UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica.

Vanilda Aparecida Soares de Arruda

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica.

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Vanilda Aparecida Soares de Arruda

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

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

Arruda, Vanilda Aparecida Soares de
A779p Pólen apícola desidratado : composição físico-química, qualidade
microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante
e origem botânica / Vanilda Aparecida Soares de Arruda. -- São
Paulo, 2013.
202p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Almeida-Muradian, Ligia Bicudo de

1. Polén apícola : Ciência dos alimentos 2. Antioxidante :
Ciência dos alimentos 3. Microbiologia de alimentos I. T. II.
Almeida Muradian, Ligia Bicudo, orientador.

641.38 CDD

Vanilda Aparecida Soares de Arruda

Pólen apícola desidratado: composição físico-química,
qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides,
atividade antioxidante e origem botânica.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

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

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de ____.

“Os progressos da ciência
obedecem à lei da repulsão: para
dar um passo em frente, é preciso
começar por derrubar o domínio do
erro e das falsas teorias.”

Boris Pasternak

Aos meus pais José Fernandes e Maria de Fátima, pelo amor; pela confiança, compreensão e por acreditar em meus sonhos.

Aos meus queridos irmãos Vanderson e Vanderci pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos difíceis e por me motivarem durante a caminhada.

A André Luis, companheiro querido e principal incentivador, pelo apoio constante ao longo da elaboração deste trabalho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte de toda sabedoria e esperança, pela oportunidade que me julgou digna de receber.

À Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian, por sua confiança, pela orientação, pelo exemplo de pesquisadora, pelo carinho e pelo aprendizado e conselhos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

À CAPES e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas de mestrado concedidas.

À todos os apicultores e colaboradores que gentilmente forneceram as amostras tornando possível o desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Ortrud Monika Barth e Alex da Silva Freitas, do Instituto Oswaldo Cruz, por colaborarem na análise polínica, pela atenção e valiosas contribuições.

À Dra. Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho do Instituto Politécnico de Bragança (Portugal) por tornar possível parte desse projeto colaborando com as análises microbiológicas e de atividade antimicrobiana, também pela disponibilidade e preciosas contribuições.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP por contribuírem com a minha formação.

À minha banca de qualificação: Dra. Suzana Lannes, Dr. Alexandre Bera e Dr. Severino Matias Alencar, pela atenciosa correção deste trabalho e sugestões.

Aos funcionários Elias e Rosa, pela constante disponibilidade, paciência e empenho em ajudar no projeto.

Aos demais funcionários: Elaine, Jorge, Edílson, Mônica, Cléo e Isabel pela atenção e, eficiência no desempenho dos seus trabalhos tão importantes para a Pós-Graduação.

À Leila Bonadio, Bibliotecária de Referência, pelos serviços de correções.

A todos os colegas do Laboratório de Análise de Alimentos pela amizade, convívio, carinho, conversas, risadas e momentos de descontração. E, principalmente, pelas pequenas e grandes ajudas no dia-a-dia que de uma forma ou de outra contribuíram para continuidade deste trabalho. Em especial, agradeço:

- Ao Alexandre Vieira e ao Davi Figueiredo, dedicados alunos de iniciação científica, pela ajuda preciosa nos experimentos, pela companhia nos momentos trabalhosos e pesados do dia-a-dia e, principalmente, pelas conversas, risadas e amizade.
- Às amigas Simone e Lenny, pelas conversas, desabafos, risadas, pelo exemplo de responsabilidade, dedicação e praticidade. Obrigada pela ajuda, sugestões, ensinamentos, palavras de apoio e incentivo que foram indispensáveis. Vocês são especiais.
- À Diana, Fabiana, Isabel Massaretto, Natália pela amizade, momentos de descontração.
- As minhas estimadas amigas Tatiana Santos, Kelly e Priscila Dantas pelo carinho.
- Aos que participam ou participaram do grupo de pesquisa em produtos apícolas pelo companheirismo na jornada de trabalho.
- Finalmente, agradeço a todos os amigos e familiares que estando próximos ou distantes, contribuíram carinhosamente torcendo pela realização deste trabalho.

Resumo

ARRUDA, V.A.S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica.** São Paulo, 2013. 202p. [Tese de Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

O pólen apícola, produto da aglutinação do pólen das flores com néctar e substâncias salivares das abelhas, tem sido promovido como suplemento da dieta humana por apresentar propriedades nutricionais e bioativas. Sessenta e duas amostras de pólen apícola desidratado foram avaliadas para as análises de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante por três métodos (DPPH, sistema β -caroteno e ORAC), origem botânica, qualidade comercial (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos) e sanitária (bolores e leveduras, aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E.coli*, clostrídios sulfito redutores e *S.aureus*), além da atividade antimicrobiana (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). Os valores obtidos para compostos fenólicos e flavonoides totais variaram de 12,60 a 84,22 mg GAE/g de pólen apícola (GAE: equivalentes em ácido gálico) e 1,90 a 36,85 mg de quercetina/g de pólen apícola respectivamente. O EC₅₀ variou de 0,35 a 13,42 mg pólen apícola /mL de extrato. Os extratos de pólen apícola apresentaram valores entre 52,58 e 98,37 % utilizando-se o método do β -caroteno. Quando quantificada por ORAC, a atividade antioxidante medida ficou entre 132,98 e 575,85 μ mol eq. trolox/g pólen apícola. Na avaliação da qualidade comercial foram obtidos os valores de 3,06% a 8,12% para umidade, de 1,94 a 4,61%, para cinzas, de 3,35 a 10,96% para lipídeos; de 17,73 a 34,73% para as proteínas, de 11,86 a 25,71% e de 2,77 a 15,87% para os açúcares frutose e glicose respectivamente. Verificou-se que a presença do pólen apícola inibiu o crescimento de todos os microrganismos estudados. *Candida albicans* foi a mais resistente e o *Staphylococcus epidermidis* foi o mais sensível. Observou-se 36 tipos polínicos diferentes, destacando-se: *Cocos nucifera*, *Mimosa scabrella* (Benth.), *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Asteraceae*, *Poaceae*, *Euphorbiaceae* e *Brassica sp.* que ocorreram com maior frequência entre as amostras estudadas. Foram observadas somente correlações moderadas e fracas entre os tipos polínicos presentes e os parâmetros avaliados para as amostras desidratadas de pólen apícola.

Palavras-chave: Pólen apícola. Propriedades biológicas. Compostos fenólicos. Composição físico-química. Análise microbiológica.

Abstract

ARRUDA, V.A.S. **Dried bee pollen: physicochemical, microbiological quality, phenolic and flavonoid compounds, antioxidant activity and botanical origin.** São Paulo, 2013. 202p. [PhD thesis] – Pharmaceutical Science School –University of São Paulo.

Bee pollen, a product of agglutination of flower pollen with nectar and bee salivary substances, has been promoted as a dietary supplement for human because of its nutritional and bioactive properties. Sixty-two samples of dehydrated bee pollen were analyzed for phenolics, flavonoids, antioxidant activity using three methods (DPPH, β -carotene and ORAC), botanical composition, commercial quality (moisture, ashes, lipids, proteins, carbohydrates), hygiene (aerobic mesophiles, yeasts and moulds, coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and sulfite-reducing *Clostridium*), and antimicrobial activity (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). The obtained values for total phenolics ranged from 12.60 to 84.22 mg GAE/g bee pollen (GAE: gallic acid equivalents) while for total flavonoids ranged from 1.90 and 36.85 mg quercetin/g bee pollen. The EC₅₀ ranged from 0.35 to 13.42 mg bee pollen/ml of extract. The bee pollen extracts showed values between 52.58 and 98.37% by β -carotene method. When measured by ORAC, antioxidant activity was between 132.98 and 575.85 μ mol eq. trolox/g bee pollen. In the evaluation of commercial quality, the following results were achieved: 3.06% to 8.12% for moisture, 1.94 to 4.61% for ashes, 3.35 to 10.96% for lipids, 17.73 to 34.73% for proteins, from 11.86 to 25.71% and 2.77 to 15.87% for the carbohydrates glucose and fructose respectively. It was verified that the presence of the bee pollen inhibited the growth of all microorganisms studied. *Candida albicans* was the more resistant and *Staphylococcus epidermidis* the more sensitive. Thirty-three pollen-types were identified mainly *Cocos nucifera*, *Mimosa scabrella* (Benth.), *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Eucalyptus*, *Myrcia*, Asteraceae, Poaceae, Euphorbiaceae and *Brassica* sp. It was observed only moderate and weak correlations between the pollen types present and the evaluated parameters for dehydrated samples of bee pollen.

Keywords: Bee pollen. Biological properties. Phenolic compounds. Physicochemical composition. Microbiological analysis.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Aparelho reprodutor da flor	37
Figura 2 - Grão de pólen	38
Figura 3 - Abelha com carga de pólen na corbícula	39
Figura 4 - Grãos de pólen apícola desidratado	42
Figura 5 - Coletor de pólen (Apiário Rainha do Céu)	44
Figura 6 - Coleta de pólen apícola	50
Figura 7 - Pacotes de pólen armazenados em freezer	50
Figura 8 - Estufa (Ballardin®) utilizada para a secagem do pólen apícola	51
Figura 9 - Limpeza do pólen apícola	51
Figura 10 - Embalagens para pólen apícola	51
Figura 11 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários	58
Figura 12 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	61
Figura 13 - Estrutura química dos ácidos benzoicos	64
Figura 14 - Estrutura química dos ácidos cinâmicos	65
Figura 15 - Estrutura química da cumarina (1,2-benzopirona)	66
Figura 16 - Estruturas químicas dos principais flavonoides	69
Figura 17 - Amostras de pólen apícola desidratadas	79
Figura 18 - Amostras de pólen apícola desidratadas	80
Figura 19 - Equações para cálculo dos Limites de Quantificação e Detecção dos métodos baseado no coeficiente linear (s) da equação de regressão linear e coeficiente angular (S) da curva analítica para determinação dos açúcares glicose e frutose	94
Figura 20 - Tipos polínicos encontrados nas amostras desidratadas de pólen apícola	104
Figura 21 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a umidade das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta	115
Figura 22 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para cinzas das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta	115

Figura 23 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para lipídeos das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta	116
Figura 24 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para proteínas das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta	116
Figura 25 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para frutose das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta	117
Figura 26 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para glicose das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta	117
Figura 27 - Gráfico de Linearidade para Glicose	126
Figura 28 - Gráfico de Linearidade para Frutose	126
Figura 29 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para fenólicos totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta	145
Figura 30 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para flavonoides totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta	145
Figura 31 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a atividade antioxidante (DPPH) das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta	146
Figura 32 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a atividade antioxidante (ORAC) totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta	146
Figura 33 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a atividade antioxidante (sistema β -caroteno/ácido linoleico) totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta	147

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Classificação zoológica da abelha	32
Tabela 2 - Divisão de trabalho das abelhas operárias <i>Apis mellifera</i> L	35
Tabela 3 - Composição química apresentada por alguns autores em diferentes amostras de pólen apícola desidratado brasileiro	46
Tabela 4 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico	62
Tabela 5 - Classes de flavonoides e propriedades biológicas conhecidas	70
Tabela 6 - Características químicas dos flavonoides	71
Tabela 7 - Localidades de origem do pólen apícola	78
Tabela 8 - Frequência dos tipos de pólen nas amostras de pólen apícola desidratado	99
Tabela 9 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Nordeste do Brasil	100
Tabela 10 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Sudeste do Brasil	101
Tabela 11 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Sul do Brasil	102
Tabela 12 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Centro-Oeste do Brasil	103
Tabela 13 - Resultados da análise físico-química das amostras de pólen apícola desidratado e as especificações da regulamentação Brasileira (BRASIL, 2001), Argentina (KRELL, 1996; ARGENTINA, 1990) e Francesa (BOGDANOV, 2004)	112
Tabela 14 - Resultados da variação para os parâmetros físicoquímicos obtidos para as amostras de pólen apícola e comparação entre as amostras pelo teste de ANOVA	118
Tabela 15 - Resultados das comparações para os parâmetros físicoquímicos obtidos para as amostras de pólen apícola e comparação entre as amostras (região de coleta) pelo teste de Tukey	119
Tabela 16 - Dados obtidos no estudo de linearidade dos açúcares Glicose e Frutose	125
Tabela 17 - Limites de detecção e quantificação dos métodos para determinação de Glicose e Frutose	127
Tabela 18 - Dados da recuperação de padrão em amostra de pólen apícola para Glicose e Frutose	127

Tabela 19 - Resultados das análises microbiológicas das amostras de pólen apícola desidratado	128
Tabela 20 - Resultados da variação das análises microbiológicas efetuadas para as amostras de pólen apícola desidratado, agrupadas segundo região de coleta pelo teste de Kruskal-Wallis	134
Tabela 21 - Resultados das comparações múltiplas não paramétricas para <i>S. aureus</i> entre as regiões de coleta	134
Tabela 22 - Concentrações de Fenólicos totais e Flavonoides totais em extratos etanólicos de amostras de pólen apícola desidratado (base seca)	135
Tabela 23 - Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β -caroteno (%), ORAC (Conc. μ mols eq.trolox /g pólen)	139
Tabela 24 - Resultados da variação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β -caroteno (%), ORAC (Conc. μ mols eq.trolox /g pólen), agrupadas segundo região de coleta pelo teste de ANOVA	148
Tabela 25 - Resultados das comparações para atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β -caroteno (%), ORAC (Conc. μ mols eq. trolox /g pólen), entre as regiões de coleta pelo teste de Tukey	149
Tabela 26 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado	151
Tabela 27 - Resultados da variação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado e comparação entre as regiões de coleta pelo teste de ANOVA	157
Tabela 28 - Correlação de Spearman entre a composição físico-química e os tipos de pólen presentes nas amostras de pólen apícola desidratado	158
Tabela 29 - Correlação de Spearman entre os parâmetros microbiológicos e os tipos de pólen presentes nas amostras de pólen apícola desidratado	161
Tabela 30 - Correlação de Spearman entre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β -caroteno (%), ORAC (Conc. μ mols eq.trolox /g pólen), e os tipos de pólen presentes nas amostras de pólen apícola desidratado	163
Tabela 31 - Correlação de Spearman entre a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola e os tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado	166

Tabela 32 - Correlação de Pearson entre os parâmetros da composição físico-química, avaliados nas amostras de pólen apícola desidratado	168
Tabela 33 - Correlação de Pearson entre os parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de pólen apícola desidratado	169
Tabela 34 - Correlação de Pearson entre os parâmetros da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β-caroteno (%), ORAC (Conc. μmols eq.trolox /g pólen)	170
Tabela 35 - Correlação de Pearson entre os parâmetros da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado	172

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
2.1	Abelha <i>Apis mellifera</i>
2.2	O pólen
2.2.1	Definição e funções
2.2.2	Importância do pólen para as abelhas
2.2.3	Palinologia
2.3	O pólen apícola
2.3.1	Definição e funções
2.3.2	Composição físico-química e valor nutricional do pólen apícola
2.3.3	Fabricação do pólen apícola
2.3.4	Produção do pólen apícola
2.3.5	Padrão de qualidade do pólen apícola
2.3.6	Estabilidade do pólen apícola
2.3.7	Efeitos atribuídos ao consumo de pólen apícola
2.4	Antioxidantes
2.4.1	Compostos fenólicos
2.4.1.1	Ácidos fenólicos
2.4.1.2	Flavonoides
3	OBJETIVOS
3.1	Objetivo geral
3.2	Objetivos específicos
4.	MATERIAL E MÉTODOS
4.1	Material

4.1.1	Amostragem	78
4.1.2	Padrões e reagentes	81
4.1.3.	Equipamentos	82
4.2.	Métodos	83
4.2.1	Preparo das amostras	83
4.2.2	Determinação da umidade	83
4.2.3	Preparo dos extratos etanólicos de pólen (EEP)	83
4.2.4	Determinação dos compostos fenólicos totais	84
4.2.5	Determinação dos flavonoides totais	84
4.2.6	Determinação da capacidade de seqüestrar o radical livre estável DPPH	85
4.2.7	Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico	86
4.2.8	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC _{FL}	87
4.2.9	Análise polínica (microscópica)	89
4.2.10	Determinação do nitrogênio total – proteínas	90
4.2.11	Determinação do extrato etéreo – lipídeos	90
4.2.12	Determinação do resíduo mineral fixo – cinzas	91
4.2.13	Determinação de glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (CLAE)	91
4.2.14	Validação do método cromatográfico para determinação de Glicose e Frutose	92
4.2.15	Atividade antimicrobiana	94
4.2.16	Análise microbiológica	96
4.2.17	Tratamento Estatístico dos Dados	96
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
5.1	Análise polínica	98
5.2	Composição físico-química das amostras de pólen apícola desidratado	112
5.3	Validação do método de análise para determinação de Glicose e Frutose	125

5.4	Análises microbiológicas	128
5.5	Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides Totais	135
5.6	Atividade Antioxidante	139
5.7	Atividade antimicrobiana	151
5.8	Correlações	158
6	CONCLUSÕES	173
	REFERÊNCIAS	177

1 INTRODUÇÃO

A apicultura está se desenvolvendo de forma crescente, especialmente na região Nordeste do Brasil, onde as condições climáticas e a flora possibilitam uma alta produção durante todo o ano (FREITAS, 1991). O mel é ainda o produto mais explorado, mas a produção de pólen apícola tem despertado o interesse dos apicultores, que veem neste produto uma oportunidade de diversificar a produção, alcançando novos nichos de mercado e lucros satisfatórios (MILFONT, FREITAS e ALVES, 2011).

Desde os primórdios da humanidade, o pólen apícola é reconhecido mundialmente por suas propriedades nutricionais, medicinais e efeitos benéficos à saúde. Recentemente tem sido efetuados estudos sobre a composição físico-química, qualidade microbiológica e identificação de compostos presentes no pólen apícola e muita atenção têm sido voltada para um grupo especial, os compostos fenólicos (MARKHAM e CAMPOS, 1996; TOMAS-LORENTE *et al.*, 1992, CAMPOS *et al.*, 1997, 2002, 2003; MORAIS *et al.*, 2011, LOPES *et al.*, 2011).

O pólen apícola, a própolis e o mel têm recebido especial atenção por parte dos pesquisadores em todo o mundo, devido principalmente as suas propriedades biológicas, como atividade antibacteriana (GARCIA *et al.*, 2001; BASIM e BASIM, 2006; ÖZKALP e ÖZCAN, 2010), antifúngica (ÖZCAN *et al.* 2004), antiinflamatória (BORELLI *et al.*, 2002; BOGDANOVI, 2004; DI PAOLA-NARANJO, 2004), anticarcinogênica (ALMAS, MAHMOUD e DAHLAN, 2001; GEBARA, LIMA e MAYER 2002) e imunomodulatória (ORSOLIC e BASIC 2003; ORSOLIC *et al.*, 2004).

A ação antioxidante dos compostos presentes no pólen apícola tais como a vitamina E, beta-caroteno (provitamina A), vitamina C, e compostos fenólicos, pode estar associada à proteção contra doenças do envelhecimento. A formação de radicais livres pelo oxigênio é supostamente a chave para o desenvolvimento de câncer e doenças coronarianas, aliado à função protetora da membrana celular. Radicais

livres podem atacar biomoléculas, dentre as quais se destacam os lipídios, as proteínas e o DNA propriamente dito, os quais podem ser preservados pela ação dos antioxidantes (BIRCH *et al.*, 2001; BRENNA e PAGLIARINI, 2001; KOO e SUHAILA, 2001; SELLAPAN, AKOH e KREWER, 2002; SLUIS *et al.*, 2001; VINSON *et al.*, 2001; YILDRIM, MAVI e KARA, 2001; ZHENG e WANG, 2001; WANG e ZHENG, 2001).

O consumo diário de substâncias antioxidantes pode ter uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Verificou-se que uma série de doenças dentre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS e doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas, denominadas de “substâncias reativas oxigenadas” ou simplesmente ROS. Estas substâncias estão também ligadas aos processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (BRENNA e PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI e KARA, 2001).

O pólen recolhido pelas abelhas é reconhecido como um alimento balanceado (GONZÁLEZ-GÜERCA *et al.*, 2001). A atividade antioxidante do pólen apícola tem sido associada ao seu teor em compostos fenólicos (CAMPOS, 1997). Normalmente, o pólen coletado é uma mistura de polens de diferentes origens botânicas, cada uma sendo uma importante fonte de flavonoides na forma de glicosídeos (WIERMANN e VIETH, 1983) e, em algumas espécies, de ácidos hidroxicinâmicos (CAMPOS, 1997). Estes compostos apresentam perfil espécie-específicos (CAMPOS, 1997), o que sugere que, polens coletados pelas abelhas a partir de diferentes áreas ou estações distintas poderiam ter diferentes propriedades bioativas.

A importância do pólen para a colônia é inquestionável, pois dele dependem as abelhas para o seu suprimento de proteínas, sais minerais e produtos biológicos especiais utilizados na sua alimentação. Por essa razão, a produção de mel, cera e geleia real de um apiário, está diretamente relacionada com a quantidade de pólen necessária para a alimentação das colmeias (MARCHINI, REIS e MORETI, 2006).

As abelhas, na ausência de pólen, recorrem à sua própria fonte de reserva, metabolizando tecidos de seus corpos para prolongar a sua existência. Ao receberem material nutritivo, pólen, rapidamente assimilam os principais nutrientes que haviam perdido, voltando ao seu estado normal (HAYDAK, 1934).

Além da importância do pólen para a cadeia produtiva, tal produto é considerado uma fonte importante de compostos fenólicos, sobretudo flavonoides na forma de glicosídeos (WIERMANN e VIETH, 1983) e em algumas espécies, também é fonte importante de ácidos fenólicos (CAMPOS, 1997).

O pólen apícola é amplamente comercializado na Europa e Ásia como um tônico consumido principalmente por idosos como recurso para atenuar os efeitos do envelhecimento. A procura deste produto é crescente, de fato, as indústrias farmacêutica e de alimentos saudáveis estão aumentando a gama de produtos que contem o pólen apícola. O que enfatiza a necessidade de novas pesquisas quer para a padronização dos métodos para avaliação de sua qualidade quer para investigar as suas propriedades biológicas, agregando deste modo valor ao produto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Abelha *Apis mellifera*

As abelhas são insetos originários de um grupo de vespas predadoras relacionadas à superfamília Sphecoidea, que alteraram sua dieta alimentar deixando de utilizar insetos e ácaros para fazer uso do néctar e do pólen como fonte de nutrientes. O que provocou modificações em sua anatomia e fisiologia ao longo de vários anos para se adaptarem ao novo habito alimentar. Durante o processo evolutivo surgiram várias espécies de abelhas. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam umas 40 mil espécies ainda não-descobertas. Somente 2% das espécies de abelhas são sociais e produzem mel. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas (SOUSA, 2007).

Tabela 1 - Classificação zoológica da abelha.

Reino	Animal
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Hymenoptera
Subordem	Aprocrita
Superfamília	Apoidea
Família	Apidae
Gênero	<i>Apis</i>
Espécie	<i>Mellifera</i>
Sub-espécie	<i>scutellata</i>

Fonte: SOUSA, 2007.

As abelhas da família Apidae se caracterizam pela presença da corbícula ou cesta polínica localizada na face externa de cada tíbia das pernas posteriores (traseiras) pelo menos nas operárias, que é utilizada para carregar o pólen (alimento) e materiais para a construção do ninho. As abelhas apresentam uma estreita relação com plantas que produzem flores e frutos, as quais fornecem alimentos (néctar e pólen) e outros materiais. Como recompensa as plantas recebem os serviços de polinização tão importantes para a subsistência de mais de 225.000 espécies vegetais, das quais, dois terços dependem dos insetos para sua polinização (WIESE, 1995, 2000; SOUSA, 2007).

As raças de *Apis mellifera* introduzidas no Brasil são (SOUSA, 2007):

- ***Apis mellifera mellifera*** (abelha preta ou alemã) têm como origem o Norte e o Oeste europeu foram introduzidas no Brasil em 1839, no Rio de Janeiro, pelo Padre Antônio Carneiro. Possuem pelos escuros, são muito mansas e menos produtivas que as italianas.
- ***Apis m. carniça*** (abelha carniça): introduzidas no Brasil em 1845, são originárias dos Alpes Austríacos e da Iugoslávia. Caracterizam-se por apresentarem pelos cinza – claro, são muito mansas, produtivas e enxameiam pouco.
- ***Apis m. ligustica*** (abelha italiana): originárias da Itália foram introduzidas no Brasil entre 1870 e 1880, pelo apicultor Frederico A. Hanneman, em Rio Pardo (RS). Possuem o corpo coberto por pelos amarelos, mansas, produtivas e de pouca tendência enxameatória.
- ***Apis m. caucásica*** (abelha caucasiana): Procedentes do Cáucaso Central da União Soviética apresentam pelos cinza mais claro que as carniças. São abelhas muito mansas e de baixa produção de mel, quando comparadas as demais raças citadas.
- ***Apis m. scutellata*** (abelha africana): foram introduzidas no Brasil em 1956, em São Paulo, pelo Professor Dr. Warwick Estevan Kerr. As abelhas foram levadas ao Horto de Camaquã, em Rio

Claro (SP), com o objeto de obter uma raça produtiva em um programa de melhoramento genético. São conhecidas vulgarmente como abelhas africanas e suas principais características são: operárias apresentam aspecto semelhante às italianas, no que concerne à cor, pois apresenta faixas amarelas no abdômen e são menores do que as operárias das raças europeias introduzidas no Brasil. Os zangões são escuro-bronzeados e suas rainhas são escuras e geralmente longas, menos corpulentas do que as de raça italiana. São muito agressivas, polinizadoras e enxameadoras o que difere bastante seu comportamento em relação as das demais abelhas (SOUSA, 2007).

Atualmente, no Brasil não existem abelhas puras europeias, e sim uma raça de abelha denominada de africanizada, um híbrido das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata*. A variabilidade genética dessas abelhas é muito grande, havendo uma predominância das características das abelhas européias no Sul do País, enquanto ao Norte predominam as características das abelhas africanas. A abelha africanizada possui um comportamento muito semelhante ao da *Apis mellifera scutellata*, em razão da maior adaptabilidade dessa raça às condições climáticas do País. Muito agressivas, porém, menos que as africanas, a abelha do Brasil tem grande facilidade de enxamear, alta produtividade, tolerância a doenças e adapta-se a climas mais frios, continuando o trabalho em temperaturas baixas, enquanto as europeias se recolhem nessas épocas (KOO e PARK, 1997; FUNARI *et al.*, 2003).

Para abrigarem suas crias (ovo, larva e pupa) e armazenarem reservas de alimentos (mel e pólen), as abelhas constroem seus ninhos em vários locais na natureza, como oco de pau, fenda de pedras, marquises de prédios, móveis abandonados, galhos de árvores. A estrutura do ninho é feita por um ou vários favos posicionados na horizontal ou na vertical

dependendo da espécie de abelhas. Na espécie *Apis mellifera*, a qual pertence à abelha africanizada, os ninhos são construídos com vários favos na posição vertical. O favo é composto por diversas células hexagonais denominadas alvéolos, com função de receber as crias e armazenar alimentos. O diâmetro e a profundidade dos alvéolos variam em função do tipo de indivíduo nele criado (SOUSA, 2007).

Em uma família de abelhas do gênero *Apis* são observados três tipos de indivíduos ou castas: a rainha, a operária e os zangões. Cada indivíduo apresenta diferenças nas características morfológicas e fisiológicas que estão relacionadas. Estes indivíduos apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas que estão relacionadas com as diferentes funções que exercem na colônia. A rainha e as operárias normalmente estão presentes na colônia, já os zangões normalmente quando existe abundância de alimento no campo. A rainha ou abelha mestra é responsável pela postura dos ovos e por manter a ordem social na colmeia. As operárias desempenham funções dentro e fora da colmeia, obedecendo a uma escala de trabalho de acordo com a idade do indivíduo (Tabela 2). Os zangões são os indivíduos machos, maiores do que as operárias, que têm por função fecundar a rainha (WINSTON, 1987).

Tabela 2 - Divisão de trabalho das abelhas operárias *Apis mellifera* L.

Idade (dias)	Tarefa
1 - 3	Faxineiras – Limpeza e reforma dos favos
	Nutrizes – Preparo da alimentação para as larvas e produção da geleia real
4 - 12	
13 - 18	Engenheiras – Produção de cera, construção de favos e puxar realeiras
19 - 20	Sentinelas – defendem a colmeia
Após 21	Campeiras – fazem os serviços externos no campo – coleta de alimentos

Fonte: SOUSA, 2007.

Os nutrientes requeridos pelas abelhas, guardadas as suas particularidades, são os mesmos requeridos por outras espécies animais: proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais e água. A diferença entre as abelhas e outros animais é que em condições naturais, todos esses nutrientes necessários à sua alimentação provêm apenas do néctar ou pseudonéctar (honeydew), do pólen e da água. O néctar satisfaz as necessidades de carboidratos, fundamental para a geração de energia; o pólen supre o requerimento de proteínas, minerais, lipídeos e vitaminas; e a água cumpre papel de transporte e dissolução de substâncias, e serve de meio para várias reações químicas (PINHEIRO *et. al.*, 2009). O pólen consumido pelas abelhas é aquele estocado nos alvéolos, que recebeu mel, néctar e secreções glandulares, sofreu fermentação láctica ácida e é chamado de "pão de abelhas" (HERBERT Jr. e SHIMANUKI, 1978).

As abelhas são consideradas eficientes polinizadores para numerosas plantas economicamente importantes. Por serem insetos alados, possuem grande mobilidade o que lhes permite a passagem de uma flor à outra, ou de uma planta à outra, com extraordinária rapidez. Além disso, as abelhas possuem pilosidade abundante e corbículas que lhes permitem carregar grandes quantidades de pólen (CONCEIÇÃO, DELABIE, NETO e COSTA NETO, 2004).

2.2 O pólen

2.2.1 Definição e funções

Os grãos de pólen são os microesporos localizados nas anteras dos estames das angiospermas (Figura 1), e que consistem nas células reprodutivas masculinas das plantas, com o propósito de transmitir seus gametas ao aparelho sexual feminino das flores (WITHERELL, 1975; SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996).

Figura 1 - Aparelho reprodutor da flor.

Fonte: www.biomaniacos.com.br.

Cada grão de pólen compreende uma única célula, que se apresenta envolvida por duas camadas protetoras, a exina e a intina, uma mais externa e a outra mais interna, respectivamente (Figura 2). A intina é composta basicamente por celulose e a exina de esporolenina, cuja origem acredita-se ser pela polimerização oxidativa de carotenóides (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CORNEJO, 1994). Os grãos de pólen possuem diâmetro entre 6 e 200 μm , com formas e cores diversas; normalmente são esféricos e possuem poros na superfície, conforme as espécies de plantas da qual foram originados (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

Figura 2 - Grão de pólen.

Fonte: <http://cache.eb.m/eb/image?id=63305&rendTypeld=4co> e

Os grãos de pólen podem ser de diversas cores, variando entre o branco, amarelo, laranja, vermelho e tons mais escuros, dependendo da sua origem botânica e da composição química dos pigmentos encontrados na exina. Alguns compostos são hidrossolúveis, representados pelos flavonóides e outros lipossolúveis como carotenóides e xantofilas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005).

