lipídeos	7,55	6,66	11,77
Cinzas	2,96	2,90	1,72
Carboidratos	73,20	75,52	3,16
Cálcio	2,15	2,22	3,44
Potássio	6,71	6,60	1,66
Magnésio	1,55	1,55	0,44
Sódio	70,30	75,84	7,89
Zinco	70,59	69,81	1,10
Ferro	226,87	150,50	33,66
Manganês	79,12	100,99	27,64
Cobre	13,34	13,82	3,55
L*	63,85	64,27	0,65
a*	4,84	5,32	10,03
b*	42,84	44,22	3,23
C	43,19	44,63	3,33
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3,61	3,78	4,80
<i>S. pyogenes</i> 12344	2,47	2,61	5,44
<i>Staphylococcus aureus</i> ESA54	4,66	4,78	2,47
<i>S. aureus</i> 25923	3,45	3,72	7,87
<i>Escherichia coli</i> ESA72	5,20	5,54	6,46
<i>E. coli</i> 25922	3,91	4,20	7,65
<i>Klebsiella</i> spp	6,04	6,29	4,13
<i>Klebsiella</i> BAA1705	4,42	4,76	7,65
<i>Candida albicans</i> ESA109	15,11	15,12	0,06
<i>C. albicans</i> 60193	11,81	12,09	2,42
DPPH	52,45	41,59	20,71
ORAC	279,88	269,46	3,72
Fenólicos totais	14,74	12,79	13,21
Flavonóides totais	4,03	3,45	14,28
Ácido gálico	0,00	0,10	NA
Ácido protocatéquico	0,23	0,32	41,51
Catequina	1,15	1,20	3,69
Ácido clorogênico	0,74	1,44	94,46
Ácido vanílico	1,42	1,23	13,45
Ácido caféico	0,00	0,19	NA
Epicatequina	0,24	0,22	9,95
Ácido $\beta$ -resorcílico	33,21	9,03	72,81
Ácido siríngico	1,07	0,49	54,14
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,85	1,87	1,45
Ácido ferúlico	1,14	0,25	78,13
Ácido sinápico	0,01	0,01	39,51
Naringina	0,64	0,77	20,38
Rutina	8,95	19,40	116,77
Ácido cinâmico	1,92	1,81	5,46
Naringenina	17,65	10,44	0,22
Quercetina	9,20	6,58	28,44
Kaempferol	6,80	2,41	64,51

\*Não há diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as médias pelo teste de *LSD Fisher*.

## APÊNDICE IV

Código, data de coleta, origem e apiário de 45 amostras de pólen apícola desidratado.

<b>Código</b>	<b>Data de Coleta</b>	<b>Origem/ Estado brasileiro</b>	<b>Apiário**</b>
1	nov/11 - dec/11	Rio Grande do Norte	A
2	dec/11	Santa Catarina	B
3	12 - 20/apr/12	Sergipe	C
4	21/apr - 11/may/12	Sergipe	C
5	19/jun/12	Bahia	D
6	21/jun/12	Bahia	E
7	23/jul/12	Bahia	D
8	01/aug/12	Bahia	D
9	12/aug/12	Bahia	D
10	sep/12	Santa Catarina	F
11	03/sep/12	São Paulo	G
12	14/sep/12	Paraná	H
13	18/sep/12	Bahia	E
14	23/sep/12	Bahia	D
15	25/sep/12	Rio Grande do Norte	A
16	01/oct/12	Rio Grande do Norte	I
17	03/oct/12	São Paulo	G
18	05/oct/12	Rio Grande do Norte	J
19	06/oct/12	Bahia	D
20	15 - 30/oct/12	Rio Grande do Sul	K
21	16/oct/12	São Paulo	G
22	25/oct - 08/nov/12	São Paulo	G
23	01 - 20/nov/12	Rio Grande do Sul	K
24	20/nov - 04/dec/12	São Paulo	G
25	25/nov - 10/dec/12	Rio Grande do Sul	K
26	28/nov/12	Bahia	L
27*	dec/12	São Paulo	M
28	dec/12	Mato Grosso	N
29	06 - 13/dec/12	São Paulo	G
30	08 - 15/jan/13	São Paulo	G
31	18 - 25/jan/13	São Paulo	G
32	11/feb/2013	Bahia	L
33	26/apr - 04/may/13	Bahia	O
34	25/apr - 01/may/13	Bahia	P
35*	may/13	Paraná	Q
36	jun/13	Mato Grosso	R
37	jun/13	Bahia	S
38*	jun/13	São Paulo	M
39	jun/13	Bahia	T
40*	sep/13	São Paulo	U
41	05/sep/13	Mato Grosso do Sul	V
42*	nov/13	Paraná	X
43*	nov/13	São Paulo	U
44*	dec/13	São Paulo	U
45*	dec/13	Paraná	Q

\*Amostras adquiridas no comércio.

\*\*Letras iguais nesta coluna indicam amostras coletadas no mesmo apiário.