O pólen pode ser transportado pelo vento, pela água, pássaros, morcegos ou por insetos. Dentre estes estão as abelhas, que recolhem e aglutinam os grãos de pólen em pequenas bolotas, misturando a eles secreções salivares e uma pequena quantidade de néctar (KRELL, 1996; VILLANUEVA *et al.*, 2002).

As abelhas alimentam-se de néctar e do pólen das flores, dispondo para isso de órgãos especializados para a coleta de cada um dos substratos (CAMPOS, 1997). O estímulo para as abelhas operárias adultas coletarem e armazenarem o pólen se dá por dois motivos: para a alimentação das larvas de operárias e zangões com mais de 3 dias de idade e para sua própria alimentação, consistindo na matéria-prima necessária para o bom desenvolvimento glandular e conseqüentemente a boa produção de cera, geleia real e outras substâncias (MORETI, 1997; ALVES *et al.*, 1997).

A coleta do pólen pelas abelhas é feita através das peças bucais e dos pelos distribuídos em seu corpo. Os grãos de pólen, presos aos pelos, são recolhidos pelas pernas anteriores e medianas e transferidos às pernas posteriores. Em seguida, são armazenados nas corbículas (cestas de pólen), que consistem em estruturas localizadas na altura da tíbia do terceiro par de pernas, como apresentado na Figura 3 (CORNEJO, 1994; MORETI, 1997).

Figura 3 - Abelha com carga de pólen na corbícula.

Fonte: <http://pdphoto.org/PictureDetail.php?mat=pdef&pg=8042>.

2.2.2 Importância do pólen para as abelhas

Para muitos insetos, e especialmente para as abelhas, o pólen é a principal fonte de alimento não líquido, sendo consumido pelas abelhas adultas e fornecido às larvas de operárias e zangões, após o terceiro dia de desenvolvimento. Além disso, contém a maioria, se não todos, os nutrientes essenciais para a produção de geléia real, com a qual são

nutridas as larvas da abelha rainha e as larvas jovens de abelhas operárias. As abelhas operárias necessitam se alimentar de pólen, o que propicia o bom desenvolvimento das glândulas produtoras da geléia real. Deste modo, o pólen é essencial para o crescimento normal e o desenvolvimento de todos os indivíduos de uma colônia de abelhas, bem como, é essencial para a reprodução das colônias (MORETI *et al.*, 2002).

Nem todos os grãos de pólen têm igual valor nutritivo para as abelhas, pois eles diferem em sua composição química de planta para planta. Abelhas alimentadas com determinados tipos de pólen desenvolvem-se mais rapidamente do que com outros, pois a origem botânica do pólen interfere na quantidade de vitaminas, proteínas, carboidratos, minerais e açúcares (MORETI *et al.*, 2002).

As abelhas operárias visitam uma ou várias espécies florais a fim de obter um pólen completo, de acordo com o tamanho da bolota e do conteúdo nutricional (STANLEY e LINSKENS, 1974). A colheita do pólen pelos insetos em geral, não está condicionada pela quantidade de pólen produzido, mas pelas características de seus constituintes. As razões pelas quais as abelhas se orientam para as colheitas polínicas não são completamente conhecidas. Apesar de haver uma provável relação entre a escolha da fonte de pólen, coletado pelas abelhas, e a disponibilidade de recursos, coloração, odor e morfologia das flores (PERNAL e CURRIE, 2002), a preferência de coleta pelas abelhas em razão da qualidade nutricional do pólen é ainda muito discutida (ROULSTON e CANE, 2002; COOK *et al.*, 2003; MODRO *et al.*, 2007).

Segundo Funari *et al.* (2003) e Barreto *et al.* (2006), as abelhas africanizadas levam para a colmeia uma carga média de pólen de 11,4 mg, nas duas corbículas, o que corresponde 17% do peso da operária coletora.

2.2.3 Palinologia

A palavra Palinologia deriva dos radicais latinos *pollen*, *pulvis* (pó, farinha fina) e do grego *logos* (conhecimento, palavra) e representa o ramo da Botânica que estuda o pólen através do tempo e sua morfologia (ZAFRA, 1979). As camadas que envolvem o grão de pólen (Figura 3) possuem formas muito variadas (rugosas, lisas, com ou sem ornamentações), que permitem realizar as classificações sistemáticas e diferenciar as espécies botânicas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CORNEJO, 1994).

De acordo com Silva *et al.*, (2012) a palinologia foi reconhecida como ciência no século XX, sendo utilizada em várias áreas. Um dos primeiros trabalhos com palinologia foi apresentado por Hyde e Williams em 1945, que definiram essa ciência como o estudo morfológico do pólen e do esporo, bem como sua dispersão e aplicação. Posteriormente, a palinologia foi apresentada como uma ciência que trata principalmente da exina dos grãos de pólen e do esporo. O método de acetólise proposto por ERDTMAN em 1960 foi considerado um avanço nos estudos palinológicos, porque permitiu uma melhor descrição da exina quanto a sua ornamentação, seu número e posição das aberturas. O conjunto de tais características faz com que cada espécie de planta apresente morfologia própria do grão de pólen e da exina, favorecendo o reconhecimento taxonômico das espécies vegetais pelos palinólogos (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012).

A coleta, a catalogação e a identificação taxonômica de espécies florais visitadas por abelhas de uma determinada região são importantes para os apicultores, que a partir daí podem identificar as fontes de alimentos, visando maximizar a utilização dos recursos disponíveis (MORETI, *et al.* 2000). Este tipo de trabalho consiste na elaboração de um herbário regional.

A Figura 4 mostra a aparência dos grãos de pólen apícola desidratado.

Foto: Vanilda Arruda

Figura 4 - Grãos de pólen apícola desidratado.

O conjunto de plantas úteis para as abelhas como fornecedoras de néctar, pólen e resinas é definido, pela maioria dos autores, como flora apícola. O Brasil possui uma abundante e variada flora apícola, capaz de produzir méis de primeira qualidade, com cores e sabores bastante diferenciados, e ainda, proporcionar ao apicultor outros produtos facilmente comercializados, como o pólen e a própolis. Entretanto, muitas informações a respeito da época de floração, abundância e importância das plantas apícolas como fornecedoras de pólen, néctar e/ou resinas para as abelhas, são ainda necessárias para que os apicultores possam utilizá-las no manejo dos apiários (MORETI *et al.*, 2002). Devido à diversificada flora polínica, certamente, inúmeras espécies botânicas ainda não foram observadas pelo produtor apícola ou descritas na literatura científica (BARRETO *et al.*, 2006).

As abelhas ao coletarem o néctar das flores para produção de mel carregam involuntariamente ou não, também o pólen, sendo este adicionado ao mel quando o néctar é regorgitado nos alvéolos. Desta maneira o pólen aparecerá no mel e em outros produtos da colmeia como cera e própolis, compondo um importante indicador da sua origem

geográfica, principalmente, e da origem floral (BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002).

Cada região tem um número de plantas importantes para a apicultura e constantemente os pesquisadores realizam trabalhos de levantamento e identificação destas plantas (MORETI *et al.*, 2002). Em 2004 foi apresentada por Barth, uma importante revisão sobre os tipos polínicos em amostras de mel, própolis e cargas de pólen depositado na corbículas de abelhas *Apis mellifera* e Meliponini considerando as regiões brasileiras.

Pela análise polínica é possível identificar as principais fontes poliníferas utilizadas pelas abelhas, bem como os períodos de produção de pólen no campo e as possíveis épocas de carência. A análise polínica baseia-se no conhecimento prévio das características morfológicas dos grãos de pólen de espécies de plantas ou de grupos de plantas. Esta análise é feita por comparação do pólen presente nos produtos apícolas (mel, própolis, cera) (BARTH, 1989, 1998, 1999), com aqueles referentes à flora da região, previamente catalogados (MORETI *et al.*, 2006).

Na análise palinológica observa-se qualitativamente e quantitativamente os elementos microscópicos constantes nas amostras, caracterizando-os, identificando-os e agrupando-os segundo os seguintes critérios internacionais (LOUVEAUX *et al.*, 1978):

- Pólen dominante (PD)- mais de 45% do total de grãos de pólen contados;
- Pólen acessório (PA)- de 16 a 45%;
- Pólen isolado (PI)- até 15%, subdividido em:
 - Pólen isolado importante (PII): 3 a 15%;
 - Pólen isolado ocasional (PIO): menos de 3%.

2.3 O pólen apícola

2.3.1 Definição e funções

A Instrução Normativa nº. 03, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2001), que estabelece o Regulamento Técnico para Fixação de identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de abelhas, Geléia real liofilizada, Pólen apícola, Própolis e extrato de Própolis, define o pólen apícola como sendo 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 colmeia. O pólen apícola desidratado é definido como sendo o produto que passa por processo de desidratação, seguindo os procedimentos adequados de tratamento, com temperatura inferior a 42 °C, e com teor de umidade inferior a 4%.

O pólen apícola é coletado por uma grade de retenção, caindo em um recipiente coletor, conjunto este denominado de coletor de pólen (Figura 5). No final da coleta encontram-se reunidas as bolotas de grãos de coloração variável, indicando as diversas comunidades botânicas colecionadas pelas abelhas, formando uma mistura conhecida por *mix* polínico, sendo esse material removido pelo apicultor para o beneficiamento, comercialização e consumo humano e animal (BARRETO *et al.*, 2006).

Foto: Dawson Roots

Figura 5 - Coletor de pólen (Apiário Rainha do Céu).

2.3.2 Composição físico-química e valor nutricional do pólen apícola

A composição química do pólen varia com a espécie vegetal, com as condições ambientais, idade e estado nutricional da planta quando o pólen está se desenvolvendo, origem geográfica, estações do ano e de ano para ano (HERBERT Jr. e SHIMANUKI, 1978; FUNARI *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2006).

A Tabela 3 apresenta a comparação entre alguns valores nutricionais do pólen apícola desidratado, obtidos por diversos pesquisadores.

Tabela 3 - Composição química apresentada por alguns autores em diferentes amostras de pólen apícola desidratado brasileiro.

Referências	Componente					
	Umidade (%)	Proteínas (%)	Fibra bruta (%)	Açúcares totais (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)
(A)	-	21,0	NA	NA	3,0	3,0
(B)	8,78	21,20	NA	NA	8,80	2,79
(C)	24,1	26,2	1,1	NA	5,1	2,6
(D)	7,4	21,0	NA	NA	7,0	2,4
(E)	3,96	15,78	4,60	37,36	3,82	2,89
(F)	2,34	23,59	NA	NA	4,97	3,08
(G)	3,47	23,88	NA	NA	5,39	2,98
(H)	4,23	20,50	3,4	52,1	4,9	2,9
(I)	5,53	19,57	NA	NA	7,34	2,65
Legislação						
Brasileira	Máx. 4	Mín. 8	Mín.2	14,5 a 55,0	Mín. 1,8	Máx. 4
	(%)					

A = REIS e MARCHINI, 2000 (Piracicaba – SP);

B = BASTOS *et al.*, 2003 (Estados de SP e MG);

C = FUNARI *et al.*, 2003 (Botucatu – SP);

D= ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005 Região Sul do

E = BARRETO *et al.*, 2005 (várias regiões do Brasil);

F = MELO *et al.*, 2009 (Parquera-Açu – SP);

G = ARRUDA *et al.*, 2013a (Parquera-Açu – SP);

H = CARPES, 2009a (Estados de PR, SC e RS);

I = MARTINS *et al.*, 2011 (várias regiões do Brasil);

NA= não analisado

CAMPOS *et al.*, (2008) numa revisão relataram trabalhos em que foi analisado o pólen apícola proveniente de vários países. Verificaram que a composição centesimal do pólen apícola desidratado, foi de 10 a 40% de proteínas, 1 a 13% de lipídeos 13 a 55% de carboidratos totais e 2 a 6% de cinzas. No pólen estão também presentes os ácidos graxos, nomeadamente, os ácidos mirístico, linoleico, oleico, esteárico e o palmítico em maior quantidade. Todos os aminoácidos essenciais são encontrados no pólen apícola, sendo a prolina e ácido glutâmico os mais abundantes. Outros componentes encontrados em menor quantidade no pólen apícola são as vitaminas (C, E, complexo B, carotenoides precursores de vitamina A), minerais (K, Na, Ca, Mg, P, S, traços de Al, B, Cl, Cu, I, Fe, Mn, Ni, Si, Ti e Zn), enzimas, terpenos, ácidos nucleicos e reguladores de crescimento (LOPER, *et al.*, 1980; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996; KRELL, 1996; CAMPOS *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2009; MELO e ALMEIDA- MURADIAN, 2011; ARRUDA, 2013a, 2013b; YANG *et al.*, 2013).

2.3.3 Fabricação do pólen apícola

Diversos fatores influenciam a produção e a qualidade do pólen apícola, a referir: a qualidade e as condições da rainha, que deve ser jovem, sadia e de alta postura; o estado sanitário e nutricional da colmeia deve ser adequado para evitar enfermidades e queda na produção; o conhecimento técnico por parte do apicultor, para que as colmeias sejam dispostas em locais adequados e que sejam realizados os trabalhos de manutenção e revisão das mesmas; a flora e o calendário apícola regional a fim de se obter resultados satisfatórios durante a coleta, sendo o período da entressafra de mel o mais adequado e condições climáticas favoráveis à prática apícola (CORNEJO, 1994).

De acordo com Salomé e Salomé (1998), as etapas para produção de pólen apícola devem ser: congelamento, desidratação, limpeza e envase. No entanto Cornejo (1994) indica que o pólen apícola deve ser seco, limpo, desinfetado, macerado e depois envasado. Ambos descrevem

de maneira bastante resumida o fluxo de produção e processamento do pólen apícola. Para garantir a qualidade do produto além do manejo zootécnico é de fundamental importância que um roteiro de boas práticas seja executado do campo ao processamento pelos produtores, posteriormente pelos manipuladores garantindo a integridade do produto até o consumidor final (ALMEIDA-MURADIAN, ARRUDA e BARRETO, 2012).

A composição físico-química principal do pólen apícola “in natura” que são proteínas, açúcares, lipídeos e umidade, combinados à presença de microrganismos disponíveis naturalmente no produto (fungos, leveduras e mesófilos), são condições indiscutíveis para que os cuidados de coleta, transporte, acondicionamento e processamento sejam muito bem realizados e monitorados. Almeida-Muradian, Arruda e Barreto (2012) sugeriram etapas que podem auxiliar no fluxo da produção ao processamento do pólen apícola comercial:

No apiário:

- Manejo sistematizado dos enxames;
- Alimentação dos enxames com produtos íntegros e de qualidade;
- Coleta diária do pólen apícola;
- Descarte do pólen apícola exposto à dias chuvosos;
- Troca diária do cocho coletor;
- Higienização de instrumentos em contato com o pólen no momento da coleta (pinças, formão, espátula e pincel);
- Luvas de campo e indumentária do apicultor, higienizadas;
- Embalagens de coleta e transporte do pólen fresco, previamente higienizadas e secas;
- Tempo de coleta e transporte suficientes para manter a integridade do produto até a unidade de processamento.

Na área de processamento necessariamente o manipulador deverá obedecer à sequência abaixo:

- Recepção da matéria prima (pólen "*In Natura*");
- Rotulagem primária, data e local de coleta;
- Remoção de sujidades grosseiras;
- Peneiramento;
- Congelamento a -18°C por 48 horas no mínimo e no máximo de 15 dias;
- Desidratação etapa I em temperatura máxima de 42°C por 8 horas*;
- Limpeza por ventilação;
- Limpeza manual;
- Desidratação etapa II em temperatura máxima de 42°C por 8 horas*;
- Envase final do produto desidratado;
- Rotulagem final do produto;
- Armazenamento;
- Expedição.

* O tempo de remoção da umidade do pólen apícola está relacionado com o modelo tecnológico empregado e com o índice inicial de umidade do pólen "verde".

As Figuras 6 a 10 ilustram algumas das etapas de beneficiamento do pólen apícola.

Figura 6 - Coleta de pólen apícola.

Figura 7 - Pacotes de pólen armazenados em freezer

Fonte: MILFONT, FREITAS e MAGALHÃES, 2011.

Foto: Vanilda Arruda

Figura 8 - Estufa (Ballardin®) utilizada para a secagem do pólen apícola.

Figura 9 - Limpeza do pólen apícola

Fonte: MILFONT, FREITAS e MAGALHÃES, 2011.

Figura 10 - Embalagens para pólen apícola.

Fonte: <http://www.pronatu.com.br/>;

<http://www.melsaude.com.br/>

O teor em umidade do pólen apícola é elevado o que pode facilitar a multiplicação de microrganismos, fermentações indesejáveis e consequentemente a sua deterioração (HERBERT Jr, SHIMANUKI, 1978), pelo que uma desidratação adequada é indispensável. Os procedimentos de desidratação mais comumente utilizados pelos apicultores, para preservar o produto e aumentar o seu tempo de vida de prateleira, são a desidratação ao ar livre ou o aquecimento artificial sendo este último o mais utilizado na produção para fins comerciais (COLLIN *et al.*, 1995; ALMEIDA-MURADIAN, ARRUDA e BARRETO, 2012).

2.3.4 Produção do pólen apícola

Os levantamentos realizados por Schmidt e Buchmann (1992); Eaton e Law, (2000), apontaram como maiores produtores de pólen apícola: a China, os Estados Unidos, o México, a Argentina, a Austrália e a Espanha.

No Brasil, a produção de pólen apícola iniciou-se no final da década de 80. Atualmente, o mercado favorável ao consumo de produtos naturais, complementares à dieta ou com efeitos terapêuticos, vem estimulando e promovendo a produção desta modalidade da cadeia produtiva apícola. A produção anual de pólen no Brasil ronda as 200 toneladas, sendo os maiores Estados produtores: Bahia, Santa Catarina e Paraná (BARRETO *et al.*, 2005).

Barreto *et al.*, (2006) ao realizarem coleta de dados para caracterizar o perfil da produção do pólen apícola brasileiro, verificaram a existência de dois importantes pólos produtivos no país: a região Sul, sendo Santa Catarina o principal Estado produtor, e o Nordeste, onde a maior produção encontra-se na Bahia. Estes autores verificaram ainda que, existem regiões brasileiras não produtoras de pólen apícola, porém com alto potencial produtivo como os Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Ceará. Nestas regiões como o armazenamento de pólen nas colmeias era elevado, os apicultores colocavam coletores de pólen apenas para impedirem o acúmulo deste.

Em relação à rota de comercialização do pólen apícola, os Estados brasileiros, na sua maioria, produzem somente para o seu abastecimento interno. A Bahia atende a demanda dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul e Distrito Federal. O pólen apícola produzido em Santa Catarina, além de ser comercializado em praticamente todos os Estados do Brasil, é também exportado para a Colômbia e Uruguai. O Estado do Paraná comercializa pólen principalmente para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (BARRETO *et al.*, 2006).

Segundo a Confederação Brasileira de Apicultura (CBA), até 2004, a organização da Apicultura Brasileira era constituída por dezesseis Federações e Associações Apícolas. Os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Tocantins, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Paraíba e Ceará (BARRETO *et al.*, 2006).

2.3.5 Padrão de qualidade do pólen apícola

A regulamentação brasileira sobre a qualidade do pólen apícola (BRASIL, 2001) preconiza que para ser comercializado no Brasil deve ter os seguintes requisitos:

Características Sensoriais:

Aroma: característico, de acordo com a origem floral;

Cor: característica, de acordo com a origem floral;

Aspecto: grãos heterogêneos, de forma e tamanhos variados, tendendo a esféricos;

Sabor: característico, de acordo com a origem floral;

Requisitos físico-químicos:

Umidade: Pólen Apícola: máximo 30%;

Pólen Apícola Desidratado: máximo 4%.

Cinzas: máximo de 4%; m/m, na base seca;

Lipídios: mínimo de 1,8%; m/m, na base seca;

Proteínas: mínimo 8%; m/m, na base seca;

Açúcares Totais: 14,5% a 55,0%; m/m, na base seca;

Fibra Bruta: mínimo 2%; m/m, na base seca:

Acidez livre: máximo 300 mEq/kg;

pH: 4 a 6.

Além do Brasil, poucos países como Suíça, Argentina e França têm reconhecido legalmente o pólen como um complemento alimentar possuindo padrão de identidade e qualidade, bem como os limites de cada parâmetro a ser analisado. Embora comercializado em muitas lojas de alimentos saudáveis, o pólen apícola não é considerado um aditivo alimentar pela Food and Drug Administration (FDA) e não tem sido comercializado com padrões especiais (KRELL, 1996; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005, ALMEIDA-MURADIAN, 2009, 2012).

Segundo Barreto *et al.* (2005), seria necessário adicionar padrões específicos na legislação brasileira, como por exemplo, para a questão dos possíveis contaminantes orgânicos e inorgânicos ou dos critérios macroscópicos e microscópicos. Além disso, provavelmente pela falta de suporte científico, a Regulamentação Brasileira não prevê qual o prazo de validade do pólen apícola desidratado. Barreto *et al.* (2005), ao realizar o levantamento de informações quanto à embalagem e acondicionamento do pólen apícola desidratado proveniente de sete diferentes Estados brasileiros, observaram que 59% das amostras eram comercializadas em embalagens de vidro e 41% em embalagens plásticas (potes ou sacos) e encontraram nos rótulos das embalagens prazos de validade do produto variando de seis meses a três anos.

Não existem dúvidas sobre os efeitos benéficos do pólen apícola para a saúde humana; porém, há questões básicas pendentes a serem esclarecidas visando assegurar a qualidade do produto para o consumo, a partir da monitorização da sua produção, elaboração e armazenamento (BARRETO *et al.*, 2006).

2.3.6 Estabilidade do pólen apícola

O pólen apícola, tal como outros alimentos ricos em proteínas, pode perder o valor nutricional rapidamente se armazenado de forma incorreta. À temperatura ambiente, o pólen fresco perde a sua qualidade em poucos dias. Congelado, as perdas aumentam muito após um ano, porém se for desidratado a pelo menos 10% (preferencialmente 4%) de umidade, pode ser mantido por meses à temperatura ambiente e protegido da luz solar direta (CORNEJO, 1994). Campos *et al.*, (2003) referem que ambientes secos, frios e escuros podem ser considerados ideais para armazenamento do pólen apícola a fim de preservar o seu valor nutricional. Melo e Almeida-Muradian (2011) verificaram que para a conservação das vitaminas E, C e beta-caroteno como pró-vitamina A, a estocagem em freezer foi a condição mais eficiente enquanto que Arruda *et al.*, (2013b) demonstraram que a concentração de vitaminas do complexo B não era afetada pelas condições de armazenamento (freezer -18 °C, proteção contra luz) mas sim pelo tempo de estocagem.

Devido à importância nutricional e funcional dos componentes presentes nos alimentos, é necessário controlar e supervisionar os distintos processos de elaboração, de tal forma que se garanta que os alimentos processados forneçam ao consumidor todos os nutrientes na sua forma mais disponível, além de cumprir os requerimentos estipulados por lei e conservar as suas propriedades organolépticas (TORRES *et al.*, 2003).

2.3.7 Efeitos atribuídos ao consumo do pólen apícola

Atualmente, o pólen apícola é utilizado principalmente como suplemento alimentar natural, já que possui baixos teores de lipídeos, o valor nutricional deste produto deve ser de particular interesse para aqueles que têm uma dieta desequilibrada ou deficiente e para a comunidade científica, face aos potenciais benefícios deste produto para a sociedade (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996). Recomenda-se o consumo diário do pólen de 5 a 25g (CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997; BASTOS *et al.*, 2003). Barreto *et al.*, (2006), referem que valor calórico do pólen apícola brasileiro varia entre 235 a 274kcal/100g. No entanto, segundo Magalhães (2005), um adulto pode consumir por dia até 20 gramas e uma criança 7 gramas. Uma colher de chá contém aproximadamente 8 gramas de pólen e a de sopa 25 gramas de pólen apícola.

Os benefícios, cientificamente comprovados associados ao consumo de pólen apícola, ao seu extrato ou comprimidos conhecidos como Cernilton®, relacionam-se com a prevenção de problemas da próstata (BECKER E EBELING, 1988; BUCK, REES e EBELING, 1989; BUCK *et al.*, 1990; SUZUKI *et al.*, 1992; RUGENDORFF *et al.*, 1993; KRELL, 1996; SHOSKES, 2002; SHOSKES e MANICKAM, 2003, SHAPLYGIN E SIVAKOV, 2007; WAGENLEHNER *et al.*, 2009), dessensibilização frente às alergias, ganho de peso em animais com alimentação suplementada de pólen apícola, efeito bacteriostático, bactericida e proteção contra efeitos adversos dos raios X nos tratamentos com uso de radiação (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996; EATON e LAW, 2000). Além disso, existem estudos comprovando a atividade benéfica do pólen apícola relativa à aterosclerose (WOJCICKI *et al.*, 1986) e neoplasias (ZHANG *et al.*, 1995). Os mecanismos de ação do extrato de pólen que produziram resultados favoráveis nos tratamentos da prostatite crônica, hiperplasia benigna da próstata, adenoma da próstata da fase I-II, não são conhecidos. Acredita-se que o pólen apícola iniba a produção de prostaglandina e leucotrieno pelo organismo, reduzindo o

congestionamento e agindo como anti-inflamatório. Como a teoria não explica a redução do tamanho da próstata deve haver mais de um mecanismo de ação (LOSCHEN e EBELING, 1991).

Outros efeitos benéficos atribuídos ao pólen apícola descritos na literatura como o aumento do desempenho de atletas, de vitalidade da pele, melhoria e cura da acne, anemia, úlceras, hipertensão, resfriados, carecem de suporte científico (KRELL, 1996).

De acordo com a literatura o pólen apícola apresenta atividade antioxidante devido aos seus compostos fenólicos, onde os derivados do ácido cinâmico são os mais efetivos. Esta atividade é responsável por propriedades regenerativas e pelo aumento da longevidade dos consumidores deste produto (CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996; NAGAI *et al.*, 2002; CAMPOS *et al.*, 2003).

2.4 Antioxidantes

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibi significativamente a oxidação do mesmo (SIES & STAHL, 1995; HANDELMAN, 2001; HALLIWELL, 2000; AL-MAMARY, AL-MEERI e AL-HABORI, 2002; BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004). Na indústria de alimentos, os antioxidantes são empregados com a finalidade de evitar a deterioração dos produtos e manter o valor nutricional (RAMALHO e JORGE, 2006), sendo ainda de grande interesse para profissionais da saúde visto que, podem proteger o organismo contra os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO'S) e doenças degenerativas (SHAHIDI, 1997).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que tem um elétron isolado, livre para se ligar a qualquer outro elétron, sendo assim extremamente reativas (SOARES, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998).

A oxidação nos sistemas biológicos é uma consequência da ação dos radicais livres no organismo. Os radicais originam-se de fontes exógenas, substâncias com as quais entramos em contato, ou de fontes endógenas, substâncias originadas de processos biológicos do próprio organismo. Nos processos biológicos há formação de uma variedade de radicais livres que englobam: radicais de oxigênio ou espécies reativas do oxigênio ((íon superóxido; $O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), alcoxila ($RO^{\bullet}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$), peridroxila ($HOO^{\bullet}$) e oxigênio singlete (1O_2)); complexos de metais de transição (Fe^{+3}/Fe^{+2} e Cu^{+2}/Cu^{+}); radicais de carbono (triclorometil ($CCl_3^{\bullet}$)); radicais de enxofre (tiol ($RS^{\bullet}$)); radicais de nitrogênio (fenilhidrazina ($C_6H_5N=N^{\bullet}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$)) (SOARES, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação antioxidante pelo qual um composto exerce sua ação permite classificá-lo como primário ou secundário, este último subdividido em sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos. Quando estes são capazes de doarem prótons ao radical livre impedindo o início do processo oxidativo ou ainda interrompendo a propagação da auto-oxidação, são classificados como primários (REISCHE; LILLARD e EITENMILLER, 2002).

A Figura 11 mostra do mecanismo de ação dos antioxidantes primários.

onde: $ROO^{\bullet}$ e $R^{\bullet}$ são radicais livres;

AH, antioxidante com um hidrogênio ativo;

$A^{\bullet}$, radical inerte

Figura 11 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.

Fonte: SHAHIDI e NACZK, 2004.

Na molécula do antioxidante, o átomo de hidrogênio ativo é abstraído pelos radicais livres ROO° e R° mais facilmente que os hidrogênios alílicos das moléculas lipídicas insaturadas, por exemplo. Com a doação do hidrogênio o radical antioxidante formado é estabilizado por ressonância e torna-se relativamente fraco, assim a taxa de propagação da oxidação é diminuída (RAMALHO e JORGE, 2006; REISCHE; LILLARD e EITENMILLER, 2002).

Os antioxidantes primários mais utilizados para prevenir ou retardar a deterioração oxidativa dos alimentos são compostos sintéticos pertencentes à classe dos compostos fenólicos como: BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno), TBHQ (terc-butil-hidroquinona), THPB (tri-hidroxi-butilfenona) e PG (propil-galato). Esses antioxidantes tiveram seu uso aprovado em alimentos após investigações que comprovaram a segurança dentro do limite de ingestão diária, ficando sujeitos às legislações (TAKEMOTO, TEIXEIRA FILHO e GODOY, 2009). Antioxidantes naturalmente presentes em alimentos também podem agir como antioxidantes primários e são habitualmente adicionados em alimentos, como é o caso dos tocoferóis e dos carotenoides (REISCHE; LILLARD e EITENMILLER, 2002).

Os antioxidantes secundários podem bloquear e decompor os peróxidos e hidroperóxidos (produtos da reação oxidativa), convertendo-os à forma inativa, desativar o oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta, agir como sequestradores de oxigênio, reduzir a taxa de oxidação, quelar metais pró-antioxidantes e desativá-los ou repor moléculas de hidrogênio para os primários (RAMALHO e JORGE, 2006; DONNELLY e ROBINSON, 1995; BRAVO 1998). Os antioxidantes secundários classificados como sinergistas promovem a atividade dos antioxidantes primários, são bons exemplos o ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido tartárico (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Embora os antioxidantes sintéticos sejam largamente empregados na conservação dos alimentos, estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes apresentarem algum efeito tóxico ou

favorecer processos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH *et al.*, 2001). O *Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)* da *Food and Agriculture Organization (FAO)* e *World Health Organization (WHO)* têm alterado nos últimos anos a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias como resultado de algumas pesquisas científicas (WÜRTZEN, 1990; SOARES, 2002). É grande o interesse por antioxidantes naturais que possam substituir os sintéticos ou atuar em conjunto com os mesmos, reduzindo sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002).

2.4.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de substâncias que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, numa definição genérica, são todas as estruturas que possuem pelo menos um núcleo benzênico no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (CUNHA, 2010). Podem ainda ligar-se a uma grande variedade de substâncias naturais, principalmente monossacarídeos como a glicose, galactose, xilose e ramnose por meio de ligações glicosídicas, tornando assim ainda mais abundante sua variedade química (BRAVO, 1998).

São principalmente derivados das vias bioquímicas do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimato que inicia com a acetil-coenzima A e malonil coenzima A. A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico. Enquanto que pela via do acetato-polimato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos na posição *meta* (SIMÕES *et al.*, 2004). Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas tão variadas quanto a dos ácidos fenólicos, dos derivados da cumarina, dos pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas. Encontram-se nessa classe de compostos também as ligninas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais. Ainda,

estruturas fenólicas são encontradas fazendo parte de proteínas, alcaloides e terpenos (SIMÕES *et al.*, 2004).

A figura 12 mostra a origem de todos os metabólitos secundários, resumida a partir do metabolismo da glicose.

Figura 12 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os três grupos de fenólicos mais presentes na dieta são os flavonoides, os ácidos fenólicos e os polifenóis (taninos) (SHAHIDI e NACZK, 2004). Como antioxidantes naturais destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos por sua constituição química e por serem largamente distribuídos na natureza (SOARES, 2002). Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto principal, conforme

representado na Tabela 4, onde C6 corresponde ao anel benzênico e CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono.

Tabela 4 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6-c1	Ácidos fenólicos
C6-c2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-c3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	naftoquinonas
C6-C1-C6	xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3-C6) ₂	diflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	ligninas
(C6-C1) _n	taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2004.

De acordo com Simões *et al.*, (2)004 outro tipo de classificação está relacionada com a ocorrência desses compostos no reino vegetal. O que os divide em:

- a) Compostos fenólicos amplamente distribuídos, como os derivados de ácidos benzoicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides, e derivados de polimerização (taninos e ligninas).
- b) Compostos fenólicos de distribuição restrita, abrangendo as classes de substâncias não citadas no item anterior.

Cada classe de compostos apresenta ampla variação estrutural, principalmente pela presença de diferentes substituintes (hidroxilas ou metoxilas) em um esqueleto aromático comum.

2.4.1.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em três grupos principais: ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e cumarinas. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Embora possuam o mesmo esqueleto básico, os números e posições dos grupos hidroxila no anel os diferem. Nas plantas é relativamente pequeno o número de fenóis livres e, destes só a hidroquinona é o mais difundido, pois se encontram sob a forma de heterosídeos ou de ésteres, quase sempre derivados do ácido benzoico ou do ácido cinâmico, onde se inclui o grupo dos fenilpropanóides, como exemplo o ácido caféico. (STALIKAS, 2007; CUNHA, 2010).

Os ácidos fenólicos hidroxilados, derivados do ácido benzoico são representados nos taninos hidrossolúveis, caso do ácido gálico e do seu dímero, o ácido elágico. Desempenham funções biológicas vitais para as plantas, tais como germinação de sementes e crescimento. O ácido *p*-hidróxibenzóico, o ácido *o*-hidroxibenzóico (ácido salicílico), o ácido vanílico e o ácido sirínico são exemplos de outros ácidos fenólicos em C₆-C₁ (CUNHA, 2010).

Os ácidos *p*-hidróxibenzóico, vanílico e sirínico são obtidos após hidrólise ácida de folhas de gimnospermas e angiospermas, possuindo estreita relação com a composição da lignina. O ácido protocatéquico apresenta ampla distribuição e o ácido gálico é encontrado mais frequentemente na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico. Os ácidos gálico e elágico são constituintes dos taninos hidrolisáveis, do qual são liberados por hidrólise ácida. O ácido elágico é encontrado em diversas ordens das dicotiledôneas, estando ausente nas monocotiledôneas, gimnospermas e pteridófitas (SIMÕES *et al.*, 2004).

A Figura 13 mostra a Estrutura química dos ácidos benzoicos.

Figura 13 - Estrutura química dos ácidos benzoicos (SOARES, 2002).

Os derivados do ácido cinâmico, geralmente sob a forma de heterósídeos fenilpropanóicos (C_6-C_3), os mais difundidos na natureza, são o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico, outros ácidos sob a forma de ésteres são encontrados em diversos fármacos. Praticamente todos os tecidos vegetais possuem ao menos um dentre esses ácidos. As funções biológicas ligadas a estes compostos são inibição de germinação e do crescimento de plantas, bem como atividades antibióticas (SIMÕES *et al.*, 2004). Ésteres de alcoóis alifáticos (ácidos mono- e dicafeoiltartárico no chá de java, o feruloitartárico nas equináceas e o 2-O-cafeoil-3-(3,4-dihidroxifenil)-D-lático, denominado ácido rosmarínico no alecrim) e os ésteres do ácido quínico (caso do ácido clorogenico) são exemplos do elevado número deste tipo de compostos (CUNHA, 2010).

O ácido *o*-cumárico tem distribuição restrita, mas é importante por originar facilmente, através da ciclização, a cumarina, que é um constituinte frequentemente responsável pelo odor nos vegetais (SIMÕES *et al.*, 2004).

Esses ácidos, que têm uma ligação dupla, podem existir sob duas formas isoméricas, por exemplo, ácido *cis*-cinâmico (isômero *Z*) e ácido *trans*-cinâmico (isômero *E*). Os derivados do ácido cinâmico mais encontrados na natureza possuem conformação *trans* e são os mais estáveis. Porém, esses dois ácidos se transformam um no outro pela influência da luz em meio aquoso (CUNHA, 2010).

A Figura 14 mostra a Estrutura química dos ácidos cinâmicos.

$R_1=R_2=R_3=R_4=H \rightarrow$ Ácido cinâmico;
 $R_1=OH \rightarrow$ Ácido *o*-cumárico;
 $R_2=OH \rightarrow$ Ácido *m*-cumárico;
 $R_3=OH \rightarrow$ Ácido *p*-cumárico;
 $R_2=R_3=OH \rightarrow$ Ácido caféico;
 $R_2=OCH_3; R_3=OH \rightarrow$ Ácido ferúlico;
 $R_2=R_4=OCH_3; R_3=OH \rightarrow$ Ácido sinápico.

Figura 14 - Estrutura química dos ácidos cinâmicos (SOARES, 2002).

As cumarinas são derivadas da 5,6-benzo-2-pirona (α -cromona). Originam-se do ácido *trans*-cinâmico que, por oxidação, resulta no ácido *o*-cumárico, cuja hidroxila fenólica condensa com uma unidade de glicose. Esse composto isomeriza no seu correspondente *cis*, o qual por ciclização forma a cumarina (SOARES, 2002) cuja estrutura é apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Estrutura química da cumarina (1,2-benzopirona).

Fonte: CUNHA, 2010.

A estrutura molecular dos polifenóis e, mais especificamente, a posição e o grau de hidroxilação do anel aromático têm influência direta sobre a atividade antioxidante destes compostos, bem como sobre o seu mecanismo de ação (OU *et al.*, 2002). A hidroxila existente na posição orto com o grupo metoxila, doador de elétrons, aumenta a estabilidade do radical fenoxil e a eficiência antioxidante do composto (CUVELIER; RICHARD e BERSET, 1992). Uma segunda hidroxila na posição orto ou para, também aumenta a atividade antioxidante. O ácido cafeico, que apresenta essa característica, possui uma atividade antioxidante maior do que o ácido ferúlico, a ação sequestrante desse composto pode estar relacionada aos grupos hidroxila, localizados na posição para no anel aromático (CHEN e HO, 1997).

Geralmente os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos possuem maior atividade antioxidante do que a dos ácidos hidroxibenzoicos. O ácido cinâmico possui o grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ na estrutura, o que aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Possivelmente, ocorre a conjugação da dupla ligação do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ com as duplas do anel (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1996).

Marinova e Yanilshlieva, 1992 realizaram uma comparação do comportamento cinético da inibição da oxidação de ácidos benzoicos (ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico e 3,4-hidroxibenzoico) e cinâmicos (ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e cafeico) concluindo que para os ácidos benzoicos a hidroxila presente na molécula do ácido *p*-hidroxibenzoico não confere ao mesmo a propriedade antioxidante. No entanto, a metoxila presente com a hidroxila no ácido vanílico atribui a ele

pequena atividade antioxidante. Para o ácido siríngico, que possui dois grupos metoxila, a ação é ainda maior. No caso dos ácidos cinâmicos, a presença da metoxila adjacente à hidroxila, como ocorre no ácido ferúlico, aumenta o período de indução da oxidação duas vezes em relação ao controle. Decurso de tempo ainda maior com a presença de duas metoxilas, como ocorre no ácido sinápico. O maior potencial foi encontrado quando presentes duas hidroxilas nas posições 3 e 4, o que é comum às estruturas dos ácidos cafeíco e 3,4-dihidroxibenzoico. Assim a atividade antioxidante dos compostos apresentou a seguinte ordem: ácido cafeíco > 3,4-dihidroxibenzoico > sinápico > siríngico > ferúlico > p-cumárico > vanílico (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos geralmente não são encontrados no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, assim solúveis em água e em solventes orgânicos polares (metanol, etanol). Por serem fenólicos, esses compostos são muito reativos quimicamente, possuem em geral características ácidas, e podem ser isolados através da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (por exemplo, solução de carbonato de sódio). Podem complexar com metais, sendo que muitos desses quelatos metálicos são importantes em diversos sistemas biológicos. Por serem compostos aromáticos, apresentam intensa absorção do UV. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais (como ferro e manganês), da luz e do calor, ou em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de suas soluções ou dos compostos isolados. O isolamento pode ser conduzido geralmente com metanol ou etanol diluídos, a fim de se evitar esterificações e menor extração de substâncias lipídicas. A análise normalmente é feita por métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada, em coluna, em fase gasosa após silição ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), geralmente em fase reversa, quando se pretende identificar e quantificar (CUNHA, 2010, SIMÕES *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muito desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Tradicionalmente as plantas contendo esses compostos, como é o caso do alecrim (ácido rosmarínico) e da alcachofra (ácido clorogenico e ácido 1,5-dicafeil-quínico), são empregadas como coleréticas e hipocolesteromiantes. Mais recentemente tais compostos têm sido estudados em relação à atividade antioxidante e anti-radicalar. As plantas com derivados salicílicos são principalmente usadas nas manifestações articulares dolorosas e em estados febris e gripais (BRAVO, 1998; CUNHA, 2010, SIMÕES *et al.*, 2004).

2.4.1.2 Flavonoides

Os flavonoides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (SIMÕES *et al.*, 2004). São moléculas de baixo peso molecular que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal, estão presente em toda a parte aérea das plantas. Todos têm por base a estrutura C₆-C₃-C₆, compostos por anéis fenil ligados através de um anel pirano. Os flavonoides incluem um vasto grupo de moléculas que divergem em pequenas partes da sua estrutura básica, dependendo da substituição no anel pirano, podem ser classificados como flavonóis, flavonas, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (BRAVO, 1998; CUNHA, 2010, ANGELO e JORGE, 2007; D' ARCHIVIO *et al.*, 2007).

A Figura 16 mostra as Estruturas químicas dos principais flavonoides.

Figura 16 - Estruturas químicas dos principais flavonoides.

Fonte: CUNHA, 2010.

Mais de 8000 flavonoides diferentes são conhecidos, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonoides podem ocorrer na forma de genina (aglicona), glicosídica ou como derivados metilados. Os flavonoides na forma de genina consistem num anel benzênico (A), condensado com um anel de 6 membros (B) que por sua vez transporta um anel fenílico (C) como substituintes na posição 2. O anel de 6 membros (B) condensado com o anel benzênico, ou é uma γ -pirona (flavonóis e flavonas) ou seu derivado di-hidro. A posição dos substituintes divide a classe destas moléculas em flavonoides (substituição na posição 2) e isoflavonoides (substituição na posição 3). Os flavonóis diferem das flavonas por possuírem um grupo hidroxila na posição 3 e ambos tem uma dupla ligação entre C_2 - C_3 . As catequinas são muito semelhantes aos flavonóis, mas distinguem-se destes por não possuírem o grupo carbonila característico no anel C. Os flavonoides estão muita vezes hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'.

Quando se formam heterosídeos, a ligação glicosídica está normalmente localizada na posição 3 ou 7 e as oses são usualmente a L-ramnose, a D-glicose ou di-holósidos de glicose e ramnose (PIETTA, 2000; DORNAS *et al.*, 2009; CUNHA, 2010).

A Tabela 5 apresenta as principais classes de flavonoides e propriedades biológicas importantes e a Tabela 6 mostra alguns dos representantes de flavonoides.

Tabela 5 - Classes de flavonoides e propriedades biológicas conhecidas.

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídeos	1660	Co-pigmentação em flores; protetores contra os raios UV nas folhas
C-heterosídeos	303	
Antocianinas	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes frequentemente em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonóides	70	
Biflavonóides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	

Fonte: SIMÕES *et al.*, (2004).

Tabela 6 - Características químicas dos flavonoides.

Composto	Subclasse	Total de hidroxilas	Posição dos grupos hidroxila	Substituições na estrutura	Posição das substituições
luteolina	flavona	4	5,7,3',4'		
orientina	flavona	4	5,7,3',4'	glicose	8
apigenina	flavona	3	5,7,4'		
isorhoifolina	flavona	2	5,4'	O-rutnose	8
gardenina D	flavona	2	5,3'	O-metil	6,7,8,4'
gardenina B	flavona	1	5	O-metil	6,7,8,4'
galocatequina	catequina	6	3,5,7,3',4',5'		
catequina	catequina	5	3,5,7,3',4'		
epicatequina	catequina	5	3,5,7,3',4'		
delfinidina	antocianidina	6	3,5,7,3',4',5'		
cianidina	antocianidina	5	3,5,7,3',4'		
eriodictiol	flavanona	4	5,7,3',4'		
hesperetina	flavanona	3	5,7,3'	O-metil	4'
naringenina	flavanona	3	5,7,4'		
diidrimiricetina	flavanonol	6	3,5,7,3',4',5'		
Diidroquercetina	flavanonol	5	3,5,7,3',4'		
fustina	flavanonol	4	3,7,3',4'		
diidrocampferol	flavanonol	4	3,5,7,4'		
genisteína	isoflavona	3	5,7,4'		
daidzeína	isoflavona	2	7,4'		
campferol	flavonol	4	3,5,7,4'		
miricetina	flavonol	6	3,5,7,3',4',5'		
quercetina	flavonol	5	3,5,7,3',4'		
patuletina	flavonol	5	3,5,7,3',4'	O-metil	6
rutina	flavonol	4	5,7,3',4'	O-rutnose	3
isoramnetina	flavonol	4	3,5,7,4'	O-metil	3'
florentina	chalcona	4	4 , 2', 4', 6'		
floridzina	chalcona	3	4', 2', 4	O- Glicose	6

Adaptado de Dornas *et al.*, (2009) e Cook e Saman (1996).

A distribuição dos flavonoides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com filo/ordem/família do vegetal bem como da variação das espécies (BURNS *et al.*, 2001). As flavonas e os flavonóis são os dois principais grupos encontrados na natureza quase sempre na forma heterosídica (CUNHA, 2010).

Diferentes funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Entre elas podem-se citar: a) proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta e visível, além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; b) atração de animais com finalidade de polinização; c) antioxidantes; d) controle da ação de hormônios vegetais; e) agentes alelopáticos; e f) inibidores de enzimas (HARBONE e WILLIAMS, 2000).

Flavonoides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos. O que se deve a: a) sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal; b) sua especificidade em algumas espécies; c) sua relativa facilidade de identificação; d) sua relativa estabilidade e e) seu acúmulo com menor influência no ambiente. Com extensão dessas aplicações, flavonoides podem ser utilizados na determinação do parentesco de híbridos e em determinação de novos cultivares (HARBONE e WILLIAMS, 2000; SIMÕES *et al.*, 2004).

Sob o ponto de vista nutricional, os flavonoides são reconhecidamente agentes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de reduzirem significativamente as tendências a doenças trombóticas (RAUHA *et al.*, 2000).

Os flavonoides atuam como antioxidantes primários, interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Dentre estes compostos, os flavonóis em especial, atuam também como antioxidante secundário, retardando a etapa de iniciação da auto-oxidação através da complexação com metais (PIETTA, 2000).

Flavonas, flavonóis fazem parte de um grupo de compostos de origens biossintéticas muito próximas. Flavonóis são flavonas as na posição C-3 por uma hidroxila, essas duas classes são em geral

classificadas juntas. Isso por que suas análises, síntese e reações químicas possuem base teórica comum. Suas cores variam do branco ao amarelo, sendo identificados em quase todo o reino vegetal. Flavonas e flavonóis naturais são frequentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. Outros substituintes encontrados com frequência são: acila, C- metlia, metileno, dioxila, isopreno, pirano, furano e seus derivados clorados (SIMÕES *et al.*, 2004, DORNAS *et al.*, 2007).

Apigenina e luteolina, livres (agliconas) ou conjugadas são as flavonas mais abundantes encontradas nas plantas. Os flavonóis mais comuns em vegetais são galangina, canferol, quercetina e miricetina. Pesquisas sobre a atividade estrutural indicam que a presença de uma hidroxila em C3 no anel heterocíclico e um catecol no anel B favorecem a atividade antioxidante (PIETTA, 2000). Os açúcares conjugados com flavonoides identificados até o momento são: D-apiose, L-arabinose, L-ramnose, D-xilose, D-alose, D-galactose e D-glicose e os ácidos D-galacturônico e D- glicurônico. Os heterosídeos mais comuns são 3-rutinosídeo quercetina (rutina) e 7-glicosídeo luteolina (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os flavonoides C-heterosídeos são diferenciados dos O-heterosídeos pela ligação açúcar-genina, sendo que nos primeiros a ligação é feita entre o carbono C-1 (anomérico) do açúcar e um ou dois carbonos do anel A do flavonoide (sempre carbonos 6 e/ou 8). O sistema de numeração é o mesmo empregado para os O-heterosídeos (SIMÕES *et al.*, 2004; D' ARCHIVO *et al.*, 2007).

Antocianidinas são caracterizadas pelo núcleo básico flavílico que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensada por um oxigênio. Os pigmentos antociâninos distribuídos em diversas famílias vegetais são responsáveis pelas cores laranja, rosa, escarlate, vermelho, violeta e azul das pétalas das flores, frutos raízes e folhas. Tem como principal função a atração de insetos e pássaros com o objetivo de polinizar e dispersar as sementes, sendo por isso de grande interação entre plantas e animais. São ainda responsáveis pela atividade inibitória do crescimento de larvas e de alguns insetos

(ANDERSEN e JORDHEIM, 2006). Nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos se intensificou uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que possuem atividade antioxidante (WANG *et al.*, 2000)

O termo chalcona é utilizado para caracterizar uma família de compostos que possui como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou um grupamento hidroxila. Apresentam as mais variadas atividades biológicas, sendo as mais comuns edulcorantes ou protetores contra o calor e luz. Possuem ação biológica variada, sendo alvos de estudos de isolamento, identificação e investigação de propriedades biológicas (DYRAGER *et al.*, 2011, SILVA *et al.*, 2013).

As flavanonas (ou di-hidroflavonas), di-hidroflavonóis (ou flavanonóis ou 3-hidróxi-flavanonas) e di-hidrochalconas são os representantes da classe di-hidroflavonoides. Têm em comum uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 (ou α e β para as di-hidrochalconas) em seu núcleo fundamental (hidrogenado) ao contrário das outras classes de flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2004). A numeração é a mesma de seus isômeros: flavonas, flavonóis e chalconas. Pequenas modificações na molécula, sejam nas posições e/ou natureza dos açúcares ou outros substituintes no anel A e/ou B, podem produzir grandes alterações nas propriedades físicas (DORNAS *et al.*, 2007).

Flavanas, leucoantocianidinas e protantocianidinas fazem parte de uma classe de flavonoides, junto com os biflavonoides e mais recentemente os isoflavonoides, nos quais é possível encontrar estruturas oligomerizadas (SIMÕES *et al.*, 2004, D' ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Os isoflavonoides são caracterizados por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. Ao contrário das outras classes de flavonoides, sua distribuição é restrita. Nos vegetais, uma grande parte dos isoflavonoides comporta-se como fitoalexinas – substâncias produzidas pela planta em resposta a uma infecção por um agente patogênico. Os substituintes mais comuns são os grupamentos hidroxila, metoxila e metilenodioxila. Os mais consumidos na dieta são a genisteína e

daidzeína, encontrados na soja. As propriedades mais importantes dos isoflavonoides são: Atividade estrogênica das isoflavonas e cumestanos, atividades antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas) dos isoflavonoides e as propriedades inseticidas dos rotenoides (WISEMAN, 2006; DAVIES e SCHWINN, 2006).

Neoflavonoide é o nome usado para caracterizar um grupo de compostos de origem natural, que contém 15 átomos de carbono, que são associados estruturalmente e biogeneticamente aos flavonoides e isoflavonoides. São agrupados segundo suas estruturas e origem e os representantes mais comuns são as 4-arilcumarinas e as dalbergionas (BRAVO, 1998; SIMÕES *et al.*, 2004).

A maioria dos biflavonoides de ocorrência natural são dímeros de flavonas -raramente chalconas – apresentando substituintes nas posições dos carbonos 5, 7, 4' e mais raramente 5, 7, 3', 4'. Os monômeros podem ser iguais ou de diferentes tipos: flavona-flavona, flavanona-flavanona ou flavona-flavanona. Alguns grupamentos hidroxilas podem apresentar-se metoxilados e os heterosídeos são raros. São encontrados em grandes quantidades em diferentes plantas e em muitos tecidos vegetais. Têm como função mais importante a ação como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos e proteção contra os raios UV. São conhecidos também por sua atividade como estimulantes cardíacos e antiinflamatória (SIMÕES *et al.*, 2004, SUZART *et al.*, 2007).

A química dos flavonoides naturais é complicada devido ao fato da maioria dos compostos presentes nas plantas serem formas conjugadas, principalmente ligadas a uma ou mais oses por meio de um ou mais grupos fenólicos. Os heterosídeos são comumente solúveis em água, em alcoóis diluídos, contudo insolúveis nos solventes orgânicos habituais, enquanto que as agliconas são normalmente solúveis em solventes orgânicos apolares e por possuírem caráter fenólico, são solúveis em soluções aquosas alcalinas. Para extração utilizam-se solventes com polaridade crescente: a primeira extração, com solvente apolar, retira óleos, gorduras, esteróis e pigmentos facilitando a extração a extração posterior dos flavonoides. Uma segunda extração com solvente mais polar (clorofórmio,

diclorometano, acetato de etila ou éter etílico permite recuperar as agliconas livres pouco polares, como flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação. Com o aumento da polaridade do solvente (acetona, metanol, água) se extraem as agliconas poli-hidroxiladas, flavonas, flavonóis, catequinas, procianidinas, e os açúcares (SIMÕES *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterização de amostras brasileiras de pólen apícola desidratado, pelas análises de composição físico-química, origem bontânica, análises microbiológicas, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do pólen apícola desidratado de várias regiões do Brasil;
- Determinar as concentrações de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de regiões distintas do Brasil;
- Avaliar o potencial antioxidante de amostras brasileiras de pólen apícola desidratado; pelos métodos de DPPH, ORAC e oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoléico;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos EEP contra três microrganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*;
- Caracterizar o pólen apícola, com base na análise microscópica (polínica);
- Verificar a possível contribuição dos tipos de pólen presentes para o conteúdo dos compostos fenólicos e flavonoides, bem como para a atividade antioxidante e composição centesimal das amostras;
- Correlacionar a atividade antioxidante, com o conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais presentes nas amostras;
- Verificar a adequação das amostras analisadas frente aos parâmetros de qualidade estabelecidos pela Legislação Brasileira, para o pólen apícola;
- Contribuir com dados para a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos e também agregar valor a este produto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostragem

Foram adquiridas sessenta e duas amostras comerciais de pólen apícola (coletadas por abelhas *Apis mellifera*) desidratadas, provenientes do Distrito Federal e 8 estados brasileiros (Bahia, Espírito Santo, Sergipe, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso, Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul). A coleta ocorreu nos anos de 2009 a 2012. As amostras foram enviadas ao laboratório, em sacos plásticos, potes de plástico ou vidro. Após o recebimento as amostras foram mantidas em potes de vidro e armazenadas em freezer (- 18 °C) até o momento das análises.

A Tabela 7 mostra a origem das amostras de pólen apícola analisadas.

Tabela 7 - Localidades de origem do pólen apícola.

Amostras (Origem e Coleta)	Código
Bahia	BA 01 a BA 06
Sergipe	SE 01 a SE 11
Rio Grande do Norte	RN 01, RN 02
Espírito Santo	ES 01
São Paulo	SP 01 a SP 24
Distrito Federal	DF 01, DF 02
Mato Grosso	MT 01 a MT 03
Rio Grande do Sul	RS 01 a RS 05
Santa Catarina	SC 01 a SC 08

As Figuras 17 e 18 apresentam as amostras de pólen apícola desidratadas, utilizadas no presente estudo.

Figura 17 - Amostras de pólen apícola desidratadas.

Figura 18 - Amostras de pólen apícola desidratadas.

4.1.2 Padrões e reagentes

Foram utilizados os seguintes padrões e reagentes:

- AAPH 2,2' – azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato - Marca Sigma (440914);
- Acetato de potássio - Grau PA - Marca Synth;
- Acetonitrila - Grau HPLC - Marca Merck;
- Álcool Etílico - Grau PA - Marca Synth;
- BHT (butil hidroxitolueno) - Marca Sigma – (B1378);
- BHA (butil hidroxianisol) Marca Sigma – (20021);
- Carbonato de Sódio Grau PA - Marca Synth;
- Clorofórmio Grau PA - Marca Synth;
- Dihidrogenofosfato de sódio - Grau PA Marca Synth;
- DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) - Marca Sigma (D9132)
- Éter etílico Grau PA - Marca Synth;
- Ferrocianeto de Potássio Trihidratado - Grau PA - Marca Synth;
- Fluoresceína - Marca Sigma – (F6377);
- Hidrogenofosfato de di-sódio - Grau PA - Marca Synth;
- Hidróxido de sódio em lentilhas - Grau PA - Marca Synth;
- Padrão de Frutose - Marca Sigma (239704);
- Padrão de Glicose - Marca Sigma (49139);
- Padrão de Ácido Gálico - Marca Sigma (G7384);
- Padrão de Ácido linoléico - Marca Sigma (L 1376);
- Padrão de Quercetina - Marca Sigma (Q4951);
- Padrão de Trolox Marca - Marca Sigma (238813);
- Padrão de α -tocoferol - Marca Sigma (T3251);
- Padrão de β -caroteno - Marca Sigma (C9750);
- Nitrato de alumínio Grau PA Marca Synth;
- Reagente de Folin-Ciocalteu - Marca Sigma (F9252);
- Tween 40 (monopalmitato de polioxietilenossorbitana) - Marca Merck

- Sulfato de Zinco Heptahidratado Grau PA Marca Synth;

4.1.3 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos específicos:

- Agitador magnético – Marca Quimis;
- Agitador de tubos – Marca LS Logen;
- Balança analítica – Marca Shimadzu;
- Balança analítica – Marca Micronal (B160) acoplada com secador infravermelho Mettler Toledo (LP16);
- Centrifuga - Marca Hermle (Z323K);
- Centrifuga - Marca Eppendorf (5415 R);
- Extrator de lípidos Marca Tecnal;
- Phmetro – Marca Micronal (B 474);
- Banho - Maria – Marca Fisatom;
- Banho - Maria– Marca SL Logen;
- Freezer - Marca Prosdócimo;
- Lavadora Ultra-sônica – Marca Unique;
- Estufa – Marca Fanem;
- Bomba de vácuo – Marca Millipore;
- Destilador de Nitrogênio – Marca Tecnal;
- Mufla – Marca Quimis;
- Bloco Disgetor - Marca Quimis;
- Sistema de Água Ultrapura Milli-Q – Marca Millipore;
- Bomba isocrática para sistema HPLC Marca Shimadzu (LC-20AT);
- Amostrador automático para sistema HPLC (Autosampler SIL-20A) Marca Shimadzu;
- Detector de Índice de Refração para sistema HPLC (RID 10A) Marca Shimadzu;
- Forno para colunas - Marca Shimadzu (CTO-6A);
- Software LC-Solution para sistema HPLC Marca Shimadzu;

- Sistema CBM-20A (SCL-10Avp) Marca Shimadzu;
- Espectrofluorímetro - Marca Biotek (Synergi HT);
- Espectrofotômetro - Marca Shimadzu (UV 1650 PC);
- Controlador de temperatura- Marca Shimadzu;
- Moinho analítico - Marca Ika Werke (M20);
- Pipetadores automáticos - Marca Eppendorf.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das amostras:

As amostras desidratadas foram previamente homogeneizadas e trituradas em moinho analítico para a realização dos ensaios de caracterização.

4.2.2 Determinação da umidade:

A umidade das amostras foi determinada de acordo com o descrito por Cornejo (1994), Oliveira (2006), Melo e Almeida-Muradian (2011) e Arruda (2013b). Utilizou-se o método gravimétrico através da balança eletrônica de precisão Micronal (B160), adaptada com secador infravermelho Metler Toledo (LP16). Cerca de um grama da amostra triturada foi submetido à temperatura de 85°C na balança de infravermelho.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

4.2.3 Preparo dos extratos etanólicos de pólen (EEP)

Os extratos foram preparados de acordo com o descrito por Carpes *et al.*, (2007, 2008), com modificações. Carpes *et al.*, 2007, desenvolveram um estudo para preparo de extratos de pólen apícola com diferentes

concentrações de etanol (40 a 90%), concluindo que os extratos preparados com etanol a 70% obtiveram as melhores respostas para as propriedades biológicas. Neste trabalho os extratos foram testados para conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e antibacteriana.

Cerca dois gramas de amostra foram extraídos com 20 mL de etanol (70%), mantendo em banho-maria a 70°C, por 30 min com agitação constante. Após extração a solução foi submetida à filtração em papel de filtro, coletando-se os sobrenadantes (EEP) em balões volumétricos de 25 mL, onde os volumes foram completados com etanol (70%). Os extratos foram mantidos em freezer até o momento das análises.

4.2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão. Os EEP foram diluídos em água (1:25) e uma alíquota de 0,5 mL foi adicionada a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10). Em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4%. As leituras foram feitas após 2 h de incubação no escuro, em espectrofotômetro a 740 nm. Foi construída uma curva analítica de ácido gálico para cálculo dos resultados que foram expressos em mg GAE/g de pólen (GAE: equivalente em ácido gálico) conforme descrito por Carpes *et al.* (2008).

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

4.2.5 Determinação dos flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada através do método descrito por Park *et al.* (2004) e Carpes *et al.* (2008) que utiliza como padrão a quercetina com leituras em espectrofotômetro a 415 nm.

Os EEP foram inicialmente diluídos em água conforme necessário. Uma alíquota de 0,5mL de amostra foi transferida para um tubo de ensaio e, adicionado 4,3 mL de etanol a 80%, 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10% e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L. Após repouso durante 40 min as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco, utilizou-se um tubo sem adição de nitrato de alumínio. Construiu-se uma curva analítica de quercetina e os resultados foram expressos em mg quercetina/g de pólen apícola.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

4.2.6 Determinação da capacidade de seqüestrar o radical livre estável DPPH

A atividade antioxidante dos compostos presentes nos extratos de pólen apícola desidratado foi determinada por meio da capacidade seqüestrante do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil). A atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola foi avaliada usando uma serie de diluições, a fim de se obter dados para diferentes concentrações das amostras. Uma alíquota de 0,5 mL das soluções diluídas do EPE de cada concentração foi colocada num tubo de ensaio contendo 2 mL de etanol absoluto e 1,5 mL da solução etanólica do radical DPPH ($6,0 \times 10^{-5}$ M). O decréscimo na absorbância em 517 nm foi determinado em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu Co.) após 30 min de reação para todas as amostras e padrões. Os controles positivos BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol) e α -tocoferol foram avaliados nas mesmas condições das amostras e testados na concentração de 40 μ g/mL. Um tubo contendo 2,5 mL de etanol e 1,5 mL de DPPH ($6,0 \times 10^{-5}$ M) foi utilizado como controle negativo. O branco específico da amostra foi determinado usando 3,5 mL de etanol e 0,5 mL das soluções diluídas do EPE de cada concentração.

A atividade sequestrante do radical livre DPPH foi expressa em termos de EC_{50} (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH). Desta forma, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante dos compostos presentes.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

4.2.7 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoléico

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoléico, de acordo com o método modificado de Ahn *et al.*, (2004) e Carpes *et al.*, (2008). Foi preparada uma solução contendo 20 mg/mL de β -caroteno em clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 30 μ L da solução clorofórmio – β -caroteno e adicionada a 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40 (mono-palmitato de polioxietilenossorbitana). Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido foi redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 min. Alíquotas de 3 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 300 μ L do EPE diluídos 1:20 em etanol a 70%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 15 min durante 2 h com incubação a 50 °C, para a reação de oxidação. A amostra controle foi preparada com 300 μ L de etanol a 70%. Os controles positivos BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol) e α -tocoferol foram avaliados nas mesmas condições das amostras e testados na concentração de 40 μ g/mL. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, usando a equação:

$$AA = (DR\ C - DR\ S)/DRC \times 100$$

onde: AA representa a atividade antioxidante,

DRC a taxa de degradação da amostra controle ($=\ln(a/b)/120$);

DR_S a taxa de degradação da amostra contendo a substância teste ($=\ln(a/b)/120$);

a sendo a absorbância inicial no tempo 0 e

b a absorbância depois de 120 min, em 470 nm.

4.2.8 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC_{FL}

Para avaliação da capacidade antioxidante das amostras foi utilizado o ensaio de ORAC descrito por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) e Huang *et al.*, (2002), Huang, Ou e Prior (2005). Aos extratos das amostras contendo os compostos antioxidantes foram adicionadas as soluções de fluoresceína e AAPH 2,2' – azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato. O AAPH é um gerador de radical livre (radical peroxila) que reage com a fluoresceína, inibindo a sua fluorescência. A capacidade antioxidante da amostra foi obtida a partir da medida de intensidade de fluorescência. A presença de compostos inibe o decaimento da fluoresceína.

Para o ensaio da atividade antioxidante os EPE, foram adequadamente diluídos com tampão fosfato dependendo das leituras observadas.

Montagem das placas do fluorímetro (leitora de placas Synergy HT – Bio Tek Instruments)

Os poços da placa comportam 300 µL e os poços mais externos da placa foram preenchidos inicialmente com 300 µL de água destilada, a fim de manter o equilíbrio térmico das amostras dos demais poços. Os três primeiros poços foram preenchidos com 25 µL de tampão fosfato (branco) e os demais, com 25 µL das diluições dos extratos. A placa foi colocada na leitora do equipamento e foram injetados automaticamente 150 µL de

fluoresceína, seguido de repouso durante 30 minutos. Após esse período foram injetados 25 µL da solução de AAPH para dar início à reação. Juntamente com as amostras foi efetuada uma curva padrão com Trolox® (25 µL). O volume final da reação foi de 200 µL. A fluoresceína foi monitorada a cada minuto durante 1 hora. A temperatura de trabalho foi de 37 °C. Foi utilizado um comprimento de excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20).

Cálculos: Foi determinada a área debaixo da curva da amostra e subtraída a área correspondente ao branco. O mesmo cálculo foi realizado com a curva do Trolox. A área sob da curva (AUC) foi calculada utilizando-se a seguinte expressão:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=50} f_i / f_0$$

Onde: f_0 = leitura da fluorescência inicial no tempo zero

f_i é a leitura da fluorescência depois de i

A unidade de ORAC equivale à proteção contra a oxidação oferecida por 1 µmol de Trolox.

Os valores de ORAC foram expressos em µmoles equivalentes de Trolox por grama de amostra, usando as respectivas diluições e a equação da reta calculada a partir da curva padrão de Trolox.

Interpretação dos dados: a manutenção da fluorescência durante a reação indica (tempo de lag) que ela não foi consumida pelos peróxidos devido à presença de antioxidantes e por consequência haverá aumento da área sob a curva de decaimento.

4.2.9 Análise polínica (microscópica)

A análise polínica foi realizada em trabalho colaborativo com os especialistas da área Profa. Dra. Ortrud Monika Barth e Alex da Silva Freitas, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, e Departamento de Geologia, UFRJ, Rio de Janeiro), seguindo a metodologia descrita por Barth *et. al.*, (2010).

Preparo das amostras de pólen apícola

Foram pesados dois gramas de pólen apícola seco por amostra bem misturada (cerca de 300 bolotas, dependendo do tamanho). O material selecionado foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL de capacidade e foram adicionados 10 mL de álcool etílico a 70%. As amostras ficaram em repouso por cerca de 30 min. Em seguida as bolotas foram maceradas, homogeneizadas utilizando-se ultrassom por 5 minutos e centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm. Para amostras que apresentaram uma grande concentração de óleos, utilizou-se nova extração em álcool 70%. O sobrenadante foi descartado e os tubos ficaram invertidos por cerca de 30 segundos antes de retornar à posição normal. Ao final, foram adicionados ao sedimento 5 mL de água glicerizada (solução de 1:1 de água destilada e glicerol) ficando em repouso por 30 minutos.

Preparo das lâminas para microscopia

O sedimento do fundo do tubo de centrífuga foi ressuspendido e homogeneizado com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável. Foi coletada uma gota do material, acondicionada em uma lâmina de microscopia e coberta com uma lamínula de 22x22 mm. A lamínula foi vedada com esmalte sendo as lâminas posteriormente etiquetadas e observadas em microscópio de luz fotônica. Após a preparação das

lâminas, parte do material restante foi armazenado em tubos Eppendorf de 1,5 mL capacidade e recoberto com glicerol p.a.

Os tipos polínicos foram identificados por comparação com a literatura (BARTH 1989, MORETI *et al.*, 2002, ROUBIK e MORENO 1991). Foram contados sucessivamente mais de 300 grãos de pólen por amostra para o cálculo das porcentagens de cada um dos tipos polínicos e agrupados segundo os seguintes critérios internacionais (LOUVEAUX *et al.*, 1978):

- Pólen dominante (PD)- mais de 45% do total de grãos de pólen contados
- Pólen acessório (PA)- de 16 a 45%
- Pólen isolado (PI)- até 15%, subdividido em:
 - Pólen isolado importante (PII): 3 a 15%
 - Pólen isolado ocasional (PIO): menos de 3%.

Foram consideradas como monoflorais amostras que apresentaram tipo de pólen em porcentagem superior a 90%.

4.2.10 Determinação do nitrogênio total - proteínas:

Foi determinada através do método Micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para conversão do nitrogênio total em proteínas (AOAC, 1995; ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO 2007; ALMEIDA-MURADIAN, ARRUDA e BARRETO, 2012; ARRUDA *et al.*, 2013a).

4.2.11 Determinação do extrato etéreo - lipídeos:

Foi determinada em extrator intermitente de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO 2007; ALMEIDA-MURADIAN, ARRUDA e BARRETO, 2012, , ARRUDA *et al.*, 2013a).

4.2.12 Determinação do resíduo mineral fixo - cinzas:

Foi realizada por gravimetria após incineração do material em mufla a 550°C, até peso constante (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO 2007; ALMEIDA-MURADIAN, ARRUDA e BARRETO, 2012, , ARRUDA *et al.*, 2013a).

4.2.13 Determinação de glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (CLAE)

A extração e determinação dos açúcares foram realizadas conforme descrito por Burgner e Feinberg (1992) e Martins *et al.*, (2011), em banho-maria com tempo e temperatura controlados e, através de padronização externa. O procedimento está descrito a seguir:

- Pesar cerca de 2,5 g de amostra triturada em erlenmeyer;
- Adicionar cerca de 30 mL de água a 40°C;
- Manter em banho-maria sob fervura (60 °C) por 15 minutos, com agitação constante;
- Ainda no banho-maria sob fervura (60 °C), sob agitação constante, adicionar 2 mL de cada solução Carrez I e II, respectivamente;
- Resfriar à temperatura ambiente;
- Transferir para balão volumétrico de 50 mL, com água deionizada;
- Filtrar sobre papel de filtro;
- Filtrar sobre membrana 0,45 µm e injetar no cromatógrafo.

Condições cromatográficas para a análise de açúcares em pólen apícola:

- Fase móvel: Acetonitrila e água (85:15)
- Fluxo: 1 mL/min;
- Volume de injeção : 20 µL;
- Coluna: NH₂ de fase normal 5 µm / 250x 4.6 mm com pré-coluna 5 µm / 10x4.6mm
- Detector de índice de refração (RID);
- Temperatura: 40°C.

4.2.14 Validação do método cromatográfico para determinação de Glicose e Frutose**4.2.14.1 Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analíto, dentro de uma faixa de trabalho, onde se inserem as respostas das amostras (RIBANI *et al.*, 2004). Tal habilidade pode ser representada pela equação de reta:

$$y = ax + b$$

onde: y = resposta medida;

x = concentração do analíto;

a = indica a inclinação da reta;

b = inteseção.

Para se determinar a linearidade do método foram medidos 6 níveis de concentrações diferentes de padrão em triplicata. Construiu-se o gráfico de concentração padrão x resposta, calculou-se a regressão linear utilizando-se todos os dados obtidos e o resultado foi avaliado. O parâmetro usado para avaliar a correlação da linearidade dos valores foi o coeficiente de correlação (r) que tem como valor ideal 1, indicando uma

relação perfeita. Assim a linearidade da curva de calibração e o intervalo de trabalho do método, foram determinados pelo coeficiente de correlação da reta obtida, também nomeado índice de correlação de Pearson (RIEDER *et. al.*, 2000), considerando que:

$r = 1$, correlação perfeita;
 $0,91 < r < 0,99$, correlação fortíssima;
 $0,61 < r < 0,91$, correlação forte;
 $0,31 < r < 0,60$, correlação média;
 $0,01 < r < 0,30$, correlação fraca;
 $r = \text{zero}$, correlação nula.

4.2.14.2 Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito em que é possível demonstrar a determinação com exatidão, precisão e linearidade exigidas, sob as condições específicas para o ensaio (INMETRO, 2003). A faixa linear de trabalho foi definida através do estudo de linearidade.

4.2.14.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo método (RIBANI *et al.*, 2004). O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada, com exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI *et al.*, 2004). O limite de detecção pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). A determinação do limite de detecção do método foi calculada empregando-se o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que utiliza o coeficiente linear (s) da

equação de regressão linear e o coeficiente angular (S), equações apresentadas na Figura 19.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \qquad LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Figura 19 - Equações para cálculo dos Limites de Quantificação e Detecção dos métodos baseado no coeficiente linear (s) da equação de regressão linear e coeficiente angular (S) da curva analítica para determinação dos açúcares glicose e frutose.

4.2.14.4 Exatidão (Teste de recuperação)

A exatidão é o parâmetro da validação que expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor real do analito (LANÇAS, 2004). Foram efetuadas 9 determinações de padrão adicionado em três níveis de concentração (50; 75 e 100 % da concentração esperada para a matriz). A amostra foi submetida ao mesmo processo de extração para determinação da vitamina. Calculou-se recuperação média e seu desvio padrão.

4.2.15. Atividade antimicrobiana:

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho.

As amostras foram testadas contra: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*. Os microrganismos foram isolados a partir de fluidos biológicos no Centro Hospitalar do Nordeste e identificados no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança. Os microrganismos isolados foram mantidos em meio Muller-Hinton adicionado de glicerol a 20% a 70 °C. Antes de efetuar os ensaios, as culturas foram

transferidas para meio sólido e incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas. Posteriormente foram subcultivadas em meio líquido, incubadas e utilizadas como inóculo nas várias experiências. O inóculo para os ensaios foi preparado diluindo-se as culturas numa solução de NaCl a 0,85%, ajustado para 0,5 (escala MacFarland), a leitura espectrofotométrica foi efetuada a 580 nm e 640 nm respectivamente para as bactérias e leveduras.

A atividade antimicrobiana foi efetuada de acordo com o descrito por Duarte *et al.*, (2007) e Moraes *et al.*, (2011) utilizando caldo nutritivo (NB) ou extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) em microplacas (96 poços). Os extratos etanólicos de pólen apícola foram diluídos a concentrações adequadas e conhecidas em DMSO a 20% e transferidos para o primeiro poço, em seguida foram realizadas diluições seriadas de modo a obter uma concentração decrescente do extrato da amostra, posteriormente adicionou-se 20 µL do inóculo a cada um dos poços. As placas foram seladas com um filme respirável (*sealing film* BF- 4005) e incubadas a 37 °C durante 24 h (bactérias) e durante 48 h (leveduras). Foram utilizados fluconazol e gentamicina como controle. Em cada experimento foi utilizado um controle positivo (meio inoculado) e um controle negativo (somente o meio de cultura). A atividade antimicrobiana foi determinada pela adição de 20 µL de uma solução de TTC (Cloreto de trifetil tetrazólio) a 0,5%. As microplacas foram reincubadas por mais 3 horas à mesma temperatura e por fim, observou-se visivelmente a mudança de cor. A concentração mínima inibitória (CMI) define-se como a concentração do extrato mínima capaz de impedir o crescimento do microrganismo e conseqüentemente, o aparecimento de coloração rosa (células mortas não são coradas pelo TCC).

4.2.16 Análise microbiológica

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho.

Em virtude da inexistência de parâmetros microbiológicos específicos para o pólen apícola, tanto na Instrução Normativa nº. 03, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2001), que estabelece o Regulamento Técnico para Fixação de identidade e Qualidade dos produtos apícolas, foram quantificados e/ou pesquisados os microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli* e esporos de clostrídios sulfitos redutores.

As análises microbiológicas foram efetuadas de acordo com as Normas ISO e os procedimentos recomendados pela American Public Health Association (APHA) Compendium for Microbiological Analysis of Foods (DOWNES e ITO, 2001).

4.2.17 Tratamento Estatístico dos Dados:

As comparações entre as regiões de coleta foram realizadas pela Análise de Variância Unidimensional (One-way ANOVA) seguidas pelo teste de Tukey. Somente para os resultados da qualidade sanitária foram utilizados testes Kruskal-Wallis, seguidos de comparações múltiplas não paramétricas de Dumm identificando a existência de diferenças ($p < 0,05$) (NETER, *et. al.*, 1996).

A existência de associação entre as variáveis: composição físico-química, propriedades biológicas, atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se as correlação de Pearson. Para a qualidade sanitária (bolores

e leveduras, aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E.coli*, clostrídios sulfito redutores e *S.aureus*.), foi utilizada a correlação de Spearman devido a grande discrepância entre os resultados das amostras ($p < 0,05$) (KIRKWOOD e STERNE, 2006).

Para verificar possíveis contribuições dos tipos polínicos para a composição físico-química (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos), qualidade sanitária (bolores e leveduras, aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E.coli*, clostrídios sulfito redutores e *S.aureus*.), propriedades biológicas (compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante - DPPH, sistema β -caroteno e ORAC) e atividade antimicrobiana (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) foi utilizada a correlação de Spearman.

Adoto-se o coeficiente de correlação (r) como parâmetro para avaliar a natureza das correlações (diretamente ou inversamente proporcionais) e a intensidade dessas correlações (0 a 1, sendo 1 indicativo de correlação máxima). Valores de r entre 0,2 e 0,5 indicam correlação fraca, entre 0,5 e 0,7, moderada, e maior que 0,8 correlação forte (DORIA, 1999).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise polínica

A análise polínica permite identificar as principais fontes poliníferas utilizadas pelas abelhas, bem como os períodos de produção de pólen no campo e possíveis épocas de carência, além da caracterização do pasto apícola de determinada região geográfica (MORETI *et al.*, 2002; SEIJO, AIRA e IGLESIAS, 1992).

Pela análise palinológica observou-se a grande variedade de plantas que foram utilizadas pelas abelhas como fonte polinífera, totalizando 36 tipos de pólen diferentes identificados dentre os quais se destacaram *Cocos nucifera*, *Mimosa scabrella* (Benth.), *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Asteraceae*, *Poaceae*, *Euphorbiaceae* e *Brassica sp.* que ocorreram com maior frequência entre as amostras. Somente 6 amostras apresentaram um único tipo de pólen em contagem superior a 90% do total da soma de grãos, incluindo *Ambrosia sp.*, *Cecropia sp.*, *Eucalyptus sp.*, *Fabaceae*, *Mimosa scabrella* (Benth.) spp. e *Schinus sp.*, sendo consideradas como pólen apícola monofloral.

A Tabela 8 apresenta os tipos de pólen identificados, o número e a porcentagem de amostras em que a origem floral ocorreu.

Tabela 8 - Frequência dos tipos de pólen nas amostras de pólen apícola desidratado.

Família Gênero/Espécie	Número de Amostras	% de amostras
<i>Alternanthera</i>	1	1,6
<i>Amaranthus</i> / <i>Chenopodiaceae</i>	3	4,8
<i>Ambrosia</i>	1	1,6
<i>Antigonon leptopus</i>	2	3,2
<i>Anadenanthera</i>	3	4,8
<i>Apiaceae</i>	1	1,6
<i>Asteraceae</i>	23	37,1
<i>Arecaceae</i>	2	3,2
<i>Brassica</i>	9	14,5
<i>Brassica napus</i>	1	1,6
<i>Caesalpinjiaceae</i>	1	1,6
<i>Caryophyllaceae</i>	1	1,6
<i>Cecropia</i>	12	19,4
<i>Cocos nucifera</i>	26	41,9
<i>Eucalyptus</i>	15	24,2
<i>Eupatorium</i>	1	1,6
<i>Euphorbiaceae</i>	10	16,1
<i>Fabaceae</i> Faboideae espécie 1	2	3,2
<i>Fabaceae</i>	1	1,6
<i>Illex</i>	4	6,5
<i>Malpighiaceae</i>	1	1,6
<i>Melastomataceae</i>	1	1,6
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	16	25,8
<i>Mimosa scabrella</i>	14	22,6
<i>Mimosa verrucosa</i>	7	11,3
<i>Myrcia</i>	24	38,7
<i>Não identificados</i>	1	1,6
<i>Onagraceae</i>	2	3,2
<i>Poaceae</i>	12	19,4
<i>Persea</i>	1	1,6
<i>Richardia</i>	1	1,6
<i>Schinus</i>	3	4,8
<i>Sebastiania</i>	2	3,2
<i>Syagrus</i>	1	1,6
<i>Tapirira</i>	3	4,8
<i>Vernonia</i>	2	3,2

As Tabelas 9, 10, 11, 12 apresentam as porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 9 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Nordeste do Brasil.

Família		Frequência (%)*																		
Gênero / Espécie (Nome Vulgar)	BA 01	BA 02	BA 03	BA 04	BA 05	BA 06	SE 01	SE 02	SE 03	SE 04	SE 05	SE 06	SE 07	SE 08	SE 09	SE 10	SE 11	RN 01	RN 02	
Σ Asteraceae (asteráceas)				6,7 (Pli)	81,5 (PD)															
Brassica (couve, colza, mostarda)															20,3 (PA)		14,8 (Pli)			
Cecropia (embaúba)					6,4 (Pli)															
Cocos nucifera (coqueiro)	67,6 (PD)	41,0 (PA)	76,3 (PD)	32,7 (PA)	4,5 (Pli)		35,4(PA)	3,5 (Pli)	17,2 (PA)	47,5 (PD)	41,1 (PA)	35,4 (PA)	41,3 (PA)	36,8 (PA)	35,1 (PA)	53,3 (PD)	29,3 (PA)	60,2 (PD)	47,2 (PD)	
Eucalyptus (eucalipto)	31,3 (PA)		5,3 (Pli)																25,0 (PA)	
Mimosa caesalpiniaefolia (sabiá)													50,1 (PD)	15,7 (PA)					6,4 (Pli)	
Mimosa scabrella (bracatinga)		59,0 (PD)	18,4 (PA)	58,3 (PD)	5,3 (Pli)	85,5 (PD)	42,1(PA)		25,3 (PA)	23,2 (PA)									3,7 (Pli)	
Mimosa verrucosa (jurema-branca)										50,7 (PD)	42,8 (PA)		39,7 (PA)	16,5 (PA)	39,9 (PA)	56,0 (PD)	36,0 (PA)			
Myrcia (murta)							17,5 (PA)	67,0 (PD)	55,5 (PD)	23,2 (PA)		16,3 (PA)	5,7 (Pli)	7,8 (Pli)	18,6 (PA)	3,8 (Pli)			5,2 (Pli)	
Poaceae (milho, trigo, aveia, cana-de-açúcar)											8,0 (Pli)									
Richardia (Erva-bolão, poala)																			3,2 (Pli)	
Vernonia (assa-peixe)					6,9 (Pli)															
Tapirira (tapiriri, aroeirana)												5,4 (Pli)			9,4 (Pli)					

* PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%); Pli = pólen isolado importante (de 3% a 15%).

Tabela 10 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Sudeste do Brasil.

Família		Frequência (%)*																							
Gênero /Espécie (Nome Vulgar)	ES 01	SP 01	SP 02	SP 03	SP 04	SP 05	SP 06	SP 07	SP 08	SP 09	SP 10	SP 11	SP 12	SP 13	SP 14	SP 15	SP 16	SP 17	SP 18	SP 19	SP 20	SP 21	SP 22	SP 23	SP 24
<i>Antigonon leptopus</i> (Cipó-coral)																									
<i>Alternanthera</i> (quebra-panela)																					34,6 (PA)				
<i>Anadenanthera</i> (angico)																						18,6 (PA)		82,5 (PD)	33,9 (PA)
ΣAsteraceae (asteráceas)			5,3 (Pli)	5,8 (Pli)	7,0 (Pli)	26,80	17,60	11,60		4,7 (Pli)	12,9 (Pli)	15,60					68,3 (PD)	58,2 (PD)				3,0 (Pli)	3,5 (Pli)		
<i>Areceaceae</i> (pálmeiras)																									
<i>Cecropia</i> (embaúba)							12,1 (Pli)									16,4 (PA)		23,9 (PA)		7,3 (Pli)		6,9 (Pli)		5,7 (Pli)	43,2 (PD)
<i>Cocos nucifera</i> (coqueiro)																									
<i>Eucalyptus</i> (eucalipto)																									
<i>Euphorbiaceae</i> (mamona)		3,1 (Pli)																							
			81,2 (PD)	78,3 (PD)	57,7 (PD)																				
							</																		

* PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%); Pli = pólen isolado importante (de 3% a 15%).

Tabela 11 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Sul do Brasil.

Família	Frequência (%)*													
	Gênero / Espécie (Nome Vulgar)	SC01	SC02	SC03	SC04	SC05	SC06	SC07	SC08	RS01	RS02	RS03	RS04	RS05
Ambrosia (ambrosia)											99,4 (PD)			
Amaranthus / Chenopodiaceae	3,3 (Pli)					6,7 (Pli)	4,7 (Pli)							
Apiaceae (salsa, cenoura)								8,5 (Pli)						
ΣAsteraceae (asteráceas)	54,2 (PD)	76,2 (PD)	56,3 (PD)	71,8 (PD)	56,7 (PD)	50,0 (PD)	11,8 (Pli)	13,6 (Pli)	7,0 (Pli)				4,6 (Pli)	
Brassica (couve, colza, mostarda)	36,4 (PA)	20,0 (PA)	35,6 (PA)	19,7 (PA)	23,3 (PA)	18,7 (PA)						57,4 (PD)		35,3 (PA)
Brassica napus (couve-nabo, nabiça)														
Caesalpinaceae (pata-de-vaca)								63,1 (PD)						
Caryophyllaceae (erva-moleira)						4,7 (Pli)								
Cecropia (embaúba)														
Eucalyptus (eucalipto)										93,0 (PD)		42,6 (PA)	49,9 (PD)	64,6 (PD)
Eupatorium (erva de santa cruz)													24,5 (PA)	
Euphorbiaceae (mamoeiro)	3,6 (Pli)		6,1 (Pli)	7,0 (Pli)	10,0 (Pli)	26,6 (PA)								
Illex (mate)													6,5 (Pli)	
Mimosa caesalpiniaefolia (sabiá)								85,2 (PD)						
Myrcia (murta)									3,8 (Pli)				4,1 (Pli)	
Onagraceae (brinco de princesa)														10,1 (Pli)
Poaceae (milho, trigo, aveia)						3,3 (Pli)								
Sebastiania (branquillo)														9,5 (Pli)

* PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%); Pli = pólen isolado importante (de 3% a 15%).

Tabela 12 - Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado, produzidas no Centro-Oeste do Brasil.

Gênero / Espécie (Nome Vulgar)	Família				
	Frequencia (%)*				
	MT01	MT02	MT03	DF 01	DF 02
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> (sabiá)					39,5 (PA)
<i>Mimosa verrucosa</i> (jurema-branca)					41,7 (PA)
<i>Cocos nucifera</i> (coqueiro)					13,5 (Pli)
<i>Eucalyptus</i> (eucalipto)				4,8 (Pli)	3,15 (Pli)
<i>Cecropia</i> (embaúba)	66,6 (PD)	97,0 (PD)	51,3 (PD)	3,2 (Pli)	
<i>Schinus</i> (aroeira)				92,1 (PD)	
<i>Poaceae</i> (milho, trigo, aveia)	6,7 (Pli)		44,3 (PA)		
<i>Euphorbiaceae</i> (mamoeiro)	26,7 (PA)	3,00 (Pli)			

* PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%);

Pli = pólen isolado importante (de 3% a 15%).

A Figura 20 apresenta fotos de tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado.

Fotos: Monika Barth

Figura 20 - Tipos polínicos encontrados nas amostras desidratadas de pólen apícola
 a) *Schinus*, b) *Ambrosia*, c) Fabaceae-Faibodeae, d) *Eucaliptus*, e) Caesalpinaceae,
 f) Fabaceae-Mimosoideae, g) *Mimosa caesalpiniaefolia*, h) *Mimosa verrucosa*,
 i) *Anadenanthera*, j) *Brassica*, k) *Cocos nucifera*, l) *Myrcia*.

Cocos nucifera é típico na região Nordeste brasileira ($n = 18$), e geralmente os tipos polínicos *Mimosa caesalpiniaefolia* ($n = 3$), *Mimosa scabrella* ($n = 8$) e *M. verrucosa* ($n = 6$) também foram frequentes. O pólen de Asteraceae foi mal representado nas amostras desta região.

Os tipos polínicos *Mimosa caesalpiniaefolia* (SE 07), *Mimosa scabrella* (BA 02, BA 05), *Mimosa verrucosa* (SE 05, SE 06, SE 08, SE 10), e *Myrcia* (SE 02, SE 03), também foram dominantes na região Nordeste.

Os principais tipos polínicos presentes nas amostras provenientes da região Sudeste foram Σ Asteraceae e *Myrcia* ($n = 11/25$ de cada uma),

tais como *Mimosa caesalpiniaefolia* (n = 12/25). Os tipos polínicos característicos da região Sul (n = 13) foram Σ Astraceae (n = 10/13) e *Brassica* (n = 8/13).

As nove amostras coletadas na cidade de Paríquera Açu, no estado de São Paulo apresentaram *Cocos nucifera*, sendo o perfil polínico de todas elas idêntico.

As amostras produzidas no município de Ribeirão Preto apresentaram percentuais de pólen dominante de *Mimosa caesalpiniaefolia* em seis amostras (SP 10, SP 11, SP 12, SP 13 e SP 14).

Ainda em São Paulo, *Schinus* foi o principal tipo polínico em duas amostras (SP 16, SP 18), e *Anadenanthera* apenas em uma amostra (SP 19). As outras duas amostras (SP 17, SP 20) não apresentaram tipos polínicos dominantes, no entanto estavam presentes em todas elas os tipos polínicos *Anadenanthera*, *Eucalyptus*, *Myrcia* e *Cecropia*. O pólen do tipo *Persea* (abacateiro) foi observado apenas em uma amostra (SP 17).

Nas amostras do município de Taubaté (SP) estavam presentes os tipos polínicos *Mimosa caesalpiniaefolia* (SP 21, SP 23) e *Mimosa scabrella* (SP 22, SP 24). A amostra SP 24 foi classificada como monofloral.

As amostras coletadas na cidade de Fraiburgo (SC 01, SC 02, SC 03, SC 04, SC 05, SC 06) foram todas muito semelhantes, apresentando elevada porcentagem Asteraceae, *Amaranthus*/Chenopodiaceae, *Brassica* e Euphorbiaceae.

A única amostra de pólen desidratado proveniente do Espírito Santo foi classificada como monofloral de uma planta não-identificada da subfamília Fabaceae-Faboideae.

O pólen de Caesalpiniaceae foi dominante nas amostras provenientes do município de Campos Novos (SC 07) e *Mimosa caesalpiniaefolia* na Serra Catarinense (SC 08).

O tipo polínico *Eucalyptus* foi dominante nas amostras coletadas nos municípios de Arvorezinha (Sul 04), Santana do Livramento (RS 02) e São Gabriel (RS 05). O tipo polínico *Ambrosia* ocorreu em uma amostra de

Santana do Livramento (RS 01), e *Brassica* na amostra de Cruz Alta (RS 03), ambos classificados como pólen monofloral.

O tipo polínico *Ambrosia* foi característico do Rio Grande do Sul.

Uma das amostra produzida no Distrito Federal foi caracterizada como monofloral, tendo dominancia do tipo polínico *Schinus* (DF 01). As três amostras do Sinop, no estado de Mato Grosso apresentaram *Cecropia* como tipo polínico dominante e, uma delas (MT 02) também foi considerada como pólen monofloral. O tipo de pólen, *Cecropia*, é comum da região do estado de Mato Grosso do Sul.

Entre as poucas amostras do Centro-Oeste (n = 4), *Cecropia* (n = 4) foi detectada em todas as amostras e, em uma amostra classificada como pólen monofloral, o tipo polínico *Schinus* (n = 1) também.

O coqueiro, *Cocos nucifera* que é um dos mais importantes cultivos frutíferos do Nordeste do Brasil em termos econômicos (FERREIRA, WARWICK e SIQUEIRA, 1998; VIANA *et al.*, 2007), esteve presente em 18 amostras provenientes dessa região além de ter ocorrido em 41,9 % do total de amostras analisadas, com frequência acima de 3%. Apareceu como pólen dominante em seis amostras (> 45%), como pólen acessório em 11 amostras e como pólen isolado em duas amostras. *Cocus nucifera* foi relatado por Aires e Freitas (2001) e por Sodré *et al.*, (2007) em méis do Ceará.

O Brasil possui cerca de 287 mil hectares cultivados com coqueiros, distribuídos, praticamente, em quase todo o território nacional. As maiores plantações encontram-se na faixa litorânea do Nordeste. Atualmente, o país é o quarto maior produtor mundial com uma produção aproximada de 2,8 milhões de toneladas, esta condição de destaque do Brasil no cenário mundial de produção de coco se destaca ainda mais quando comparada aos países da América do Sul, região na qual a produção brasileira é responsável por mais de 80% (MARTINS e JESUS JUNIOR, 2011; PIRES *et al.*, 2004).

O sabiá, *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth, ocorre naturalmente em áreas da caatinga de vários estados da região Nordeste. A árvore apresenta características ornamentais, e sua madeira é apropriada para

usos externos, como mourões, estacas, postes, lenha e para carvão. É utilizada como forragem na alimentação de animais, para a recuperação de áreas degradadas e proteção de solos contra a erosão (CALLOU *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2004). Destaca-se entre diversas espécies nativas de interesse forrageiro e ainda pelo seu potencial madeireiro, bem como por apresentar resistência a seca (DRUMOND *et al.*, 2004). A planta apresenta grande diversidade morfológica (LIMA *et al.*, 2008), sendo bastante procurada por animais em pastejo (VIEIRA *et al.*, 2005). O potencial alelopático do extrato das folhas da *Mimosa caesalpinifolia* promoveram o retardamento e inibição da germinação de sementes do ipê-amarelo (PIÑA-RODRIGUES e LOPES, 2001). Callou *et al.*, 2012, avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos da casca de sabiá produzidos com diferentes solventes confirmando o potencial dos extratos para a possível utilização da planta como indicação terapêutica além de forte inibição do crescimento de microrganismos (CMI) em se tratando de extrato de planta. O tipo *Mimosa caesalpinifolia* esteve presente em 25 % das amostras analisadas. Barth (1989) mencionou que o pólen de *Mimosaceae* é comum em amostras de méis do Nordeste. Luz, Tomé e Barth (2007) e Sodré *et al.*, (2007) encontram *Mimosa caesalpinifolia* em méis do Rio de Janeiro e do Ceará respectivamente. Novais, Lima e Santos (2010) avaliaram amostras de pólen da Bahia relatando a ocorrência do pólen de *Mimosa*.

Mimosa scabrella, conhecida popularmente como bracatinga é característica da mata de pinhais, nativa dos climas mais frios do Brasil. Resistentes as geadas, as folhas da bracatinga são usadas para consumo animal, principalmente no inverno, quando os pastos ficam secos. É uma espécie indicada para utilização como lenha e carvão na alimentação de fornos caseiros em centros rurais e pequenas indústrias. Ocorre naturalmente nos estados de Minas Gerais, até o Rio Grande do Sul, com predominância nos estados de Santa Catarina e Paraná. A espécie é fornecedora de néctar e pólen durante o inverno tornando desnecessária a alimentação artificial das colônias de abelhas (EMBRAPA, 1988). *Mimosa scabrella* é uma espécie importante na recuperação florestal e de solos

degradados. Recobrando rapidamente o solo nu, a bracatinga inibe a invasão de vegetação herbáceo-arbustiva e favorece o crescimento de espécies tolerantes ao sombreamento, procedimento bastante utilizado no Sul do País para recuperação de áreas de mineração, onde o solo se encontrava profundamente degradado (CARPANEZZI, PAGANO e BAGGIO 1997; CARPANEZZI, IVANCHECHEN e LISBÃO 1984). Segundo Carpanezi, Pagano e Baggio (1984) a deposição da biomassa da bracatinga retorna ao solo mais de 200 kg de nitrogênio e 15 kg de potássio por hectare por ano. Entretanto o tipo *Mimosa scabrella* esteve presente em 22 % das amostras analisadas, ocorrendo como pólen dominante em duas das amostras produzidas na Bahia e também como polen acessório e isolado em amostras no Rio Grande do Norte e Sergipe. Barth (1970), analisando amostras de méis produzidos na Bahia também encontrou o pólen de *Mimosa scabrella*. Luz, Tomé e Barth (2007) e Sodré *et al.*, (2007) encontram *Mimosa scabrella* em méis do Rio de Janeiro e do Ceará respectivamente.

O gênero *Eucalyptus* compreende um grande número de espécies, com madeiras de características físico-mecânicas e estéticas bastante diferenciadas, o que permite a substituição de várias espécies latifoliadas nativas. No entanto, poucas espécies têm sido plantadas em escala comercial (PEREIRA *et al.*, 2000). O tipo polínico eucaliptus esteve presente em 24 % das amostras, ocorrendo como dominante em amostras provenientes da região sul do Brasil. O pólen de eucaliptus é frequentemente relatado em trabalhos com productos apícolas (CAMPOS, 1997; CARVALHO, MARCHINI e ROS, 1999, CARVALHO *et al.*, 2000; MORETTI *et al.*, 2000; LUZ, TOMÉ e BARTH, 2007, CARPES *et al.*, 2009b, 2012).

As Myrtaceae brasileiras compreendem diversos gêneros de árvores e arbustos que são utilizados de forma ornamental ou para a produção comercial de frutos. Além da goiaba, pitanga e jabuticaba, outros espécimes podem ser potencialmente utilizados na fruticultura, devido à qualidade de suas frutas e adaptação a algumas condições de clima subtropical (CONCEIÇÃO e ARAGÃO, 2010). O gênero *Myrcia*, vem sendo

usado como adstringente, diurético e no tratamento de diabetes, diarreias, hipertensão, úlceras e hemorragias (FERREIRA *et al.*, 2006; BATISTA, *et al.*, 2011). Esse tipo polínico foi encontrado em amostras de pólen de quase todos os estados brasileiros (38,7% das amostras) tendo sido destacado por Barth (1989) como pólen acessório em amostras de mel provenientes da Bahia, por Arruda *et al.*, (2013a) e Melo *et al.*, (2009) como pólen dominante, acessório e isolado em amostras de pólen apícola do estado de São Paulo.

As espécies do gênero *Cecropia* apresentam-se largamente distribuídas na região Neotropical. Apresentam crescimento rápido e são abundantes em áreas perturbadas e em estágios iniciais de processos sucessionais (SANTOS, 2000; GODOY e TAKAKI, 2005). Esta é uma das espécies arbóreas mais abundantes na região do Cerrado, presente em clareiras e extensas áreas abertas, indicando sua importância ecológica em processos de sucessão, além de ser apropriada para reflorestamentos heterogêneos de áreas degradadas, devido ao seu rápido crescimento e por atrair dispersores de suas sementes, que normalmente são pássaros e morcegos (POTT e POTT, 1994; SANTOS, 2000; PASSOS e PASSAMANI, 2003; BOCCHESI, OLIVEIRA e LAURA, 2008). O tipo polínico *Cecropia* esteve presente em 19% das amostras avaliadas, aparecendo como pólen dominante nas amostras coletadas no Mato Grosso. Este gênero também foi observado por Boff *et al.* (2011) como tipo polínico acessório em bolotas de pólen analisados da região sul do Pantanal em Mato Grosso do Sul, por Modro *et al.*, (2007) como pólen acessório em amostras de Minas Gerais e por Arruda *et al.*, (2013a) e Melo *et al.*, (2009) como pólen acessório e isolado importante em amostras de pólen apícola do estado de São Paulo.

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de *habitats*, mas principalmente nas regiões

tropicais montanhosas na América do Sul (HATTORI e NAKAJIMA, 2008). No Brasil, a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies (BARROSO *et al.* 1991).

As plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros. Nos estudos de atividades biológicas destacam-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e antiinflamatórios (VERDI, BRIGHENTE e PIZZOLATTI, 2005). O pólen das asteraceas foi verificado em 37% das amostras estudadas, correndo nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil como pólen dominante, acessório e isolado. O tipo de pólen Asteraceae foi relatado por Modro *et al.*, (2007) em amostras de pólen apícola de Minas Gerais e por Carpes *et al.*, (2009b) como pólen acessório em amostras pólen apícola de Minas Gerais.

A família Poaceae é formada por cerca de 700 gêneros e 10.000 espécies que se distribuem amplamente em todas as regiões da Terra, muitas dessas espécies têm uma notável importância para a economia e alimentação humana (GPWG, 2001). Poaceae (Gramineae), representada por capins, bambus e cereais, constitui uma das principais famílias dentre as angiospermas. As gramíneas representam o componente básico de diversos ecossistemas terrestres, desempenhando papéis ecológicos diversos e contribuindo significativamente com a biodiversidade local. Ecossistemas savânicos tropicais, como o cerrado brasileiro e a Savana africana, caracterizam-se pelo estrato herbáceo composto por um tapete graminoso, que ocupa biomassa expressiva e é base da cadeia alimentar (VIANA e FILGUEIRAS, 2008). O tipo Poaceae foi encontrado em 19 % das amostras em estudo. Melo *et al.*, (2009) relataram a presença de Poaceae como pólen isolado em amostras de pólen apícola do estado de São Paulo.

A família Euphorbiaceae está representada nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta por um total de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação (BARROSO *et al.*, 1991). Tem

se destacado como uma família de importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular. Dentre as espécies sobressaem-se a seringueira (*Hevea sp.*), a mamona (*Ricinus communis*) e a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (BICALHO *et al.*, 2008; DEVILLA *et al.*, 2012; CAMARGO, 1985). O pólen de *Euphorbiaceae* esteve presente em 19% das amostras. Dórea, Novais e Santos (2010) e Carpes *et al.*, (2009b) relataram sua ocorrência em amostras de pólen apícola do sul da Bahia e do Paraná respectivamente.

A família Brassicaceae compreende aproximadamente 350 gêneros e 3000 espécies, distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões de clima temperado (MONSALVE, 2003). É a família botânica que abrange o maior número de plantas olerícolas, ocupando lugar proeminente na olericultura do centro-sul do Brasil (FILGUEIRA, 2000). O tipo de *Brassica* foi encontrado em 14% das amostras. *Brassica* refere-se a várias espécies de pólen, podem ser provenientes de culturas de plantio (*B. napus*) do Sul do Brasil (ROSA, BLOCHTEIN e LIMA, 2011), ou de espécies selvagens que ocorrem na vegetação de campo (MORETI *et al.* 2002) tendo sido identificadas como plantas de importância polinífera para *Apis mellifera* (MODRO *et al.*, 2011).

A partir dos dados aqui apresentados pôde-se ver a grande diversidade floral brasileira, observada pelos principais tipos polínicos identificados nas bolotas do pólen apícola. O pólen apícola é uma mistura de grãos de pólen de diferentes origens botânicas, cada uma sendo uma importante fonte de flavonoides na forma de glicosídeos (WIERMANN e VIETH, 1983) e, em algumas espécies, de ácidos hidroxicinâmicos (CAMPOS, 1997). Uma boa certificação e detalhamento sobre a origem botânica pode agregar maior valor comercial ao produto, além de provavelmente explicar a variação observada nas concentrações para os compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante. Campos *et al.*, (1997) relatam que os compostos apresentam perfil espécie-específicos o que sugere que, pólenes coletados pelas abelhas a partir de diferentes áreas ou estações distintas poderiam ter diferentes propriedades bioativas.

5.2 Composição físico-química das amostras de pólen apícola desidratado:

A Tabela13 apresenta os dados obtidos para a composição centesimal e os açúcares frutose e glicose para as amostras de pólen apícola desidratado analisadas, assim como os valores preconizados pelas legislações brasileira, argentina e francesa.

Tabela 13 - Resultados da análise físico-química das amostras de pólen apícola desidratado e as especificações da regulamentação Brasileira (BRASIL, 2001), Argentina (KRELL, 1996; ARGENTINA, 1990) e Francesa (BOGDANOV, 2004).

Código	Análises físico-químicas (%)*					
	Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Frutose	Glicose
BA 01	4,65 ± 0,13	3,20 ± 0,01	4,99 ± 0,16	21,26 ± 0,10	20,60 ± 1,54	11,50 ± 0,82
BA 02	4,36 ± 0,19	3,10 ± 0,00	4,07 ± 0,32	20,83 ± 0,04	25,71 ± 0,25	11,01 ± 0,66
BA 03	5,53 ± 0,07	3,19 ± 0,03	5,70 ± 0,59	21,68 ± 0,10	17,96 ± 0,36	20,14 ± 0,31
BA 04	5,43 ± 0,06	3,41 ± 0,17	6,33 ± 0,08	22,56 ± 0,18	13,33 ± 0,19	17,26 ± 0,03
BA 05	5,18 ± 0,30	2,37 ± 0,06	10,96 ± 0,53	21,25 ± 0,09	13,47 ± 0,38	12,61 ± 0,29
BA 06	3,85 ± 0,12	2,97 ± 0,09	5,83 ± 0,78	18,54 ± 0,32	15,20 ± 1,07	20,53 ± 1,09
SE 01	4,32 ± 0,10	3,40 ± 0,16	4,98 ± 0,01	23,34 ± 0,14	23,05 ± 0,10	14,55 ± 0,33
SE 02	5,33 ± 0,21	3,76 ± 0,04	3,25 ± 0,12	33,13 ± 0,16	17,89 ± 0,13	11,72 ± 0,07
SE 03	4,40 ± 0,17	3,44 ± 0,02	4,91 ± 0,21	26,33 ± 0,05	21,87 ± 1,16	14,20 ± 1,43
SE 04	5,82 ± 0,03	3,32 ± 0,01	4,88 ± 0,09	25,00 ± 0,13	21,38 ± 0,32	15,87 ± 0,28
SE 05	4,86 ± 0,07	3,49 ± 0,05	6,36 ± 0,67	27,15 ± 0,09	16,28 ± 2,67	2,77 ± 0,50
SE 06	5,57 ± 0,20	3,39 ± 0,03	5,94 ± 1,23	25,05 ± 0,17	16,23 ± 0,12	13,86 ± 0,12
SE 07	5,63 ± 0,36	3,84 ± 0,05	4,82 ± 0,09	26,74 ± 1,29	13,77 ± 0,93	11,69 ± 0,79
SE 08	4,09 ± 0,09	3,71 ± 0,02	3,61 ± 0,11	27,69 ± 1,44	10,39 ± 1,28	9,62 ± 0,83
SE 09	4,69 ± 0,09	4,61 ± 1,99	4,00 ± 1,05	26,78 ± 0,93	13,94 ± 0,29	12,30 ± 0,18
SE 10	4,36 ± 0,05	3,68 ± 0,02	5,54 ± 0,22	27,65 ± 0,93	13,18 ± 1,20	12,21 ± 1,08
SE 11	5,39 ± 0,06	3,51 ± 0,04	4,09 ± 0,21	25,92 ± 1,41	12,90 ± 1,93	12,17 ± 1,42
RN 01	5,79 ± 0,18	4,11 ± 0,02	6,91 ± 0,13	28,67 ± 0,16	11,92 ± 0,44	13,81 ± 0,50
RN 02	5,16 ± 0,17	3,45 ± 0,11	6,55 ± 0,82	22,44 ± 0,35	14,68 ± 0,30	18,54 ± 0,49

"Continua"

"Tabela 13 Continuação"

Código	Análises físico-químicas (%)*					
	Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Frutose	Glicose
ES 01	5,17 ± 0,09	3,56 ± 0,01	5,24 ± 0,31	30,10 ± 0,05	18,91 ± 0,74	11,98 ± 0,47
SP 01	3,29 ± 0,01	3,24 ± 0,04	4,20 ± 0,03	29,69 ± 0,08	16,23 ± 0,40	5,12 ± 0,15
SP 02	3,06 ± 0,10	2,99 ± 0,00	6,17 ± 0,24	21,63 ± 0,52	20,13 ± 1,96	9,73 ± 1,12
SP 03	3,09 ± 0,02	2,94 ± 0,07	5,67 ± 0,05	20,03 ± 0,85	18,42 ± 1,36	9,05 ± 0,54
SP 04	3,36 ± 0,03	2,96 ± 0,02	6,28 ± 0,16	21,87 ± 0,19	20,39 ± 1,23	10,52 ± 0,42
SP 05	4,61 ± 0,08	2,54 ± 0,06	6,58 ± 0,53	20,74 ± 0,18	16,53 ± 0,13	5,46 ± 0,32
SP 06	4,29 ± 0,08	2,55 ± 0,03	5,83 ± 0,45	19,99 ± 0,07	16,15 ± 0,40	5,51 ± 0,27
SP 07	4,40 ± 0,12	2,46 ± 0,02	8,33 ± 0,38	21,18 ± 0,58	15,61 ± 0,07	5,93 ± 0,16
SP 08	4,85 ± 0,03	2,31 ± 0,02	9,09 ± 0,65	19,10 ± 0,11	13,84 ± 0,18	5,97 ± 0,18
SP 09	4,75 ± 0,05	2,33 ± 0,01	7,67 ± 0,45	19,61 ± 0,73	12,58 ± 1,95	4,36 ± 1,12
SP 10	4,81 ± 0,09	2,34 ± 0,01	7,58 ± 0,51	19,85 ± 0,30	14,16 ± 0,33	5,08 ± 0,24
SP 11	5,98 ± 0,10	2,91 ± 0,01	4,86 ± 0,34	17,84 ± 0,86	19,62 ± 1,19	6,77 ± 0,36
SP 12	3,81 ± 0,07	3,16 ± 0,01	5,54 ± 0,25	25,31 ± 0,72	18,73 ± 0,47	6,62 ± 0,11
SP 13	4,15 ± 0,14	2,99 ± 0,02	6,30 ± 0,13	23,14 ± 0,27	20,19 ± 1,22	6,61 ± 0,60
SP 14	4,40 ± 0,17	3,10 ± 0,01	6,11 ± 0,10	25,50 ± 0,23	21,11 ± 1,02	7,67 ± 0,23
SP 15	4,69 ± 0,02	3,23 ± 0,17	5,49 ± 0,40	24,65 ± 0,32	14,20 ± 0,38	12,87 ± 0,09
SP 16	5,69 ± 0,04	2,91 ± 0,06	6,48 ± 0,54	23,82 ± 0,70	15,89 ± 0,61	13,85 ± 0,48
SP 17	5,89 ± 0,20	2,49 ± 0,05	5,92 ± 0,32	23,01 ± 0,05	13,87 ± 0,39	12,60 ± 0,28
SP 18	6,01 ± 0,22	2,42 ± 0,08	7,68 ± 0,32	21,11 ± 0,24	12,16 ± 0,25	10,77 ± 0,28
SP 19	5,65 ± 0,06	2,50 ± 0,09	8,64 ± 1,28	23,44 ± 0,72	14,23 ± 0,09	14,12 ± 0,19
SP 20	4,81 ± 0,10	2,98 ± 0,01	7,00 ± 0,28	20,61 ± 0,46	15,66 ± 0,31	19,34 ± 0,39
SP 21	6,55 ± 0,24	3,78 ± 0,23	4,16 ± 0,39	20,87 ± 0,23	16,67 ± 0,18	20,42 ± 0,25
SP 22	5,15 ± 0,18	3,22 ± 0,05	6,04 ± 0,48	20,88 ± 0,17	16,50 ± 0,09	20,90 ± 0,28
SP 23	3,56 ± 0,14	3,32 ± 0,11	4,75 ± 0,75	31,67 ± 0,27	14,99 ± 0,23	18,32 ± 0,55
SP 24	5,42 ± 0,03	3,07 ± 0,15	4,82 ± 0,26	28,26 ± 0,30	13,39 ± 0,63	14,76 ± 0,49
DF 01	5,62 ± 0,16	2,82 ± 0,08	5,33 ± 0,19	23,91 ± 0,04	21,47 ± 0,19	13,77 ± 0,14
DF 02	7,22 ± 0,15	2,93 ± 0,10	5,23 ± 0,36	23,65 ± 0,25	13,62 ± 0,87	16,67 ± 0,87
MT 01	8,12 ± 0,33	2,14 ± 0,01	8,99 ± 0,40	17,73 ± 0,38	21,52 ± 1,64	11,10 ± 0,63
MT 02	5,35 ± 0,17	1,94 ± 0,01	7,59 ± 0,58	34,73 ± 0,37	8,08 ± 0,86	7,94 ± 0,98
MT 03	6,79 ± 0,34	2,07 ± 0,06	5,25 ± 0,34	16,33 ± 0,43	11,10 ± 0,23	13,80 ± 0,11

"Continua"

"Tabela 13 Continuação"

Código	Análises físico-químicas (%)*					
	Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Frutose	Glicose
RS 03	3,44 ± 0,12	2,84 ± 0,08	7,44 ± 0,17	30,36 ± 0,12	13,09 ± 0,17	15,86 ± 0,22
RS 01	4,60 ± 0,11	2,43 ± 0,13	5,40 ± 0,90	24,96 ± 0,21	13,66 ± 0,20	15,44 ± 0,33
RS 02	4,12 ± 0,12	2,09 ± 0,06	8,05 ± 0,23	15,49 ± 0,34	17,98 ± 0,24	17,63 ± 0,29
RS 03	3,44 ± 0,12	2,84 ± 0,08	7,44 ± 0,17	30,36 ± 0,12	13,09 ± 0,17	15,86 ± 0,22
RS 04	3,90 ± 0,06	1,91 ± 0,06	8,99 ± 0,41	20,89 ± 1,77	13,57 ± 0,17	15,03 ± 0,29
RS 05	4,67 ± 0,08	2,53 ± 0,10	7,70 ± 0,47	26,52 ± 2,15	16,09 ± 0,02	15,79 ± 0,15
SC 01	4,61 ± 0,14	2,68 ± 0,04	7,51 ± 0,45	19,26 ± 0,33	19,82 ± 1,77	7,84 ± 1,17
SC 02	4,34 ± 0,06	2,61 ± 0,03	9,51 ± 0,70	20,34 ± 0,43	15,82 ± 0,81	6,11 ± 0,63
SC 03	3,41 ± 0,14	2,68 ± 0,02	7,78 ± 0,18	20,42 ± 0,15	17,51 ± 2,12	6,50 ± 0,95
SC 04	3,66 ± 0,05	2,40 ± 0,28	8,01 ± 0,39	21,37 ± 0,46	12,08 ± 1,58	4,68 ± 0,46
SC 05	4,50 ± 0,07	2,52 ± 0,01	9,17 ± 0,81	19,73 ± 0,26	16,71 ± 2,19	6,53 ± 1,05
SC 06	4,44 ± 0,28	2,70 ± 0,02	7,97 ± 0,13	19,88 ± 0,15	11,86 ± 0,70	5,72 ± 0,39
SC 07	4,19 ± 0,07	2,44 ± 0,02	5,09 ± 0,12	27,01 ± 0,21	14,32 ± 0,72	5,39 ± 0,11
SC 08	4,41 ± 0,53	3,16 ± 0,05	7,46 ± 0,58	19,43 ± 0,13	13,83 ± 0,16	14,80 ± 0,47
Intervalo	3,06 - 8,12	1,94- 4,61	3,35 – 10,96	17,73 – 34,73	8,08 - 25,71	2,77 – 20,90
Legislação Brasileira (%)	Máximo 4	Máximo 4	Mínimo 1,8	Mínimo 8	-	-
Regulamentação Francesa (%)	Máximo 6	Entre 2 e 6	Entre 1 e 10	Entre 10 e 41	-	-
Regulamentação Argentina (%)	Máximo 4	Máximo 4	-	Entre 15 e 29	-	-

* Análises realizadas em triplicada e resultados expressos em média ± desvio padrão.

Para melhor visualização dos dados da Tabela 13, os resultados foram agrupados por região de coleta e apresentados na forma de gráficos (Figuras 21 a 26).

Figura 21 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a umidade das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta.

a, b = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

— Limite Máx. de 4% estabelecido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2001).

Figura 22 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para cinzas das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta.

a, b = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

— Limite Máx. de 4% estabelecido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2001).

Figura 23 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para lipídeos das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta.

a, b = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

— Limite Min. de 1,8% estabelecido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2001).

Figura 24 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para proteínas das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta.

— Limite Min. de 8% estabelecido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2001).

Figura 25 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para frutose das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta.

Figura 26 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para glicose das amostras de pólen apícola segundo região brasileira de coleta.

A Tabela 14 apresenta os resultados da variação para os parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de pólen apícola desidratado e a comparação entre as amostras pelo teste de ANOVA.

Tabela 14 - Resultados da variação para os parâmetros físicoquímicos obtidos para as amostras de pólen apícola e comparação entre as amostras pelo teste de ANOVA.

Variável	Região	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p*
Umidade (%)	Nordeste	4,97	0,62	5,16	3,85	5,82	19	<0,001
	Centro-Oeste	6,62	1,14	6,79	5,35	8,12	5	
	Sudeste	4,70	0,98	4,75	3,06	6,55	25	
	Sul	4,18	0,44	4,34	3,41	4,67	13	
	Total	4,83	0,99	4,68	3,06	8,12	62	
Cinzas (%)	Nordeste	3,47	0,46	3,44	2,37	4,61	19	<0,001
	Centro-Oeste	2,38	0,46	2,14	1,94	2,93	5	
	Sudeste	2,89	0,40	2,96	2,31	3,78	25	
	Sul	2,54	0,31	2,53	1,91	3,16	13	
	Total	2,95	0,55	2,97	1,91	4,61	62	
Lipídeos (%)	Nordeste	5,46	1,69	4,99	3,25	10,96	19	0,001
	Centro-Oeste	6,48	1,72	5,34	5,23	8,98	5	
	Sudeste	6,26	1,33	6,12	4,16	9,09	25	
	Sul	7,70	1,28	7,78	5,09	9,51	13	
	Total	6,33	1,64	6,08	3,25	10,96	62	
Proteínas (%)	Nordeste	24,84	3,50	25,05	18,54	33,13	19	0,241
	Centro-Oeste	23,27	7,26	23,65	16,33	34,73	5	
	Sudeste	22,96	3,67	21,63	17,84	31,67	25	
	Sul	21,97	4,05	20,42	15,49	30,36	13	
	Total	23,35	4,10	22,50	15,49	34,73	62	
Frutose (%)	Nordeste	16,51	4,23	15,20	10,39	25,71	19	0,600
	Centro-Oeste	15,16	6,11	13,62	8,08	21,52	5	
	Sudeste	16,42	2,64	16,15	12,15	20,87	25	
	Sul	15,11	2,42	14,15	11,69	19,82	13	
	Total	16,07	3,46	15,74	8,08	25,71	62	
Glicose (%)	Nordeste	13,49	4,04	12,60	2,77	20,53	19	0,177
	Centro-Oeste	12,66	3,29	13,77	7,95	16,67	5	
	Sudeste	10,58	5,17	9,73	4,36	20,90	25	
	Sul	10,57	5,09	7,84	4,79	17,63	13	
	Total	11,64	4,80	12,07	2,77	20,90	62	

* Nível descritivo do teste estatístico, N: número de amostras analisadas.

A Tabela 15 apresenta os resultados das comparações múltiplas do teste Tukey para a umidade, cinzas e lipídeos entre as regiões brasileiras de coleta.

Tabela 15 - Resultados das comparações para os parâmetros físicoquímicos obtidos para as amostras de pólen apícola desidratado e comparação entre as amostras (região de coleta) pelo teste de Tukey.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p*
Umidade (%)	Nordeste - Centro-Oeste	-1,65	0,40	0,001
	Nordeste - Sudeste	0,27	0,24	0,686
	Nordeste - Sul	0,79	0,29	0,039
	Centro-Oeste - Sudeste	1,92	0,39	<0,001
	Centro-Oeste - Sul	2,45	0,42	<0,001
	Sudeste - Sul	0,52	0,27	0,237
Cinzas (%)	Nordeste - Centro-Oeste	1,09	0,21	<0,001
	Nordeste - Sudeste	0,58	0,12	<0,001
	Nordeste - Sul	0,93	0,15	<0,001
	Centro-Oeste - Sudeste	-0,51	0,20	0,063
	Centro-Oeste - Sul	-0,16	0,22	0,888
	Sudeste - Sul	0,36	0,14	0,065
Lipídeos (%)	Nordeste - Centro-Oeste	-1,02	0,74	0,518
	Nordeste - Sudeste	-0,80	0,45	0,290
	Nordeste - Sul	-2,24	0,53	<0,001
	Centro-Oeste - Sudeste	0,22	0,72	0,990
	Centro-Oeste - Sul	-1,22	0,77	0,397
	Sudeste - Sul	-1,44	0,50	0,029

* Nível descritivo do teste estatístico

Pelos atributos físico-químicos das amostras de pólen apícola desidratado, analisadas, apresentados na Tabela 15 verifica-se que as amostras são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para umidade, cinzas e lipídeos.

A Tabela 15 mostra que a umidade média foi maior para as amostras da região Centro-Oeste do que em qualquer outra região de coleta ($p < 0,05$) e a umidade média das amostras da região Nordeste foi maior que nas amostras da região Sul ($p = 0,039$). A quantidade de cinzas foi maior nas amostras da região Nordeste ($p < 0,001$). O conteúdo de cinzas pode ser influenciado pela capacidade da planta em acumular sais minerais e ainda pela origem geográfica, pelo tipo de solo, origem geográfica e pelas espécies florais (CARPES *et al.*, 2009b; MARTINS *et al.*, 2011). Martins *et al.*, (2011) avaliando 154 amostras brasileiras de pólen apícola desidratado, também verificaram que os resultados de cinzas eram maiores para as amostras da região Nordeste. O conteúdo de lipídeos das amostras das regiões Nordeste e Sudeste foi menor do que o das amostras da região Sul ($p < 0,001$ e $p=0,029$, respectivamente).

A umidade das amostras aqui avaliadas apresentou valores entre 3,06% a 8,12%. Das sessenta e duas amostras analisadas somente 17,7% apresentaram valor de umidade abaixo de 4% (valor preconizado pela Legislação Brasileira e Regulamentação Argentina). As amostras com valores até 6% estão de acordo com o limite da Regulamentação Francesa. O valor médio obtido para amostras provenientes da região sul do Brasil por Almeida-Muradian *et al.*, (2005), foi 7,40% de umidade, no entanto o método utilizado foi o gravimétrico com estufa a vácuo a 70°C. Conforme demonstrado por Melo e Almeida-Muradian (2011), o método influencia os resultados obtidos e têm-se utilizado e recomendado o método de secagem com infravermelho (Almeida-Muradian, Arruda, Barreto, 2012). Valores bastante elevados também foram relatados por Bastos *et al.*, (2003) utilizando o método de Karl Fisher para amostras desidratadas de pólen apícola proveniente dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (média de 8,78%). Os resultados referidos anteriormente por todos os investigadores apresentaram variabilidade nas médias, que, de acordo

com Marchini, Reis e Moreti (2006), pode ser explicado pelo fato do pólen ser um material altamente higroscópico e, portanto, muito afetado pelas condições ambientais. Nas análises realizadas por Arruda *et al.*, (2013a) em amostras coletadas em Pariquera-Açu (SP), entre os meses de outubro e novembro de 2007 os valores encontraram-se entre 3,27 e 3,78% (secador infra-vermelho) enquanto que Melo e Almeida-Muradian (2011) analisando amostras produzidas também em Pariquera-Açu, entre os meses de fevereiro e abril de 2007, obtiveram resultados entre 3,62 e 5,74% (secador infra-vermelho). Oliveira (2006), ao analisar amostras de pólen coletadas na cidade de Pindamonhangaba (SP) nos meses de abril e outubro de 2005 encontrou valores de umidade que variaram entre 2,5 e 3,5% (secador infra-vermelho). Martins *et al.*, (2011) avaliou amostras de diversos estados brasileiros coletadas entre 2007 e 2008 tendo obtido valores que oscilaram entre 3,00 e 9,39% (Karl Fisher). A variação nos resultados encontrados, tanto para este trabalho quanto para o de outros autores, aponta a dificuldade dos produtores em obter um produto que atenda a exigência da legislação brasileira (MARTINS *et al.*, 2011) e uma falta de homogeneidade na escolha do método de determinação de umidade, o que poderia ser solucionado com a revisão da Legislação Brasileira que deve indicar o método analítico para avaliação de tal parâmetro.

O teor de água e a atividade de água desempenham um papel importante nas características organolépticas e na "vida de prateleira" do pólen apícola. Quando os valores são muito altos, podem potencialmente favorecer a contaminação microbiana, principalmente por fungos e leveduras (MORGANO *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2012; CORONEL *et al.*, 2004). Recomenda-se ainda que não seja feita a coleta do pólen apícola em dias chuvosos ou extremamente úmidos e que na linha de processamento a estufa utilizada deve seja adequada, podendo-se utilizar também um desumidificador na sala de secagem.

Das amostras analisadas 96,8% respeitaram o valor máximo de 4% estabelecido pela Legislação Brasileira. A legislação Francesa estabelece valores entre 2 e 6%. Os resultados encontrados para cinzas (1,94 a 4,61%) foram semelhantes aos valores que foram observados por Bastos *et al.*, (2003 - Estados de SP e MG), Almeida-Muradian *et al.*, (2005 - região sul do Brasil); Barreto *et al.*, (2006 - várias regiões do Brasil), Marchini, Reis e Moreti (2006 - Piracicaba/SP), Modro *et al.*, (2007 - Viçosa/MG), Melo *et al.*, (2009 - Pariqueira-Açu/SP) e Arruda *et al.*, (2013a - Pariqueira-Açu/SP) que obtiveram os valores médios de 2,79%, 2,20%; 2,89%, 2,90%, 2,42, 3,08 e 2,98 respectivamente. No trabalho de Martins *et al.*, (2011) o teor de cinzas foi de 1,33 a 4,13% para várias regiões brasileiras. Segundo Carpes *et al.*, (2009b), os minerais predominantes no pólen de abelha são: fósforo, potássio, cálcio e magnésio. No entanto, os teores de minerais no pólen apícola podem variar consideravelmente ao longo do ano, devido a diferenças na origem floral do pólen. Bogdanov, (2012) observou que o teor de potássio, magnésio, cálcio, manganês e ferro, variaram mais enquanto que os teores de zinco e de cobre no pólen apícola foram mais constantes.

O conteúdo de lipídeos preconizado pela Legislação Brasileira é de no mínimo 1,8% enquanto que a Regulamentação Francesa estabelece valores entre 1 a 10%, assim dentre as amostras deste trabalho que apresentaram resultados que variaram entre 3,35 e 10,96%; somente a amostra BA 05 com 10,96% em lipídeos apresentou resultado acima do parâmetro estipulado pela Regulamentação Francesa. Arruda *et al.*, (2013a) e Melo *et al.*, (2009) em amostras provenientes de Pariqueira-Açu/SP obtiveram resultados que oscilaram entre 5,39% a 4,97% enquanto que Funari *et al.*, (2003) para amostras de Botucatu/SP citaram o valor de 5,1%. Barreto *et al.*, (2005) para amostras de pólen apícola desidratado, recolhidas em diversas regiões do Brasil reportaram valores de 2,56 a 6,17% e amostras de Piracicaba/SP, avaliadas por Marchini, Reis e Moreti (2006), apresentaram valores entre 2,2% e 5,60%. Bastos *et al.*, (2003) encontraram 6,1 e 14,0 % para amostras provenientes de SP e MG, enquanto que Almeida-Muradian *et al.*, (2005) relataram o valor médio de

7,0% para amostras do Sul do Brasil. Carpes *et al.*, (2009) obtiveram valores entre 3,72 a 6,47 e Martins *et al.*, (2011) reportaram 4,01 a 13,32%, ambos para amostras de pólen apícola desidratado de vários estados brasileiros.

Para as proteínas, os valores obtidos neste trabalho situam-se entre 17,73 e 34,73% o que está de acordo com o estabelecido tanto na norma brasileira quanto na francesa que estabelecem o mínimo de 8% e o intervalo de 10 e 41 % respectivamente. No que diz respeito a Regulamentação Argentina (15 a 29%) não cumpriram o estipulado as amostras SP 01, ES 01, SE 02, MT 02, RS 03 e SP23, cujos valores foram 29,69; 30,10; 33,13; 34,73; 30,36 e 31,67% respectivamente. Bastos *et al.* (2003), em amostras de pólen apícola desidratado dos Estados de São Paulo e Minas Gerais encontraram teores de proteínas de 21,2%; Funari *et al.* (2003), obtiveram valores de 26,2% em amostras desidratadas produzidas em Botucatu/SP; Almeida-Muradian *et al.*, (2005) relataram para amostras desidratadas do sul do Brasil o valor médio de 21,0%; Marchini, Reis e Moreti (2006) em amostras desidratadas de Piracicaba/SP, observaram que o conteúdo em proteínas foi de 21,4%, enquanto que os valores informados por Arruda *et al.*, (2013a) e Melo *et al.*, (2009) foram de 23,38 e 23,59% respectivamente para amostras de pólen apícola desidratado provenientes de Pariquera-Açu. Modro *et al.*, (2007) obtiveram valores de 15,79 a 40,53% para amostras de Minas Gerais, Carpes *et al.*, (2009) obtiveram valores entre 15,0 e 27,7 para amostras da região sul do Brasil e Martins *et al.*, (2011) reportaram 12,28 a 27,07%, ambos para amostras de pólen apícola desidratado de vários estados brasileiros.

Segundo as pesquisas de Serra-Bonvehí e Escolá-Jordá (1997) e Szczesna (2007) frutose e glicose são os açúcares livres presentes em maiores concentrações no pólen apícola, observando-se predominância da frutose em relação à glicose. Os resultados obtidos variaram entre 11,86 e 25,71% e de 2,77 e 15,87% para a frutose e para a glicose respectivamente. Martins *et al.*, (2011), em amostras brasileiras de pólen apícola desidratado, determinaram valores de 12,59 a 23,62% de frutose e

de 6,99 a 21,85% para a glicose. Serra-Bonvehí e Escolá-Jordá (1997) ao analisarem amostras espanholas de pólen apícola desidratado relataram valores de 15,20 a 22,40% para frutose e de 10,86 a 17,90% para glicose. Em amostras argentinas, Coronel *et al.*, (2004) relataram valores de 2,44 a 14,13% para glicose e de 7,04 a 19,47% para frutose. Para amostras da Polônia, Coréia do Sul e China os valores relatados por Szczesna (2007) foram de 15,51 - 19,22%, 12,09 - 22,06 e 9,74 - 17,90%, respectivamente para frutose e de 9,85- 14,29%, 9,94 - 20,06%, 8,45 - 15,10% e para a glicose. Qian *et al.*, (2008) encontraram valores de 15,9; 17,5; 16,0; 18,6 e 19,6 % de frutose e 8,2; 13,1; 11,0; 12,1 e 12,2% de glicose para amostras de pólen apícola originárias de Israel, China, Romênia e Espanha respectivamente.

A maior parte dos carboidratos presentes no pólen apícola é proveniente do néctar ou do mel que fazem parte do fluido que as abelhas usam para agregar as bolotas de pólen (HUMAN e NICHOLSON, 2006). Como consequência, o pólen apresenta grandes quantidades de açúcares redutores, o que foi observado nos resultados deste e dos outros trabalhos aqui referenciados, a soma de glicose e frutose foi de 26,33% em média. O índice frutose/glicose variou entre 0,74 e 5,88. Serra-Bonvehí e Escolá-Jordá (1997) encontraram um índice que oscilou entre 1,13 a 1,53 para amostras de pólen espanhol desidratado. Szczesna (2007) encontrou valores de 1,33 a 1,45 para amostras de pólen apícola desidratado provenientes de Israel, China e Romênia enquanto que Martins *et al.*, (2011), relataram índices variando entre 1,01 a 2,24 em amostras brasileiras. A razão frutose/glicose pode estar relacionada com o índice glicêmico (ISHAYEK e KERN, 2006; BOGDANOV *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2011), medida do efeito que os alimentos exercem sobre os níveis sanguíneos de glicose. No mel a razão F/G varia entre 1,03 a 1,54 (ISHAYEK e KERN, 2006), esta relação elevada é considerada a principal razão para o baixo a moderado índice glicêmico em alguns tipos de mel. Méis com menor proporção de F/G tendem a ter maior índice glicêmico (FOSTER-POWELL *et al.*, 2002; ISHAYEK e KERN, 2006). Para elucidar os valores da razão F/G do pólen apícola brasileiro são necessários

estudos adicionais, principalmente para as amostras que apresentaram valores acima dos relatados em outros trabalhos (Martins *et al.*, (2011). As amostras coletadas em São Paulo, Santa Catarina e Sergipe apresentaram razão F/G superiores a 2,0.

A variabilidade da composição centesimal encontrada para as amostras de pólen apícola analisadas neste trabalho pode ser explicada pela diversidade botânica, idade, condição nutricional da planta e condições ambientais, das diferentes localidades de produção, estações do ano (HERBERT Jr. e SHIMANUKI, 1978, FUNARI *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2006), bem como fatores relacionados com manipulação e armazenamento do produto (VILLANUEVA *et al.*, 2002).

5.3 Validação do método de análise para determinação de Glicose e Frutose

Linearidade

Os coeficientes de correlação (r) obtidos para todos os dois casos demonstram que os métodos possuem correlação fortíssima – $0,91 < R^2 < 0,99$ – (RIEDER *et al.*, 2000).

A Tabela 16 e as Figuras 27 e 28 apresentam os resultados médios encontrados para a linearidade dos açúcares Glicose e Frutose.

Tabela 16 - Dados obtidos no estudo de linearidade dos açúcares Glicose e Frutose.

Glicose			Frutose		
Massa Inj. (mg)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (mg)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área
0,0625	108.478,33	904,50	0,0625	254.725,33	7.164,56
0,1250	233.364,00	4.857,20	0,1250	561.119,33	4.352,23
0,2500	838.518,00	10.612,44	0,2500	1.908.247,33	29.593,76
0,5000	1.550.250,00	4.572,18	0,5000	3.438.847,00	7.673,63
0,7500	2.686.643,67	19.540,75	0,7500	5.661.926,33	94.750,14
1,0000	3.461.871,00	11.738,41	1,0000	6.976.781,67	86.191,85
R²: 0,9958			R²: 0,9936

Figura 27 - Gráfico de Linearidade para Glicose.

Figura 28 - Gráfico de Linearidade para Frutose.

Limite de detecção e quantificação

Os resultados para os limites de detecção e quantificação para a glicose e para frutose são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Limites de detecção e quantificação dos métodos para determinação de glicose e frutose.

Açúcar	Limite de Detecção (mg/mL)	Limite de Quantificação (mg/mL)
Glicose	0,16	0,49
Frutose	0,42	1,27

Exatidão (Teste de recuperação)

A exatidão dos métodos foi obtida através da recuperação de padrão adicionado a amostra em três níveis de concentração (50; 75 e 100 % da concentração esperada para a matriz). A literatura descreve que na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações na faixa de 70% a 120% são aceitáveis (LANÇAS, 2004).

A média dos resultados da recuperação para glicose e frutose encontra-se na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados da recuperação de padrão em amostra de pólen apícola para glicose e frutose.

Dados de Recuperação (%)				
Nível	Glicose		Frutose	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	98,72	7,72	86,60	3,93
2	89,50	4,52	81,90	5,55
3	86,70	6,98	74,60	4,98

5.4 Análises microbiológicas

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas efetuadas para as amostras de pólen apícola desidratado que compõe este estudo estão sumariados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados das análises microbiológicas das amostras de pólen apícola desidratado.

Código	Contagem de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Clostrídios Sulfito Redutores (em 0,01g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
BA 01	<10	$1,64 \times 10^2 \pm 1,17 \times 10^2$	<1	<1	Ausente	<1
BA 02	$6,30 \times 10^1 \pm 4,34 \times 10^1$	$5,00 \times 10^1 \pm 2,00 \times 10^1$	$2,66 \times 10^2 \pm 4,18 \times 10^2$	<1	Ausente	<1
BA 03	$7,02 \times 10^1 \pm 1,19 \times 10^1$	<10	<1	<1	Ausente	<1
BA 04	$3,00 \times 10^3 \pm 2,00 \times 10^3$	$8,66 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^1$	$7,66 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^2$	$5,33 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$	Ausente	$8,00 \times 10^1 \pm 2,64 \times 10^1$
BA 05	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
BA 06	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SE 01	$4,22 \times 10^1 \pm 25,42$	$3,04 \times 10^2 \pm 1,94 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2 \pm 2,64 \times 10^2$	<1	Ausente	$4,66 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$
SE 02	<10	$5,66 \times 10^1 \pm 2,51 \times 10^1$	<1	<1	Ausente	$2,00 \times 10^1 \pm 1,00 \times 10^1$
SE 03	<10	$6,24 \times 10^1 \pm 2,53 \times 10^1$	$5,00 \times 10^1 \pm 2,00 \times 10^2$	<1	Ausente	$2,00 \times 10^2 \pm 1,00 \times 10^2$
SE 04	$7,51 \times 10^1 \pm 2,12 \times 10^1$	$8,33 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$	$9,33 \times 10^1 \pm 2,08 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SE 05	$9,40 \times 10^2 \pm 7,34 \times 10^2$	<10	<1	<1	Ausente	<1
SE 06	$8,66 \times 10^1 \pm 3,51 \times 10^1$	$7,45 \times 10^2 \pm 7,55 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1 \pm 9,05 \times 10^1$	$1,86 \times 10^1 \pm 7,49$	Ausente	<1
SE 07	$8,48 \times 10^2 \pm 2,81 \times 10^2$	<10	$2,33 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SE 08	$8,00 \times 10^2 \pm 4,58 \times 10^2$	$1,65 \times 10^1 \pm 4,35 \times 10^1$	$6,00 \times 10^1 \pm 2,64 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SE 09	$6,33 \times 10^1 \pm 4,16 \times 10^1$	$6,81 \times 10^1 \pm 1,17 \times 10^1$	<1	<1	Ausente	<1
SE 10	$5,00 \times 10^2 \pm 3,00 \times 10^1$	$3,90 \times 10^3 \pm 3,06 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2 \pm 2,00 \times 10^2$	<1	Ausente	$8,33 \times 10^1 \pm 3,53 \times 10^1$
SE 11	$6,33 \times 10^1 \pm 4,16 \times 10^1$	$6,71 \times 10^1 \pm 4,00 \times 10^1$	$4,00 \times 10^1 \pm 1,73 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
RN 01	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
RN 02	$5,68 \times 10^1 \pm 1,14 \times 10^1$	$7,66 \times 10^1 \pm 1,15 \times 10^1$	$2,78 \times 10^1 \pm 1,63 \times 10^1$	<1	Ausente	<1

“Continua”

"Tabela 19 Continuação"

Código	Contagem de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Clostrídios Sulfito Redutores (em 0,01g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
ES 01	$8,66 \times 10^1 \pm 1,53 \times 10^1$	<10	$2,33 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SP 01	<10	<10	$2,00 \times 10^2 \pm 1,00 \times 10^2$	<1	Ausente	<1
SP 02	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 03	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 04	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 05	$9,08 \times 10^1 \pm 5,07 \times 10^1$	<10	$2,57 \times 10^1 \pm 1,24 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SP 06	<10	$4,72 \times 10^2 \pm 2,42 \times 10^2$	$4,00 \times 10^1 \pm 1,00 \times 10^1$	<1	Ausente	$2,33 \times 10^1 \pm 1,15 \times 10^1$
SP 07	<10	$6,33 \times 10^2 \pm 2,30 \times 10^2$	$3,33 \times 10^1 \pm 2,08 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SP 08	$6,49 \times 10^2 \pm 3,36 \times 10^2$	$1,12 \times 10^3 \pm 8,10 \times 10^2$	$9,00 \times 10^2 \pm 6,00 \times 10^2$	<1	Ausente	<1
SP 09	<10	$7,00 \times 10^2 \pm 2,00 \times 10^1$	$4,66 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^1$	<1	Ausente	$5,33 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$
SP 10	$6,50 \times 10^2 \pm 3,32 \times 10^2$	$3,00 \times 10^3 \pm 1,19 \times 10^3$	$2,66 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^2$	$1,93 \times 10^1 \pm 1,18 \times 10^1$	Ausente	$9,00 \times 10^1 \pm 2,00 \times 10^1$
SP 11	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 12	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 13	$7,12 \times 10^2 \pm 3,28 \times 10^2$	$2,80 \times 10^1 \pm 1,31 \times 10^1$	$2,46 \times 10^1 \pm 1,36 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SP 14	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 15	$1,16 \times 10^1 \pm 7,63$	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 16	$6,00 \times 10^2 \pm 3,00 \times 10^2$	$3,06 \times 10^3 \pm 5,68 \times 10^2$	$1,16 \times 10^2 \pm 7,37 \times 10^1$	<1	Ausente	$8,26 \times 10^1 \pm 4,53 \times 10^1$
SP 17	$3,33 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^1$	$4,29 \times 10^1 \pm 2,06 \times 10^1$	$4,75 \times 10^1 \pm 2,03 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SP 18	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 19	$7,00 \times 10^1 \pm 2,64 \times 10^1$	$6,02 \times 10^1 \pm 2,13 \times 10^1$	$2,45 \times 10^1 \pm 1,22 \times 10^1$	$1,23 \times 10^1 \pm 5,05$	Ausente	$7,33 \pm 2,75$
SP 20	$2,33 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^2$	$4,59 \times 10^1 \pm 5,51 \times 10^1$	<1	<1	Ausente	<1
SP 21	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SP 22	$3,00 \times 10^2 \pm 1,00 \times 10^2$	$9,33 \times 10^2 \pm 2,51 \times 10^2$	$6,66 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$	$2,83 \times 10^1 \pm 3,61 \times 10^1$	Ausente	$2,11 \times 10^1 \pm 8,52$
SP 23	$5,78 \times 10^1 \pm 2,66 \times 10^1$	$8,66 \times 10^1 \pm 2,08 \times 10^1$	$1,83 \times 10^1 \pm 1,25 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
SP 24	<10	$1,16 \times 10^1 \pm 7,63 \times 10^1$	<1	<1	Ausente	<1

"Continua"

“ Tabela 19 Continuação”

Código	Contagem de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Clostrídios Sulfito Redutores (em 0,01g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
DF 01	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
DF 02	$3,00 \times 10^2 \pm 1,00 \times 10^2$	$8,66 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^2$	$8,00 \times 10^1 \pm 1,00 \times 10^1$	<1	Ausente	<1
MT 01	<10	$5,33 \times 10^1 \pm 2,08 \times 10^1$	<1	<1	Ausente	<1
MT 02	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
MT 03	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SC 01	$8,07 \times 10^2 \pm 2,14 \times 10^2$	$6,30 \times 10^2 \pm 2,33 \times 10^2$	$4,66 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$	$5,10 \times 10^1 \pm 2,38 \times 10^1$	Ausente	$2,25 \times 10^1 \pm 8,67$
SC 02	$2,05 \times 10^1 \pm 6,52$	$3,91 \times 10^2 \pm 1,13 \times 10^2$	<1	<1	Ausente	$6,91 \times 10^1 \pm 1,71 \times 10^1$
SC 03	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
SC 04	<10	$5,00 \times 10^1 \pm 2,00 \times 10^1$	<1	<1	Ausente	$3,25 \times 10^2 \pm 8,67$
SC 05	$6,97 \times 10^2 \pm 4,61 \times 10^2$	$5,21 \times 10^2 \pm 2,28 \times 10^2$	$5,00 \times 10^1 \pm 2,00 \times 10^1$	$1,33 \times 10^1 \pm 5,77 \times 10^1$	Ausente	$6,43 \times 10^1 \pm 5,17 \times 10^1$
SC 06	<10	$5,33 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^2$	<1	<1	Ausente	<1
SC 07	$9,23 \times 10^2 \pm 7,58 \times 10^2$	<10	<1	<1	Ausente	$5,32 \times 10^1 \pm 3,29 \times 10^1$
SC 08	$6,33 \times 10^1 \pm 3,16 \times 10^1$	<10	<1	<1	Ausente	<1
RS 01	$1,30 \times 10^1 \pm 6,08 \times 10^1$	$2,14 \times 10^1 \pm 4,54 \times 10^1$	<1	<1	Ausente	$3,84 \times 10^1 \pm 1,89 \times 10^1$
RS 02	$1,26 \times 10^3 \pm 6,42 \times 10^1$	$4,16 \times 10^3 \pm 1,77 \times 10^3$	$1,26 \times 10^2 \pm 6,42 \times 10^1$	<1	Ausente	$2,02 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$
RS 03	<10	<10	<1	<1	Ausente	<1
RS 04	$5,33 \times 10^1 \pm 4,04 \times 10^1$	$8,99 \times 10^1 \pm 2,04 \times 10^1$	$4,33 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$	<1	Ausente	$7,43 \pm 4,90$
RS 05	$5,66 \times 10^2 \pm 3,21 \times 10^2$	$2,41 \times 10^1 \pm 1,18 \times 10^1$	$7,00 \times 10^1 \pm 1,00 \times 10^1$	<1	Ausente	<1

* Análises realizadas em triplicada e resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Levando-se em consideração a quantidade de nutrientes presentes no pólen apícola, uma grande variedade de microrganismos poderia se desenvolver nessa matriz. Na avaliação da qualidade de um alimento é importante determinar a sua segurança do ponto de vista microbiológico. A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações sobre as condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, tempo de vida de prateleira e consequentemente o risco para a saúde pública (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A segurança alimentar com ênfase nos aspectos qualitativos pode ser entendida como a aquisição pelo consumidor de alimento de boa qualidade, livres de contaminantes de natureza química (pesticidas), biológicas (organismos patogênicos), físicos (vidros, pedras), ou qualquer

substância que possa acarretar problemas à saúde (SPERS e KASSOUF, 1996).

No Brasil ainda não existe uma norma ou resolução que estabeleça o controle da qualidade microbiológica desta matriz, tornando-se imprescindível a realização de trabalhos com o objetivo de estabelecer padrões higiênico-sanitários do produto, e que visem fornecer informações aos órgãos competentes, para o possível estabelecimento de padrões microbiológicos para este produto apícola.

Os resultados obtidos para os parâmetros indicadores de qualidade comercial propostos (aeróbios mesófilos e bolores e leveduras) estiveram de acordo com o padrão estabelecido pelo Código Alimentar Argentino, que estabelece um valor máximo de $1,5 \times 10^5$ UFC/g para bolores e leveduras no pólen apícola desidratado. Neste trabalho os bolores e leveduras foram detectados em 60% das amostras analisadas, no entanto Hervatin (2009) e Coronel, *et al.*, (2004) detectaram a presença destes microrganismos em todas as amostras de pólen apícola brasileiro e argentino respectivamente, analisadas. De fato, Hervatin (2009) analisando amostras de pólen apícola desidratado, provenientes do estado de São Paulo, verificou que 60% das amostras apresentaram contagens superiores a 10^4 UFC/g. De acordo com o do Código Alimentario Argentino no Artigo 785 (RES1550, 12.12.90) esta contagem não pode ser superior a 10^2 UFC/grama de pólen apícola.

Os valores obtidos por Estevinho *et al.*, (2012), Nogueira *et al.*, (2012) e Feas *et al.*, (2012), em amostras desidratadas de pólen apícola orgânico e pólen apícola comercial portugueses foram inferiores aos determinados neste estudo. Do ponto de vista microbiológico os valores de bolores e leveduras estão relacionados com as condições ambientais, e são indicativos de uma gestão adequada ou ineficiente dos apiários (NOGUEIRA *et al.*, 2012).

Os aeróbios mesófilos estiveram presentes em 56% das amostras, oscilando entre <10 e $1,26 \times 10^3$. Estes valores, ligeiramente elevados, podem estar relacionados com o alto teor de umidade observado em algumas amostras. A contagem de aeróbios mesófilos ou contagem padrão

em placas em um produto alimentício reflete a qualidade sanitária do alimento ou matéria-prima, bem como as condições de processamento, manuseio e estocagem. A presença de bactérias mesófilas em grande número pode indicar matéria-prima contaminada; limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas; higiene insuficiente na produção ou conservação dos alimentos; condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou a conservação dos alimentos, ou ainda uma combinação destas circunstâncias (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Os indicadores de qualidade sanitária, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* estiveram presentes em 50, 11,3 e 30,6% das amostras, respectivamente. Nos trabalhos de Estevinho *et al.*, (2012), Nogueira *et al.*, (2012) e Feas *et al.*, (2012), em pólen apícola orgânico e em pólen comercial produzidos em Portugal, *E. coli* e *S. aureus* não foram detectados.

Os resultados para coliformes totais se enquadraram no limite estabelecido pela RDC 12 de Janeiro de 2001 que indica o máximo de 5×10^2 UFC/grama para o grupo 10 item N (granola e mistura de cereais não compactados, com ou sem adições, e similares).

A contaminação por coliformes é um indicador das condições higiênicas dos processos de fabricação, pois são facilmente inativados por sanitizantes e tem uma ampla capacidade de formação de colônias em vários pontos da planta de processamento, quando existe falha na sanitização. Também são indicadores de falha de processo ou de contaminação pós-processamento em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não sobrevivem ao tratamento térmico.

Martínez (2006) que analisou amostras de pólen apícola desidratado da Colombia observou que 65% das amostras foram positivas para coliformes totais. Já Coronel, *et al.*, (2004) detectaram a presença de coliformes totais na maioria das amostras de pólen apícola desidratado argentino, porém ao efetuar as provas bioquímicas não detectaram presença de *Escherichia coli*. Assim, estas bactérias são indicadoras de contaminação demonstrando as condições higiênico-sanitárias em que se

encontram o pólen apícola. Neste estudo, as condições higiênico-sanitárias não foram tão eficientes devido à frequência de microrganismos presentes nas amostras e sugere-se que haja um maior controle por parte dos manipuladores durante a produção, o que também deve ser realizado por parte dos entrepostos durante o fracionamento e envase do produto.

Os indicadores de segurança (esporos de clostrídios sulfito redutores) estiveram ausentes em todas as amostras analisadas, assim como observado por Estevinho *et al.*, (2012), Nogueira *et al.*, (2012), Feas *et al.*, (2012) e Coronel, *et al.*, (2004).

As Tabelas 20 e 21 apresentam os resultados da variação e das comparações entre análises microbiológicas efetuadas para as amostras de pólen apícola desidratado, agrupadas segundo a região de coleta.

Tabela 20 - Resultados da variação das análises microbiológicas efetuadas para as amostras de pólen apícola desidratado, agrupadas segundo região de coleta pelo teste de Kruskal-Wallis.

Variável	Região	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Contagem de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Nordeste	$3,51 \times 10^2$	$7,15 \times 10^2$	$6,33 \times 10^1$	<10	$3,00 \times 10^3$	19	0,212
	Centro-Oeste	$6,80 \times 10^1$	$1,30 \times 10^2$	<10	<10	$3,00 \times 10^2$	5	
	Sudeste	$1,57 \times 10^2$	$2,40 \times 10^2$	<10	<10	$7,13 \times 10^2$	25	
	Sul	$3,51 \times 10^2$	$4,41 \times 10^2$	$6,33 \times 10^1$	<10	$1,27 \times 10^3$	13	
	Total	$2,50 \times 10^2$	$4,73 \times 10^2$	$5,50 \times 10^1$	<10	$3,00 \times 10^3$	62	
Bolors e Leveduras (UFC/g)	Nordeste	$7,62 \times 10^2$	$2,10 \times 10^3$	$6,71 \times 10^1$	<10	$8,67 \times 10^3$	19	0,639
	Centro-Oeste	$1,90 \times 10^2$	$3,78 \times 10^2$	<10	<10	$8,67 \times 10^2$	5	
	Sudeste	$4,11 \times 10^2$	$8,44 \times 10^2$	$1,17 \times 10^1$	<10	$3,00 \times 10^3$	25	
	Sul	$4,97 \times 10^2$	$1,13 \times 10^3$	$5,00 \times 10^1$	<10	$4,16 \times 10^3$	13	
	Total	$5,19 \times 10^2$	$1,37 \times 10^3$	$4,80 \times 10^1$	<10	$8,67 \times 10^3$	62	
Coliformes Totais (UFC/g)	Nordeste	$1,35 \times 10^2$	$2,42 \times 10^2$	$2,33 \times 10^1$	<1	$7,67 \times 10^2$	19	0,482
	Centro-Oeste	$1,68 \times 10^1$	$3,53 \times 10^2$	<1	<1	$8,00 \times 10^1$	5	
	Sudeste	$7,38 \times 10^1$	$1,84 \times 10^2$	$2,33 \times 10^1$	<1	$9,00 \times 10^2$	25	
	Sul	$2,65 \times 10^1$	$3,91 \times 10^1$	<1	<1	$1,27 \times 10^2$	13	
	Total	$7,79 \times 10^1$	$1,81 \times 10^2$	9,67	<1	$9,00 \times 10^2$	62	
<i>E. coli</i> (UFC/g)	Nordeste	4,68	$1,24 \times 10^1$	<1	<1	$5,30 \times 10^1$	19	0,839
	Centro-Oeste	1,00	0,00	<1	<1	<1	5	
	Sudeste	3,29	6,72	<1	<1	$2,80 \times 10^1$	25	
	Sul	5,79	$1,40 \times 10^1$	<1	<1	$5,10 \times 10^1$	13	
	Total	4,06	$1,00 \times 10^1$	<1	<1	$5,30 \times 10^1$	62	
<i>S. aureus</i> (UFC/g)	Nordeste	$2,35 \times 10^1$	$5,03 \times 10^1$	<1	<1	$2,00 \times 10^2$	19	0,048
	Centro-Oeste	<1,00	0,00	<1	<1	<1	5	
	Sudeste	$1,19 \times 10^1$	$2,52 \times 10^1$	<1	<1	$9,00 \times 10^1$	25	
	Sul	$1,78 \times 10^2$	$5,56 \times 10^2$	$2,25 \times 10^1$	<1	$2,03 \times 10^3$	13	
	Total	$4,94 \times 10^1$	$2,53 \times 10^2$	<1	<1	$2,03 \times 10^3$	62	

DP= desvio padrão, N= número de amostras avaliadas, p= Nível descritivo do teste estatístico.

Tabela 21 - Resultados das comparações múltiplas não paramétricas para *S. aureus* entre as regiões de coleta do pólen apícola desidratado

Variável	Comparação	p*
<i>S. aureus</i>	Nordeste - Centro-Oeste	0,330
	Nordeste - Sudeste	0,784
	Nordeste - Sul	0,115
	Centro-Oeste - Sudeste	0,408
	Centro-Oeste - Sul	0,045
	Sudeste - Sul	0,057

* Nível descritivo do teste estatístico.

As Tabelas 20 e 21 mostram que apenas para *S. aureus* houve diferença significativa entre as regiões brasileiras ($p=0,048$) e que as amostras coletadas na região Centro-oeste apresentaram as contagens mais altas do que as amostras da região sul ($p=0,045$).

5.5 Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides Totais:

A Tabela 22 apresenta os dados obtidos nas análises de compostos fenólicos totais e flavonoides totais para as sessenta e duas amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 22 - Concentrações de fenólicos totais e flavonoides totais em extratos etanólicos de amostras de pólen apícola desidratado (base seca).

Código das amostras	Fenólicos totais (mg GAE/g de pólen)*	Flavonoides totais (mg de quercetina/g de pólen)*
BA 01	15,62 ± 0,71	4,15 ± 0,13
BA 02	14,99 ± 0,98	3,26 ± 0,12
BA 03	19,80 ± 1,21	3,64 ± 0,29
BA 04	21,12 ± 1,00	3,24 ± 0,10
BA 05	31,92 ± 0,90	3,07 ± 0,11
BA 06	18,91 ± 0,75	2,56 ± 0,05
SE 01	14,22 ± 0,89	11,14 ± 0,29
SE 02	19,58 ± 0,84	12,48 ± 0,88
SE 03	12,60 ± 0,11	6,36 ± 1,43
SE 04	13,76 ± 1,24	6,90 ± 1,09
SE 05	19,44 ± 0,65	3,33 ± 0,14
SE 06	18,66 ± 1,23	5,52 ± 0,28
SE 07	18,81 ± 0,75	6,30 ± 0,12
SE 08	18,30 ± 0,50	5,25 ± 0,13
SE 09	20,87 ± 1,25	4,77 ± 0,24
SE 10	20,26 ± 1,94	2,52 ± 0,23
SE 11	18,87 ± 0,79	2,48 ± 0,23
RN 01	23,95 ± 0,35	3,40 ± 0,04
RN 02	24,60 ± 0,58	5,77 ± 0,06

“Continua”

“Tabela 22 Continuação”

Código das amostras	Fenólicos totais (mg GAE/g de pólen)*	Flavonoides totais (mg de quercetina/g de pólen)*
ES 01	16,75 ± 1,78	4,91 ± 0,83
SP 01	25,85 ± 0,60	9,62 ± 0,42
SP 02	23,20 ± 1,30	4,99 ± 1,15
SP 03	21,26 ± 2,22	4,85 ± 0,53
SP 04	15,28 ± 2,46	3,94 ± 0,83
SP 05	32,14 ± 2,88	3,71 ± 0,25
SP 06	29,89 ± 3,24	2,55 ± 0,04
SP 07	27,62 ± 2,09	2,51 ± 0,28
SP 08	17,64 ± 1,57	2,96 ± 0,33
SP 09	17,88 ± 1,01	2,83 ± 0,32
SP 10	18,13 ± 0,42	2,73 ± 0,02
SP 11	25,64 ± 0,88	3,47 ± 0,02
SP 12	23,20 ± 0,99	5,16 ± 0,18
SP 13	31,18 ± 1,22	3,61 ± 0,28
SP 14	26,96 ± 0,41	4,70 ± 0,00
SP 15	23,62 ± 3,25	4,95 ± 0,27
SP 16	25,30 ± 0,58	4,32 ± 0,10
SP 17	27,02 ± 0,67	3,81 ± 0,12
SP 18	36,98 ± 0,28	6,12 ± 0,09
SP 19	35,47 ± 0,90	5,66 ± 0,27
SP 20	84,22 ± 0,68	2,46 ± 0,02
SP 21	35,00 ± 3,35	10,58 ± 0,17
SP 22	51,08 ± 0,94	1,90 ± 0,22
SP 23	30,72 ± 1,13	4,78 ± 0,79
SP 24	64,45 ± 1,78	13,05 ± 0,21

“Continua”

“Tabela 22 Continuação”

Código das amostras	Fenólicos totais (mg GAE/g de pólen)*	Flavonoides totais (mg de quercetina/g de pólen)*
DF 01	43,97 ± 1,03	4,06 ± 0,31
DF 02	28,35 ± 0,97	4,24 ± 0,64
MT 01	16,56 ± 0,25	4,65 ± 0,17
MT 02	14,82 ± 0,32	4,43 ± 0,14
MT 03	15,61 ± 1,07	5,61 ± 0,28
SC 01	29,38 ± 0,71	4,18 ± 0,13
SC 02	29,37 ± 0,56	3,68 ± 0,15
SC 03	25,51 ± 0,74	3,60 ± 0,07
SC 04	24,55 ± 0,20	3,66 ± 0,18
SC 05	26,86 ± 0,25	4,50 ± 0,09
SC 06	26,46 ± 0,62	4,27 ± 0,18
SC 07	30,17 ± 2,89	4,31 ± 0,06
SC 08	31,68 ± 2,27	4,33 ± 0,07
RS 01	67,98 ± 2,84	36,85 ± 1,01
RS 02	35,13 ± 0,55	7,27 ± 0,37
RS 03	70,04 ± 8,76	20,25 ± 0,40
RS 04	50,75 ± 3,41	12,34 ± 0,58
RS 05	32,29 ± 0,68	20,13 ± 0,16

* Análises realizadas em triplicada e resultados expressos em média ± desvio padrão.

(GAE: equivalentes em ácido gálico).

Os resultados encontrados para fenólicos totais variaram entre 12,60 e 84,22 mg GAE/g de pólen enquanto que para flavonóides totais variou entre 1,90 e 36,85 mg de quercetina/g de pólen. Neves, Alencar e Carpes (2009) em amostras de pólen apícola desidratado dos estados de Alagoas, Bahia, Sergipe e Minas Gerais encontraram valores entre 6,9 e 13,78 mg GAE/g de polen e 3,46 e 6,87mg de quercetina/g para fenólicos totais e flavonoides totais, respectivamente. Carpes *et al.*, (2007, 2008) ao analisar amostras desidratadas de pólen apícola provenientes do Sul do Brasil encontraram resultados que oscilaram entre 19,28 e 48,90 mg

GAE/g para fenólicos totais e valores entre 2,10 a 28,33 mg de quercetina/g de pólen para flavonoides totais enquanto que para amostras do Paraná e Alagoas foram relatados respectivamente os valores de 10,90 e 8,10 mg GAE/g para fenólicos totais. Liberato *et al.*, (2009) ao avaliarem amostras produzidas no estado do Ceará reportaram valores de 17,79 a 19,52 mg GAE/g de pólen apícola para fenólicos totais e valores entre 6,90 e 8,26 mg de quercetina/g de pólen para flavonoides totais. Vecchia *et al.*, (2009) analisaram amostras provenientes do estado do Paraná, tendo encontrado valores entre 5,36 e 42,79 mg GAE/g de pólen apícola desidratado para fenólicos totais e valores entre 0,63 e 28,74 mg de quercetina/g de pólen para flavonóides totais, enquanto que Menezes *et al.*, (2010) relataram valores de 14,31 a 64,14 GAE/g de pólen apícola desidratado para fenólicos totais em amostras produzidas na da região de Alagoinhas, no estado da Bahia.

5.6 Atividade Antioxidante:

Na Tabela 23 apresentam-se os resultados obtidos para a atividade antioxidante determinada pelos três métodos utilizados.

Tabela 23 - Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β-caroteno (%), ORAC (Conc. μmols eq. trolox /g pólen).

Código da amostra	EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato) *	Sistema β-caroteno (%) *	ORAC (Conc. μmols eq. trolox /g pólen) *
BA 01	1,30 ± 0,02	67,14 ± 1,79	251,06 ± 7,68
BA 02	3,51 ± 0,16	54,60 ± 3,36	132,98 ± 1,58
BA 03	3,87 ± 0,36	75,31 ± 0,95	204,97 ± 2,43
BA 04	5,74 ± 0,20	79,23 ± 4,13	206,45 ± 13,00
BA 05	2,47 ± 0,10	84,77 ± 2,79	359,80 ± 32,83
BA 06	4,95 ± 0,23	78,70 ± 2,13	195,41 ± 1,94
SE 01	5,01 ± 0,15	52,58 ± 1,80	292,61 ± 17,68
SE 02	1,38 ± 0,05	87,15 ± 3,52	240,36 ± 2,09
SE 03	2,63 ± 0,07	70,53 ± 1,49	258,69 ± 2,62
SE 04	4,27 ± 0,11	61,63 ± 3,41	294,69 ± 3,71
SE 05	5,23 ± 0,02	81,71 ± 3,88	184,18 ± 1,21
SE 06	4,06 ± 0,33	85,39 ± 2,03	237,31 ± 36,71
SE 07	6,24 ± 0,64	85,81 ± 1,77	205,89 ± 22,10
SE 08	4,78 ± 0,49	84,62 ± 3,00	189,66 ± 4,93
SE 09	3,17 ± 0,29	87,16 ± 3,16	228,47 ± 21,95
SE 10	4,13 ± 0,32	75,60 ± 4,42	195,15 ± 12,77
SE 11	5,09 ± 0,13	80,44 ± 6,27	183,64 ± 13,53
RN 01	8,08 ± 0,33	83,77 ± 2,11	242,35 ± 4,16
RN 02	4,25 ± 0,02	83,90 ± 1,69	220,75 ± 10,65

“Continua”

“Tabela 23 Continuação”

Código da amostra	EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato) *	Sistema β-caroteno (%) *	ORAC (Conc. μmols eq. trolox /g pólen) *
ES 01	2,20 ± 0,01	57,30 ± 1,38	228,13 ± 3,36
SP 01	3,74 ± 0,08	63,55 ± 0,98	208,04 ± 6,29
SP 02	2,16 ± 0,03	70,30 ± 5,80	256,15 ± 19,40
SP 03	1,17 ± 0,09	78,54 ± 6,29	207,89 ± 16,42
SP 04	1,07 ± 0,01	75,51 ± 1,88	235,70 ± 48,27
SP 05	3,19 ± 0,25	72,30 ± 3,76	338,32 ± 33,38
SP 06	3,54 ± 0,09	89,75 ± 3,34	285,61 ± 27,11
SP 07	3,34 ± 0,19	85,97 ± 0,55	287,89 ± 27,37
SP 08	4,05 ± 0,29	78,25 ± 1,89	241,94 ± 15,73
SP 09	4,61 ± 0,33	75,61 ± 2,63	183,42 ± 16,26
SP 10	4,19 ± 6,59	79,99 ± 4,19	199,10 ± 21,29
SP 11	2,59 ± 0,03	87,98 ± 4,55	240,34 ± 6,90
SP 12	2,67 ± 0,01	86,70 ± 6,08	339,81 ± 10,06
SP 13	2,09 ± 0,08	94,34 ± 1,51	176,29 ± 19,09
SP 14	2,22 ± 0,24	72,52 ± 1,43	267,82 ± 9,66
SP 15	2,74 ± 0,06	82,06 ± 6,00	179,88 ± 18,27
SP 16	1,84 ± 0,27	80,24 ± 4,72	229,25 ± 22,93
SP 17	2,93 ± 0,10	89,78 ± 1,82	229,81 ± 8,09
SP 18	2,50 ± 0,47	90,29 ± 2,77	394,92 ± 17,66
SP 19	2,29 ± 0,39	97,30 ± 1,28	375,47 ± 16,13
SP 20	0,93 ± 0,16	96,67 ± 0,05	180,38 ± 11,06
SP 21	1,14 ± 0,04	90,96 ± 2,18	318,47 ± 13,70
SP 22	0,70 ± 0,02	95,80 ± 1,35	314,56 ± 18,49
SP 23	1,53 ± 0,01	94,17 ± 1,81	290,14 ± 9,58
SP 24	0,37 ± 0,02	95,59 ± 1,75	575,85 ± 11,67

“Continua”

"Tabela 23 Continuação"

Código da amostra	EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato) *	Sistema β-caroteno (%) *	ORAC (Conc. μmols eq. trolox /g pólen) *
DF 01	0,35 ± 0,02	73,65 ± 0,59	285,99 ± 5,66
DF 02	1,30 ± 0,11	90,28 ± 4,99	399,83 ± 39,58
MT 01	8,68 ± 0,99	80,89 ± 1,67	189,61 ± 10,99
MT 02	12,17 ± 1,41	57,64 ± 9,44	152,63 ± 16,08
MT 03	13,42 ± 2,74	59,41 ± 1,51	155,32 ± 14,13
SC 01	1,69 ± 0,18	98,37 ± 0,36	412,35 ± 41,03
SC 02	2,28 ± 0,02	92,22 ± 2,47	321,07 ± 16,44
SC 03	2,04 ± 0,01	92,74 ± 2,35	311,79 ± 15,67
SC 04	1,99 ± 0,14	84,95 ± 5,28	345,06 ± 6,84
SC 05	1,80 ± 0,02	94,84 ± 0,62	392,58 ± 13,85
SC 06	1,80 ± 0,02	89,48 ± 0,57	362,60 ± 13,69
SC 07	2,15 ± 0,03	95,81 ± 0,25	403,30 ± 14,36
SC 08	1,41 ± 0,05	89,47 ± 4,38	342,73 ± 7,92
RS 01	0,40 ± 0,15	85,90 ± 4,31	513,80 ± 12,45
RS 02	1,48 ± 0,30	84,49 ± 2,96	503,17 ± 28,59
RS 03	2,16 ± 0,10	81,51 ± 1,96	416,55 ± 9,73
RS 04	2,21 ± 0,51	88,50 ± 2,54	567,76 ± 30,92
RS 05	0,44 ± 0,07	95,15 ± 1,11	455,37 ± 8,95

* Análises realizadas em triplicada e resultados expressos em média ± desvio padrão.

Os valores obtidos para o BHT (butil hidroxitolueno), α-tocoferol e BHA (butil hidroxianisol) foram EC₅₀ = 17,06 ug/mL; EC₅₀ = 16,55 ug/mL EC₅₀ = 8,47 ug/mL, respectivamente.

Para determinar a atividade antioxidante das amostras foi realizada uma série de diluições a fim de se obter dados para diferentes concentrações (20 a 0,025 mg de pólen/mL de solução). O EC₅₀ foi determinado no intervalo que apresentou linearidade e a atividade antioxidante foi inversamente proporcional ao EC₅₀.

Observou-se que à concentração de 10 mg de pólen/mL de solução evidenciou a máxima atividade antioxidante para maioria das amostras. As amostras DF 01, RN 01, RS 01 a 05, SP20 a 24 e BA 05 apresentaram atividade antioxidante máxima em concentrações inferiores a 10 mg de

pólen/mL de solução, e consequentemente um EC_{50} baixo, sugerindo uma elevada atividade antioxidante dos compostos presentes no extrato etanólico. Carpes *et al.*, (2008) para determinarem a atividade antioxidante dos extratos utilizaram uma concentração de 2,7 mg de pólen/mL de solução; enquanto que Vecchia (2010) testou extratos à concentração de 6,6 mg pólen/mL de solução. A atividade antioxidante obtida por estes investigadores foi idêntica a determinada neste trabalho, quando se utilizaram 10 mg de pólen/mL de solução. Os antioxidantes sintéticos utilizados como controle apresentaram atividade antioxidante superior a das amostras analisadas, lembrando-se que a concentração dos mesmos foi bem menor que a concentração de pólen apícola utilizadas nas soluções. Para facilitar a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com os dados descritos na literatura optamos por apresentar somente os valores do EC_{50} .

Os produtos da colmeia são considerados como ótimas fontes de antioxidantes, sendo que os estudos de Campos *et al.*, (2000), Campos, Webby e Markham (2002), Lopes *et al.*, (2011) e Moraes *et al.* (2011) sobre as propriedades antioxidantes do pólen apícola, confirmaram a alta atividade antioxidante deste produto. Os resultados encontrados para a atividade antioxidante do pólen apícola brasileiro são consideravelmente diferentes entre as amostras, tendo para o EC_{50} valores entre 0,35 a 13,42 mg pólen/mL extrato. Carpes *et al.*, (2008) ao avaliarem a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de pólen apícola proveniente da região sul do Brasil obtiveram valores de EC_{50} que variaram entre 0,81 a 4,69 mg pólen/mL extrato. Meda *et al.*, (2005) ao avaliarem 27 amostras de mel com origens geográficas variadas de Burkina Faso, na África encontraram resultado médio de 10,60 mg/mL de extrato, Campos *et al.*, (2003) ao avaliarem amostras de pólen apícola coletadas em Portugal e Nova Zelândia encontraram valores de EC_{50} entre 0,04 a 0,5 mg de pólen/mL de extrato.

Quando utilizado o método do β -caroteno foram observados valores entre 52,58 e 98,37 % para a atividade antioxidante das amostras (Tabela 23). Os controles BHT, α -tocoferol e BHA, apresentaram resultados de 95,75 %; 97,30 % e 97,89 % respectivamente.

Este método determina a capacidade de um antioxidante proteger um substrato lipídico (no caso, o β -caroteno) através da inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Essas variações podem ser causadas pelas diferenças em suas potencialidades e/ou na concentração das várias substâncias redutoras, principalmente a ampla classe dos compostos fenólicos. No estudo efetuado por Carpes *et al.*, (2008), que avaliaram a atividade antioxidantes de amostras de pólen apícola provenientes do sul do Brasil, utilizando-se o mesmo método de análise, observaram que as atividades antioxidantes dos extratos de pólen apícola variaram de 69,78 a 93,12% (média de 83,60%).

O método ORAC é muito sensível e verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente à formação de um radical induzido de 2,2' – azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C. O radical reage com um composto fluorescente formando um produto não fluorescente. O efeito protetor do antioxidante é verificado calculando-se a área formada sob a curva de decréscimo da fluorescência da amostra versus tempo, quando comparada com o controle, que não apresenta atividade antioxidante. Quando quantificada pelo método do ORAC, a atividade antioxidante variou entre 132,98 a 575,85 μ mol eq. Trolox /g pólen (Tabela 23).

A referência encontrada para a atividade antioxidante do pólen apícola avaliada pelo método de ORAC foi o folder do Laboratório Brunswick (16 de outubro de 2002) que cita resultados idênticos aos determinados neste trabalho em pólen (não está especificado se é desidratado). O laboratório comparou os dados obtidos para a atividade antioxidante do High Desert® pólen apícola da CC Pólen Co. com os valores de outros alimentos integrais. Verificou-se para o pólen High Desert Bee um valor de 247 μ mol eq. Trolox/g de pólen (High Desert Bee). Dentre os outros alimentos o valor mais alto foi o obtido para a

framboesa preta (164 $\mu\text{mols eq Trolox/g}$), seguido da romã (105 $\mu\text{mols eq Trolox/g}$). Não foram encontrados trabalhos científicos que tenham utilizado o ORAC para avaliar a atividade antioxidante do pólen apícola. Os resultados encontrados para as amostras de pólen apícola aqui estudadas são superiores a maioria dos alimentos referenciados na tabela da USDA [Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods – 2007] e comparáveis aos produtos derivados do chocolate da mesma tabela.

O uso de concentrações distintas dos extratos de pólen apícola nos três métodos de avaliação da atividade antioxidante torna difícil a comparação direta dos resultados entre os métodos. Isto foi também observado por Carpes *et al.*, (2008) no trabalho realizado com o pólen apícola desidratado coletado na região Sul do Brasil em que a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH e β -caroteno. Todas as amostras apresentaram resultados diferentes quando avaliadas pelos três métodos utilizados na quantificação da atividade antioxidante, o que pode ser explicado pelas diferenças de mecanismos de reação envolvidos, isto é, a amostra pode apresentar alta atividade antioxidante quando se usa um método e não ter os mesmos resultados quando se utiliza outro.

Para melhor visualização dos resultados relativos à atividade antioxidante, apresentados na Tabela 23, os dados foram agrupados por região de coleta e apresentados na forma de gráficos (Figuras 29 a 33).

Figura 29 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para fenólicos totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta.

a, b = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

Figura 30 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para flavonóides totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta. a, b = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

Figura 31 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a atividade antioxidante (DPPH) das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta. a, b, c = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

Figura 32 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a atividade antioxidante (ORAC) totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta. a, b = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

Figura 33 - Representação gráfica das médias dos resultados obtidos para a atividade antioxidante (sistema β -caroteno/ácido linoleico) totais das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta. a, b = diferenças estatisticamente significativas entre as regiões de coleta.

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros relativos à atividade antioxidante das amostras de pólen apícola desidratado segundo a região brasileira de coleta.

Tabela 24 - Resultados da variação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β-caroteno (%), ORAC (Conc. μmols eq.trolox /g pólen), agrupadas segundo região de coleta pelo teste de ANOVA.

Variável	Região	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Fenólicos Totais (mg GAE/g de pólen)	Nordeste	19,28	4,42	18,91	12,61	31,92	19	0,002
	Centro-Oeste	23,86	12,52	16,56	14,83	43,97	5	
	Sudeste	30,66	15,54	26,96	15,28	84,22	25	
	Sul	36,94	15,70	30,17	24,55	70,04	13	
	Total	27,94	14,30	24,95	12,61	84,22	62	
Flavonoides Totais (mg de quercetina/g de pólen)	Nordeste	5,06	2,77	4,15	2,48	12,48	19	0,025
	Centro-Oeste	4,60	0,61	4,43	4,06	5,61	5	
	Sudeste	4,81	2,66	4,32	1,90	13,05	25	
	Sul	9,95	10,10	4,33	3,60	36,85	13	
	Total	5,95	5,43	4,33	1,90	36,85	62	
DPPH EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato)	Nordeste	4,18	1,63	4,25	1,30	8,09	19	<0,001
	Centro-Oeste	7,77	5,47	8,68	0,35	13,42	5	
	Sudeste	2,74	2,27	2,22	0,37	12,16	25	
	Sul	1,68	0,62	1,80	0,40	2,28	13	
	Total	3,37	2,72	2,48	0,35	13,42	62	
ORAC (Conc. μmols eq.Trolox /g polen)	Nordeste	228,02	49,73	220,75	140,99	359,80	19	<0,001
	Centro-Oeste	255,17	100,06	221,98	152,63	399,83	5	
	Sudeste	272,29	88,13	242,93	169,88	575,85	25	
	Sul	411,39	79,22	403,30	311,79	567,76	13	
	Total	286,51	101,14	253,61	140,99	575,85	62	
sistema β-caroteno/ácido linoleico (%)	Nordeste	76,84	10,76	80,44	52,58	87,16	19	0,001
	Centro-Oeste	72,38	13,96	73,65	57,64	90,28	5	
	Sudeste	83,39	10,71	85,97	57,30	97,30	25	
	Sul	90,27	5,10	89,48	81,51	98,37	13	
	Total	81,94	11,34	84,56	52,58	98,37	62	

DP= desvio padrão, N= número de amostras avaliadas, p= Nível descritivo do teste estatístico.

A Tabela 24 mostra que houve diferença significativa entre as médias para todos a os parâmetros antioxidantes quantificados para as amostras de pólen apícola desidratado segundo a região de coleta ($p < 0,05$).

A Tabela 25 apresenta os resultados das comparações para os parâmetros relativos a atividade antioxidante obtidos para as amostras de pólen apícola desidratado e comparação entre as amostras (região de coleta) pelo teste de Tukey.

Tabela 25 - Resultados das comparações para atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β-caroteno (%), ORAC (Conc. μmols eq. Trolox /g pólen entre as regiões de coleta pelo teste de Tukey.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p*
Fenólicos totais (mg GAE/g de pólen)	Nordeste - Centro-Oeste	-4,59	6,51	0,895
	Nordeste - Sudeste	-11,38	3,94	0,027
	Nordeste - Sul	-17,66	4,66	0,002
	Centro-Oeste - Sudeste	-6,80	6,35	0,709
	Centro-Oeste - Sul	-13,07	6,82	0,232
	Sudeste - Sul	-6,28	4,43	0,494
Flavonóides totais (mg de quercetina/g de pólen)	Nordeste - Centro-Oeste	0,46	2,58	0,998
	Nordeste - Sudeste	0,25	1,56	0,998
	Nordeste - Sul	-4,89	1,85	0,050
	Centro-Oeste - Sudeste	-0,21	2,52	>0,999
	Centro-Oeste - Sul	-5,35	2,71	0,208
	Sudeste - Sul	-5,14	1,76	0,025
DPPH EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato)	Nordeste - Centro-Oeste	-3,59	1,14	0,013
	Nordeste - Sudeste	1,44	0,69	0,167
	Nordeste - Sul	2,50	0,81	0,016
	Centro-Oeste - Sudeste	5,03	1,11	<0,001
	Centro-Oeste - Sul	6,09	1,19	<0,001
	Sudeste - Sul	1,06	0,77	0,519
ORAC (Conc. μmols eq. Trolox /g pólen)	Nordeste - Centro-Oeste	-27,15	38,84	0,897
	Nordeste - Sudeste	-44,27	23,52	0,247
	Nordeste - Sul	-183,37	27,81	<0,001
	Centro-Oeste - Sudeste	-17,12	37,85	0,969
	Centro-Oeste - Sul	-156,22	40,66	0,002
	Sudeste - Sul	-139,10	26,42	<0,001
sistema β-caroteno/ácido linoleico (%)	Nordeste - Centro-Oeste	4,47	5,08	0,816
	Nordeste - Sudeste	-6,55	3,08	0,157
	Nordeste - Sul	-13,42	3,64	0,003
	Centro-Oeste - Sudeste	-11,02	4,95	0,129
	Centro-Oeste - Sul	-17,89	5,32	0,007
	Sudeste - Sul	-6,87	3,46	0,204

* Nível descritivo do teste estatístico

Pela Tabela 25, tem-se que o conteúdo médio para fenólicos totais foi menor para as amostras da região Nordeste quando comparado com o das amostras das regiões Sudeste e Sul ($p = 0,027$ e $p = 0,002$ respectivamente). O conteúdo médio para flavonóides totais foi maior na região Sul em comparação com as regiões Nordeste ($p = 0,050$) e com a região Sudeste ($p = 0,025$). A atividade sequestrante do radical livre DPPH foi expressa em termos de EC_{50} . Desta forma, quanto maior o seu valor, menor é a capacidade antioxidante dos compostos presentes. A atividade antioxidante quantificada pelo método de DPPH foi menor na região Centro-Oeste quando comparada a todas as demais regiões ($p < 0,05$) e maior na região Sul quando comparada com a região Nordeste ($p = 0,016$). A atividade antioxidante quantificada pelo método de ORAC foi maior na região Sul quando comparado a todas as demais regiões ($p < 0,05$). A atividade antioxidante quantificada pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi maior na região Sul quando comparada com a região Nordeste ($p = 0,003$) e Centro-Oeste ($p = 0,007$).

De modo geral as amostras de pólen apícola desidratado, produzidas na região Sul seguidas pelas amostras produzidas na região Sudeste apresentaram maiores concentrações de compostos bioativos e atividade antioxidante mais elevada quando comparadas com as demais regiões.

5.7 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi quantificada pelo método da microdiluição em placa e como material biológico utilizou-se uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*), uma bactéria Gram-positiva (*Staphilococcus epidermides*) e uma levedura (*Candida albicans*). Todos estes microrganismos provocam frequentemente doenças nosocomiais. A Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi utilizada como parâmetro para quantificar os efeitos negativos induzidos pelo pólen apícola desidratado no crescimento dos microrganismos testados. Os resultados estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Atividade antimicrobiana (Concentração mínima inibitória) dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado.

Código das amostras	<i>E. coli</i> * % (p/v)	<i>S. epidermides</i> * % (p/v)	<i>C. albicans</i> * % (p/v)
BA 01	2,00 ± 0,44	0,98 ± 0,13	10,54 ± 1,90
BA 02	1,89 ± 0,39	1,89 ± 0,48	11,62 ± 1,25
BA 03	4,83 ± 0,76	1,70 ± 0,35	11,17 ± 1,26
BA 04	4,50 ± 0,50	1,23 ± 0,25	13,17 ± 1,26
BA 05	6,40 ± 0,56	2,50 ± 0,50	18,67 ± 0,28
BA 06	6,50 ± 0,87	2,50 ± 0,50	18,67 ± 1,15
SE 01	3,17 ± 0,61	1,27 ± 0,20	10,97 ± 0,54
SE 02	6,55 ± 0,65	1,42 ± 0,41	10,63 ± 1,72
SE 03	4,96 ± 0,72	1,10 ± 0,19	10,91 ± 1,12
SE 04	2,27 ± 0,26	1,07 ± 0,14	11,03 ± 1,80
SE 05	3,38 ± 0,416	1,03 ± 0,15	11,83 ± 1,61
SE 06	5,37 ± 0,81	2,33 ± 0,35	16,17 ± 2,02
SE 07	6,90 ± 0,36	2,00 ± 0,10	11,33 ± 0,76
SE 08	4,93 ± 0,41	1,23 ± 0,31	11,80 ± 1,08
SE 09	6,30 ± 0,26	2,18 ± 0,39	13,90 ± 1,35
SE 10	5,27 ± 0,93	1,72 ± 0,41	11,33 ± 1,53
SE 11	7,23 ± 0,25	2,57 ± 0,45	18,33 ± 1,041
RN 01	7,07 ± 0,40	2,70 ± 0,52	18,60 ± 0,80
RN 02	3,93 ± 0,55	1,13 ± 0,32	10,58 ± 0,72

"Continua"

"Tabela 26 Continuação"

Código das amostras	<i>E. coli</i> * % (p/v)	<i>S. epidermidis</i> * % (p/v)	<i>C. albicans</i> * % (p/v)
ES 01	5,17 ± 0,23	1,58 ± 0,38	14,10 ± 1,81
SP 01	3,90 ± 0,60	1,63 ± 0,41	11,87 ± 0,40
SP 02	4,90 ± 0,56	2,86 ± 0,60	13,01 ± 1,75
SP 03	4,41 ± 1,21	1,13 ± 0,16	10,90 ± 1,19
SP 04	6,17 ± 0,18	2,06 ± 0,13	19,03 ± 0,77
SP 05	2,53 ± 0,69	1,57 ± 0,21	10,81 ± 0,89
SP 06	3,16 ± 0,52	1,52 ± 0,26	13,04 ± 0,61
SP 07	5,97 ± 0,25	2,40 ± 0,62	14,83 ± 1,75
SP 08	7,48 ± 1,00	1,81 ± 0,28	13,53 ± 1,76
SP 09	4,78 ± 0,71	1,04 ± 0,11	13,13 ± 0,85
SP 10	2,60 ± 0,65	2,84 ± 0,76	11,73 ± 1,77
SP 11	4,25 ± 0,50	2,08 ± 0,38	14,33 ± 2,08
SP 12	5,45 ± ,078	1,58 ± 0,14	12,93 ± 1,44
SP 13	5,45 ± 1,07	2,47 ± 0,55	13,17 ± 1,75
SP 14	4,60 ± 0,76	1,26 ± 0,21	11,67 ± 1,89
SP 15	6,50 ± 0,60	2,47 ± 0,55	18,07 ± 0,40
SP 16	4,42 ± 0,66	1,16 ± 0,29	10,83 ± 1,04
SP 17	4,00 ± 0,50	1,37 ± 0,42	10,23 ± 0,87
SP 18	6,53 ± 0,55	2,87 ± 0,23	18,33 ± 1,15
SP 19	3,33 ± 0,58	1,20 ± 0,44	10,30 ± 0,61
SP 20	3,90 ± 0,36	1,23 ± 0,31	10,67 ± 2,08
SP 21	4,30 ± 0,82	1,57 ± 0,40	11,67 ± 1,89
SP 22	6,47 ± 0,55	2,30 ± 0,27	18,33 ± 1,26
SP 23	5,33 ± 1,00	1,70 ± 0,62	12,67 ± 2,08
SP 24	4,00 ± 0,50	1,05 ± 0,13	10,83 ± 1,26

"Continua"

"Tabela 26 Continuação"

Código das amostras	<i>E. coli</i> * % (p/v)	<i>S. epidermides</i> * % (p/v)	<i>C. albicans</i> * % (p/v)
DF 01	4,27 ± 0,67	2,08 ± 0,63	11,63 ± 1,16
DF 02	3,83 ± 0,29	1,17 ± 0,29	12,33 ± 0,57
MT 01	5,95 ± 0,18	2,67 ± 0,68	13,33 ± 0,53
MT 02	4,60 ± 0,66	1,24 ± 0,21	11,33 ± 1,53
MT 03	7,00 ± 0,46	2,37 ± 0,55	17,67 ± 1,74
SC 01	6,07 ± 0,31	1,20 ± 0,23	10,73 ± 1,17
SC 02	4,70 ± 0,60	2,03 ± 0,45	16,33 ± 2,08
SC 03	2,60 ± 0,75	2,53 ± 0,57	13,00 ± 2,00
SC 04	5,77 ± 0,49	1,77 ± 0,58	11,47 ± 1,55
SC 05	3,47 ± 0,63	1,05 ± 0,19	11,43 ± 1,40
SC 06	3,50 ± 0,50	2,27 ± 0,25	10,40 ± 0,96
SC 07	6,40 ± 0,85	2,08 ± 0,38	18,33 ± 1,15
SC 08	4,57 ± 0,51	1,16 ± 0,29	11,00 ± 0,87
RS 01	6,47 ± 0,90	2,50 ± 0,50	18,63 ± 0,32
RS 02	6,20 ± 1,08	1,83 ± 1,04	10,83 ± 1,05
RS 03	4,00 ± 0,50	1,30 ± 0,35	10,23 ± 0,25
RS 04	5,47 ± 0,55	2,20 ± 0,27	11,33 ± 1,04
RS 05	6,53 ± 0,55	2,87 ± 0,23	18,83 ± 0,29

* Análises realizadas em triplicada e resultados expressos em média ± desvio padrão.

Há milhares de anos os produtos naturais têm sido utilizados para em medicina tradicional, em todo o mundo (ÖZAN, *et al.*, 2007). As substâncias naturais têm demonstrado ação antibacteriana, principalmente porque grande parte dos vegetais utilizados na medicina alternativa é constituída por flavonoides, ácido cafeíco, ácido benzoico e ácido cinâmico que agem sobre as células bacterianas rompendo a membrana citoplasmática ou destruindo a parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais. Podendo também inibir a atividade de muitas enzimas (NASCIMENTO *et al.*, 2000, UZEL *et al.*, 2005, SCAZZOCCHIO *et al.*, 2006, NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Pela análise da tabela 26 verificou-se que todos os extratos estdados evidenciaram atividade antimicrobiana, e mostraram seletividade

e MICs diferentes para cada microrganismo. De fato, o pólen apícola desidratado inibiu o crescimento de todos os microrganismos em estudo, sendo o efeito dependente do gênero como também foi observado por Fatrocová-Šramková *et al.*, (2013). *Candida albicans* evidenciou maior resistência, sendo *Staphylococcus epidermides* mais sensível (Tabela 26). A bactéria gram-positiva (*S. epidermides*) apresentou MICs que oscilaram entre 0,98 e 2,87% (p/v). Para *E. coli* observaram-se valores que variaram entre 1,8 e 7,48% (p/v) e, para *Candida albicans* entre 10,23 e 18,83 % (p/v). Moraes *et al.*, (2011) observaram que extratos de pólen apícola português inibiram o crescimento de bactérias em concentrações igualmente muito baixas. Knazovická *et al.*, (2009) e Kacaniová *et al.*, (2012) atribuíram a variação da atividade antimicrobiana do pólen apícola e da própolis aos seus constituintes fenólicos e a presença de compostos não voláteis nos extratos. Pereira *et al.*, (2007) e Estevinho *et al.*, (2008) demonstraram que a atividade antimicrobiana de nozes e do mel estava relacionada com a quantidade de compostos fenólicos totais. Este fato não foi observado no trabalho de Moraes *et al.*, (2011) em que o extrato de pólen apícola, com menor teor de compostos fenólicos totais foi o mais eficaz contra microrganismos. Isto sugere que, outros fatores podem estar envolvidos, especificamente a natureza da fração fenólica testada no estudo. Neste estudo e à semelhança do reportado por Moraes *et al.*, (2011), Graikou *et al.*, (2011), Abouda *et al.*, (2011), Fatrocová-Šramková *et al.*, (2013) as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos do pólen apícola do que as bactérias Gram-negativas.

Os extratos de própolis também evidenciaram atividade antibacteriana mais elevada contra bactérias Gram-positivas e limitada contra Gram-negativas (LU, CHEN e CHOU, 2005; REZENDE, PIMENTA e COSTA, 2006). Ainda não se conhece exatamente a razão desta menor atividade dos extratos de produtos apícolas contra as bactérias Gram-negativas, algumas hipóteses apontam que a resistência desses microrganismos estaria relacionada ao fato de possuírem uma parede celular quimicamente mais complexa, apesar de flexível, e por apresentarem um teor lipídico mais elevado do que o observado em

bactérias Gram-positivas (NASCIMENTO *et al.*, 2000; VARGAS *et al.*, 2004; OZKALP e OZCAN, 2010; MORAIS *et al.*, 2011).

Carpes *et al.* (2007) realizaram um estudo para determinar a atividade antioxidante, compostos fenólicos e atividade antibacteriana de extratos de pólen obtidos com diferentes concentrações de etanol (40 a 90%) para amostras de pólen apícola desidratadas coletas nos estados de Alagoas e do Paraná, observando que *Staphylococcus aureus* foi inibido pelo extrato etanólico de Alagoas, em todas as concentrações, exceto no extrato etanólico do pólen de 90%. O extrato a 60% da solução de etanol (amostra do Paraná) inibiu os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella*. Gondim *et al.* (2011) verificaram o efeito antimicrobiano do pólen apícola na concentração de 5% (em etanol 70%) sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei*, constatando que o pólen apícola foi eficiente contra todas as bactérias. Contrariando os resultados observados neste e nos trabalhos citados, Carpes *et al.*, (2009c) avaliaram trinta e seis amostras de pólen apícola desidratado provenientes da região Sul do Brasil e constataram que apesar de apresentarem altos teores de compostos fenólicos e de flavonoides nenhum dos extratos etanólicos de pólen apícola inibiu o crescimento dos microrganismos (*Bacillus subtilis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas vesicatoria* pv. vesicatoria, *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria e *Pseudomonas syringae* pv.) no teste de difusão agar e também não apresentaram atividade inibitória nem bactericida pelos testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Na globalidade, os resultados obtidos por este e pelos demais autores sugerem que a origem botânica das amostras interfere diretamente em sua ação biológica.

Os resultados obtidos sugerem a necessidade de efetuar estudos adicionais nomeadamente, no que diz respeito ao isolamento e identificação dos principais compostos ativos responsáveis pela atividade antibacteriana que poderão vir a ser utilizados na indústria farmacêutica,

visto o grande número de microrganismos que têm desenvolvido resistência às drogas antibacterianas já existentes. Nos últimos 60 anos, a resistência de patógenos humanos e animais a antibióticos tem sido um dos casos mais bem documentados de evolução biológica, e constitui o principal problema de saúde pública no mundo, afetando tanto os países desenvolvidos como em desenvolvimento (DAVIES e DAVIES, 2010). Este fato é uma inevitável consequência do uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais. Na Europa e na América do Norte, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), enterococos resistente à vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) têm emergido e se espalhado nos hospitais e nas comunidades (SANTOS, 2004). Baquero e Blázquez (1997) relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, principalmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, e produtos como o pólen apícola, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o pólen de apícola possui compostos fenólicos, e sugere que poderia ser útil na prevenção de doenças em que os radicais livres estão implicados. Também é notável que este produto tenha apresentado potencial como agente antimicrobiano, uma vez que um número crescente de bactérias tem desenvolvido resistência aos antibióticos comerciais. Novos estudos para isolamento dos compostos ativos e ensaios *in vivo* são necessários para que sejam confirmadas as observações oriundas deste trabalho.

A Tabela 27 mostra os resultados da variação para os parâmetros antimicrobianos agrupados por região de coleta.

Tabela 27 - Resultados da variação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado e comparação entre as regiões de coleta pelo teste de ANOVA.

Variável	Região	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
<i>E. coli</i>	Nordeste	4,92	1,75	4,96	2	7	19	0,934
	Centro-Oeste	5,13	1,31	4,60	4	7	5	
	Sudeste	4,78	1,27	4,60	3	7	25	
	Sul	5,05	1,34	5,47	3	7	13	
	Total	4,91	1,42	4,87	2	7	62	
<i>S. epidermides</i>	Nordeste	1,71	0,60	1,70	1	3	19	0,809
	Centro-Oeste	1,91	0,67	2,08	1	3	5	
	Sudeste	1,79	0,59	1,59	1	3	25	
	Sul	1,91	0,58	2,03	1	3	13	
	Total	1,80	0,59	1,71	1	3	62	
<i>C. albicans</i>	Nordeste	13,22	3,14	11,62	11	19	19	>0,999
	Centro-Oeste	13,26	2,58	12,33	11	18	5	
	Sudeste	13,20	2,66	12,93	10	19	25	
	Sul	13,27	3,42	11,43	10	19	13	
	Total	13,23	2,90	11,82	10	19	62	

DP= desvio padrão, N= número de amostras avaliadas, p= Nível descritivo do teste estatístico.

A Tabela 27 mostra que não houve diferença média estatisticamente significativa dos parâmetros antimicrobianos entre as regiões brasileiras ($p > 0,05$).

6.6 Correlações

A Tabela 28 apresenta a contribuição dos tipos polínicos para a composição físico-química (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, glicose e frutose) das amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 28 - Correlação de Spearman entre a composição físico-química e os tipos de pólen presentes nas amostras de pólen apícola desidratado¹.

Tipo polínico		Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Frutose (%)	Glicose (%)
<i>Alternanthera</i>	r	0,032	0,011	0,075	-0,104	-0,004	0,190
	p	0,804	0,934	0,562	0,422	0,978	0,140
<i>Amaranthus / Chenopodiaceae</i>	r	-0,061	-0,129	0,264	-0,275	0,009	-0,225
	p	0,636	0,318	0,038	0,031	0,943	0,078
<i>Ambrosia</i>	r	-0,132	-0,197	0,161	-0,218	0,104	0,168
	p	0,305	0,125	0,211	0,088	0,422	0,191
<i>Antigonon leptopus</i>	r	0,240	-0,184	0,214	-0,021	-0,160	0,024
	p	0,060	0,152	0,095	0,868	0,215	0,853
<i>Anadenanthera</i>	r	0,066	0,198	-0,298	0,175	-0,054	0,283
	p	0,608	0,123	0,019	0,173	0,675	0,026
Apiaceae	r	-0,054	0,054	0,089	-0,168	-0,089	0,111
	p	0,679	0,679	0,489	0,191	0,489	0,391
Asteraceae	r	-0,288	-0,400	0,431	-0,508	-0,068	-0,408
	p	0,023	0,001	<0,001	<0,001	0,600	0,001
Arecaceae	r	0,116	0,042	-0,017	0,077	-0,026	0,076
	p	0,371	0,745	0,898	0,554	0,840	0,556
<i>Brassica</i>	r	-0,240	-0,070	0,238	-0,105	-0,143	-0,244
	p	0,061	0,587	0,062	0,417	0,267	0,056
<i>Brassica napus</i>	r	-0,004	-0,097	0,132	0,118	0,018	0,132
	p	0,978	0,455	0,305	0,361	0,890	0,305
Caesalpinaceae	r	-0,054	0,054	0,089	-0,168	-0,089	0,111
	p	0,679	0,679	0,489	0,191	0,489	0,391
Caryophyllaceae	r	-0,047	-0,054	0,147	-0,140	-0,197	-0,161
	p	0,720	0,679	0,255	0,279	0,125	0,211
<i>Cecropia</i>	r	0,310	-0,222	0,023	0,048	-0,047	0,101
	p	0,014	0,084	0,858	0,714	0,717	0,436
<i>Cocos nucifera</i>	r	-0,127	0,537	-0,360	0,151	0,310	0,059
	p	0,324	<0,001	0,004	0,242	0,014	0,650

“Continua”

"Tabela 28 Continuação"

Tipo polínico		Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Frutose (%)	Glicose (%)
<i>Eucalyptus</i>	r	0,022	0,022	-0,084	0,218	-0,034	0,407
	p	0,868	0,867	0,516	0,089	0,794	0,001
<i>Eupatorium</i>	r	-0,147	-0,218	0,190	-0,068	-0,118	0,140
	p	0,255	0,088	0,140	0,600	0,361	0,279
Euphorbiaceae	r	-0,023	-0,462	0,504	-0,389	-0,124	-0,468
	p	0,858	<0,001	<0,001	0,002	0,336	<0,001
Fabaceae Faboideae espécie1	r	0,077	-0,006	0,068	0,009	0,033	-0,105
	p	0,553	0,962	0,599	0,942	0,799	0,415
Fabaceae	r	0,039	-0,182	0,197	-0,182	-0,082	-0,147
	p	0,761	0,156	0,125	0,156	0,525	0,255
<i>Illex</i>	r	-0,396	-0,105	0,085	-0,119	0,152	-0,028
	p	0,001	0,415	0,511	0,356	0,239	0,831
Malpighiaceae	r	0,175	-0,118	-0,018	0,011	-0,075	0,025
	p	0,173	0,361	0,890	0,934	0,562	0,847
Melastomataceae	r	0,182	-0,025	-0,147	-0,197	0,132	-0,104
	p	0,156	0,847	0,255	0,125	0,305	0,422
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	r	-0,115	-0,170	0,067	-0,030	-0,106	-0,514
	p	0,375	0,187	0,607	0,818	0,413	0,000
<i>Mimosa scabrella</i>	r	0,092	0,057	-0,052	0,022	0,137	0,102
	p	0,479	0,658	0,689	0,865	0,288	0,431
<i>Mimosa verrucosa</i>	r	0,085	0,480	-0,222	0,376	-0,270	-0,053
	p	0,511	<0,001	0,083	0,003	0,034	0,684
<i>Myrcia</i>	r	-0,110	0,543	-0,441	0,339	0,299	0,138
	p	0,393	<0,001	<0,001	0,007	0,018	0,285
Onagraceae	r	-0,147	-0,220	0,191	-0,073	-0,117	0,147
	p	0,259	0,088	0,141	0,574	0,368	0,259
Poaceae	r	0,208	-0,437	0,280	-0,468	-0,075	-0,483
	p	0,104	<0,001	0,028	<0,001	0,562	<0,001
<i>Persea</i>	r	0,197	0,197	-0,182	-0,082	0,068	0,204
	p	0,125	0,125	0,156	0,525	0,600	0,112
<i>Richardia</i>	r	0,061	0,147	0,054	-0,004	-0,032	0,182
	p	0,639	0,255	0,679	0,978	0,804	0,156
<i>Schinus</i>	r	0,130	0,026	-0,009	-0,070	0,144	0,264
	p	0,314	0,840	0,943	0,586	0,263	0,038
<i>Sebastiania</i>	r	-0,192	0,056	0,072	-0,139	0,038	0,038
	p	0,135	0,663	0,576	0,280	0,769	0,771
<i>Syagrus</i>	r	-0,204	0,097	-0,175	0,182	0,036	-0,190
	p	0,112	0,455	0,173	0,156	0,783	0,140
<i>Tapirira</i>	r	0,187	0,313	-0,233	0,082	0,018	0,171
	p	0,145	0,013	0,068	0,528	0,887	0,185
<i>Vernonia</i>	r	-0,069	0,062	-0,025	-0,187	0,026	0,306
	p	0,594	0,632	0,846	0,145	0,839	0,016
Não identificados	r	-0,197	-0,004	0,018	-0,011	0,154	-0,054
	p	0,125	0,978	0,890	0,934	0,233	0,679

¹ N=62; r: coeficiente de correlação de Spearman; p: probabilidade associada ao teste.

Neste trabalho observou-se uma relação diretamente proporcional entre os valores de cinzas e as porcentagens de *Cocos nucifera* (coqueiro), *Mimosa verrucosa* (jurema-branca), *Myrcia* (murta) e *Tapirira* (tapiriri, aroeirana), e inversamente proporcional com Asteraceae (asteraceas), Euphorbiaceae (mamona), Poaceae (milho, trigo, aveia) (Tabela 28). A quantidade de lipídeos nas amostras apresentou correlação positiva com *Amaranthus*, Asteraceae, Poaceae, Euphorbiaceae e correlação negativa com *Anadenanthera* (angico), *Mimosa verrucosa*, *Cocos nucifera* e *Myrcia* (Tabela 28). As proteínas apresentaram correlação positiva com *Mimosa verrucosa* e *Myrcia*, e correlação negativa com *Amaranthus*, Asteraceae, Poaceae e Euphorbiaceae (Tabela 28). Foi encontrada correlação positiva da frutose com *Cocos nucifera* e *Myrcia*, e correlação negativa com *Mimosa verrucosa* (Tabela 28). Para a glicose houve correlação positiva com *Anadenanthera*, *Eucalyptus* (eucalipto), *Schinus* (aroeira) e *Vernonia* (aluman), e correlação negativa com Asteraceae, Euphorbiaceae, *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), Poaceae (Tabela 28).

A Tabela 29 apresenta as correlações entre os tipos polínicos e qualidade sanitária (bactérias e leveduras, aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E.coli*, clostrídios sulfato redutores e *S.aureus*).

Tabela 29 - Correlação de Spearman entre os parâmetros microbiológicos e os tipos de pólen presentes nas amostras de pólen apícola desidratado¹.

Tipo polínico		Contagem de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>S. aureus</i>
<i>Alternanthera</i>	r	0,101	-0,004	-0,119	-0,046	-0,083
	p	0,435	0,977	0,359	0,725	0,520
<i>Amaranthus/ Chenopodiaceae</i>	r	0,133	0,241	0,061	0,393	0,158
	p	0,302	0,059	0,637	0,002	0,220
<i>Ambrosia</i>	r	0,220	0,218	0,180	-0,046	0,267
	p	0,085	0,088	0,162	0,725	0,036
<i>Antigonon leptopus</i>	r	-0,061	-0,076	-0,062	0,191	0,017
	p	0,640	0,558	0,634	0,138	0,899
<i>Anadenanthera</i>	r	-0,144	-0,055	-0,135	-0,080	-0,147
	p	0,264	0,674	0,297	0,535	0,256
Apiaceae	r	0,034	-0,137	-0,119	-0,046	-0,083
	p	0,795	0,289	0,359	0,725	0,520
Asteraceae	r	-0,083	0,027	-0,170	0,180	0,282
	p	0,522	0,833	0,188	0,162	0,026
Arecaceae	r	0,083	0,041	0,035	-0,065	0,103
	p	0,520	0,752	0,788	0,616	0,428
<i>Brassica</i>	r	-0,036	0,118	-0,146	0,161	0,113
	p	0,784	0,362	0,258	0,212	0,382
<i>Brassica napus</i>	r	0,138	-0,026	0,149	-0,046	-0,083
	p	0,284	0,842	0,247	0,725	0,520
Caesalpinhiaceae	r	0,034	-0,137	-0,119	-0,046	-0,083
	p	0,795	0,289	0,359	0,725	0,520
Caryophyllaceae	r	-0,131	0,137	-0,119	-0,046	-0,083
	p	0,311	0,289	0,359	0,725	0,520
<i>Cecropia</i>	r	-0,366	-0,261	-0,321	-0,173	-0,211
	p	0,003	0,041	0,011	0,179	0,099
<i>Cocos nucifera</i>	r	-0,095	-0,197	-0,125	-0,133	-0,248
	p	0,463	0,125	0,333	0,301	0,052
<i>Eucalyptus</i>	r	-0,153	-0,226	-0,235	-0,199	-0,204
	p	0,236	0,077	0,066	0,122	0,111
<i>Eupatorium</i>	r	-0,004	0,085	0,088	-0,046	0,118
	p	0,977	0,511	0,497	0,725	0,360
Euphorbiaceae	r	-0,048	0,246	0,041	0,240	0,173
	p	0,708	0,054	0,749	0,060	0,178
Fabaceae Faboideae espécie1	r	0,162	0,033	0,180	-0,065	-0,119
	p	0,210	0,798	0,161	0,616	0,358
Fabaceae	r	0,153	0,189	0,233	-0,046	-0,083
	p	0,235	0,142	0,068	0,725	0,520
<i>Illex</i>	r	-0,204	-0,169	-0,139	-0,093	-0,069
	p	0,112	0,190	0,282	0,470	0,594
Malpighiaceae	r	0,123	-0,011	0,111	-0,046	-0,083
	p	0,340	0,932	0,391	0,725	0,520

"Continua"

"Tabela 29 Continuação"

Tipo polínico		Contagem de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>S. aureus</i>
Melastomataceae	r	-0,131	-0,137	-0,119	-0,046	-0,083
	p	0,311	0,289	0,359	0,725	0,520
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	r	0,114	0,075	0,254	-0,076	0,073
	p	0,376	0,561	0,046	0,559	0,570
<i>Mimosa scabrella</i>	r	0,036	0,109	0,416	0,088	0,084
	p	0,781	0,400	0,001	0,496	0,519
<i>Mimosa verrucosa</i>	r	0,221	0,123	0,038	0,033	-0,103
	p	0,084	0,343	0,770	0,796	0,427
<i>Myrcia</i>	r	-0,096	-0,055	-0,008	-0,167	-0,044
	p	0,460	0,674	0,950	0,194	0,736
Onagraceae	r	0,000	0,091	0,094	-0,043	0,127
	p	1,000	0,485	0,469	0,745	0,328
Poaceae	r	-0,053	0,099	0,095	0,072	0,047
	p	0,680	0,443	0,465	0,581	0,719
<i>Persea</i>	r	-0,131	-0,137	-0,119	-0,046	-0,083
	p	0,311	0,289	0,359	0,725	0,520
<i>Richardia</i>	r	0,004	0,063	0,057	-0,046	-0,083
	p	0,977	0,627	0,658	0,725	0,520
<i>Schinus</i>	r	0,044	0,021	-0,056	0,164	-0,018
	p	0,735	0,869	0,665	0,202	0,890
<i>Sebastiania</i>	r	-0,067	-0,195	-0,169	-0,065	-0,119
	p	0,603	0,128	0,189	0,616	0,358
<i>Syagrus</i>	r	-0,131	-0,137	0,187	-0,046	-0,083
	p	0,311	0,289	0,145	0,725	0,520
<i>Tapirira</i>	r	-0,010	0,054	-0,132	0,149	-0,147
	p	0,938	0,679	0,305	0,248	0,256
<i>Vernonia</i>	r	-0,011	0,035	0,019	0,237	0,040
	p	0,935	0,785	0,881	0,064	0,758
Não identificados	r	-0,131	-0,137	-0,119	-0,046	-0,083
	p	0,311	0,289	0,359	0,725	0,520

¹ N=62; r: coeficiente de correlação de Spearman; p: probabilidade associada ao teste.

Foi observada relação inversamente proporcional entre as porcentagens de *Cecropia* (embaúba) com a contagem de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras e coliformes totais (Tabela 29). Os coliformes totais também apresentaram correlação positiva com *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) e *Mimosa scabrella* (bracatinga) (Tabela 29). Foi encontrada correlação positiva da *E.coli* com *Amaranthus* (Tabela 29). Para *S. aureus* observou-se correlação positiva com *Ambrosia* (ambrósia) e Asteraceae (asteraceas) (Tabela 29).

A Tabela 30 apresenta as correlações entre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β -caroteno (%), ORAC (Conc. μ mols eq.trolox /g pólen), e os tipos de pólen presentes nas amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 30 - Correlação de Spearman entre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β -caroteno (%), ORAC (Conc. μ mols eq.trolox /g pólen), e os tipos de pólen presentes nas amostras de pólen apícola desidratado¹.

Tipo polínico		Fenólicos Totais mg GAE/g de pólen	Flavonóides Totais mg de quercetina/g de pólen	DPPH EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato)	ORAC Conc. μ mols eq.Trolox /g pollen	Beta (%)
Alternanthera	r	0,218	-0,211	-0,182	-0,197	0,204
	p	0,088	0,100	0,156	0,125	0,112
Amaranthus	r	0,089	-0,018	-0,195	0,266	0,282
Chenopodiaceae	p	0,489	0,890	0,129	0,037	0,026
Ambrosia	r	0,154	0,154	-0,132	0,197	-0,004
	p	0,233	0,233	0,305	0,125	0,978
Antigononleptopus	r	0,235	0,168	-0,050	0,209	0,239
	p	0,066	0,191	0,699	0,103	0,062
Anadenanthera	r	0,262	0,239	-0,299	0,199	0,275
	p	0,040	0,061	0,018	0,122	0,030
Apiaceae	r	0,118	0,004	-0,140	0,111	0,089
	p	0,361	0,978	0,279	0,391	0,489
Asteraceae	r	0,260	-0,303	-0,273	0,320	0,285
	p	0,041	0,017	0,032	0,011	0,024
Arecaceae	r	-0,016	0,047	0,083	-0,169	-0,061
	p	0,904	0,718	0,524	0,188	0,639
Brassica	r	0,114	-0,069	-0,146	0,251	0,280
	p	0,376	0,595	0,258	0,049	0,028
Brassica napus	r	0,140	0,204	-0,197	0,190	0,175
	p	0,279	0,112	0,125	0,140	0,173
Caesalpinaceae	r	0,118	0,004	-0,140	0,111	0,089
	p	0,361	0,978	0,279	0,391	0,489
Caryophyllaceae	r	0,032	-0,018	-0,107	0,132	0,097
	p	0,804	0,890	0,406	0,305	0,455
Cecropia	r	0,035	0,155	-0,081	0,020	-0,103
	p	0,785	0,228	0,533	0,875	0,428
Cocosnucifera	r	-0,469	-0,103	0,233	-0,409	-0,378
	p	<0,001	0,425	0,069	0,001	0,002
Eucalyptus	r	0,311	0,443	-0,353	0,306	0,053
	p	0,014	<0,001	0,005	0,016	0,684

"Continua"

"Tabela 30 Continuação"

Tipo polínico		Fenólicos Totais mg GAE/g de pólen	Flavonóides Totais mg de quercetina/g de pólen	DPPH EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato)	ORAC Conc. μmols eq. Trolox /g polen	Beta (%)
Eupatorium	r	0,182	0,182	-0,032	0,211	0,082
	p	0,156	0,156	0,804	0,100	0,525
Euphorbiaceae	r	-0,204	-0,218	0,066	-0,010	0,057
	p	0,112	0,089	0,613	0,936	0,660
Fabaceae Faboideae	r	-0,214	-0,064	0,029	-0,056	-0,215
spécie ¹	p	0,094	0,622	0,822	0,663	0,093
Fabaceae	r	-0,147	-0,154	0,082	-0,025	-0,097
	p	0,255	0,233	0,525	0,847	0,455
Illex	r	-0,047	0,129	-0,215	0,039	-0,150
	p	0,716	0,316	0,094	0,763	0,244
Malpighiaceae	r	0,054	-0,061	0,025	-0,061	0,111
	p	0,679	0,639	0,847	0,639	0,391
Melastomataceae	r	0,018	-0,111	0,011	-0,039	0,075
	p	0,890	0,391	0,934	0,761	0,562
Mimosa caesalpiniaefolia	r	0,011	-0,139	0,214	-0,120	-0,006
	p	0,931	0,283	0,095	0,353	0,963
Mimosa scabrella	r	-0,267	0,024	0,277	-0,130	-0,285
	p	0,036	0,851	0,029	0,315	0,025
Mimosa verrucosa	r	-0,235	-0,173	0,355	-0,324	-0,054
	p	0,066	0,179	0,005	0,010	0,674
Myrcia	r	-0,248	0,451	-0,032	-0,073	-0,113
	p	0,052	<0,001	0,805	0,572	0,381
Onagraceae	r	0,191	0,183	-0,037	0,213	0,088
	p	0,141	0,157	0,779	0,100	0,500
Poaceae	r	-0,111	-0,297	0,315	-0,115	-0,076
	p	0,389	0,019	0,013	0,375	0,560
Persea	r	0,147	0,168	-0,175	0,082	0,132
	p	0,255	0,191	0,173	0,525	0,305
Richardia	r	-0,004	0,118	0,118	-0,089	-0,011
	p	0,978	0,361	0,361	0,489	0,934
Schinus	r	0,341	-0,276	-0,347	-0,031	0,143
	p	0,007	0,030	0,006	0,812	0,269
Sebastiania	r	0,058	0,055	-0,136	0,083	-0,048
	p	0,655	0,670	0,291	0,522	0,710
Syagrus	r	0,025	0,161	0,068	-0,097	-0,175
	p	0,847	0,211	0,600	0,455	0,173
Tapirira	r	-0,023	0,176	-0,028	-0,026	0,131
	p	0,860	0,171	0,832	0,841	0,310
Vernonia	r	0,070	-0,281	-0,055	-0,043	0,080
	p	0,591	0,027	0,674	0,737	0,538
Não identificados	r	-0,182	-0,054	-0,168	-0,011	-0,125
	p	0,156	0,679	0,191	0,934	0,332

¹N=62; r: coeficiente de correlação de Spearman; p: probabilidade associada ao teste.

Foi observada relação diretamente proporcional entre fenólicos totais e as porcentagens de *Anadenanthera* (angico), Asteraceae (asteráceas), *Eucalyptus* (eucalipto) e *Schinus* (aroeira) e inversamente proporcional com *Mimosa scabrella* (bracatinga) e *Cocos nucifera* (coqueiro) (Tabela 30). Os flavonoides totais apresentaram correlação positiva com *Eucalyptus* e *Myrcia* (murta) e correlação negativa com *Schinus*, Asteraceae, Poaceae (milho, trigo, aveia) e *Vernonia* (aluman) (Tabela 30). Os resultados do DPPH apresentaram correlação positiva com *Mimosa scabrella* (bracatinga), *Mimosa verrucosa* (jurema-branca), e Poaceae e correlação negativa com *Anadenanthera*, Asteraceae, *Eucalyptus* e *Schinus* (Tabela 30). Os valores da atividade antioxidante determinados pelo método ORAC apresentaram correlação positiva com *Amaranthus*, Asteraceae, *Brassica* (colza, couve, mostarda) e *Eucalyptus* e correlação negativa com *Mimosa verrucosa* e *Cocos nucifera* (Tabela 30). Os valores da atividade antioxidante quantificada pelo método do β -caroteno e ácido linoléico apresentaram correlação positiva com *Anadenanthera*, *Amaranthus*, Asteraceae e *Brassica* e correlação negativa com *Mimosa scabrella* e *Cocos nucifera* (Tabela 30).

A Tabela 31 apresenta as correlações entre a atividade antimicrobiana (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado e os tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 31 - Correlação de Spearman entre a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado e os tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado¹.

Tipo polínico		<i>E. coli</i>	<i>S. epidermides</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Alternanthera</i>	r	-0,122	-0,111	-0,168
	p	0,346	0,391	0,191
<i>Amaranthus</i> / <i>Chenopodiaceae</i>	r	-0,116	-0,131	-0,239
	p	0,370	0,309	0,061
<i>Ambrosia</i>	r	0,111	0,025	-0,140
	p	0,391	0,847	0,279
<i>Antigonon leptopus</i>	r	0,011	0,065	-0,024
	p	0,929	0,615	0,854
<i>Anadenanthera</i>	r	-0,071	-0,144	-0,079
	p	0,581	0,263	0,542
Apiaceae	r	-0,039	-0,150	-0,104
	p	0,761	0,244	0,422
Asteraceae	r	-0,172	0,082	0,083
	p	0,182	0,528	0,521
Arecaceae	r	0,076	-0,010	0,008
	p	0,555	0,942	0,948
<i>Brassica</i>	r	-0,044	0,048	-0,102
	p	0,734	0,712	0,431
<i>Brassica napus</i>	r	0,172	0,215	0,211
	p	0,182	0,094	0,099
Caesalpinhiaceae	r	-0,039	-0,150	-0,104
	p	0,761	0,244	0,422
Caryophyllaceae	r	-0,140	0,097	-0,197
	p	0,279	0,455	0,125
<i>Cecropia</i>	r	0,120	0,054	0,117
	p	0,353	0,679	0,364
<i>Cocos nucifera</i>	r	0,027	-0,025	0,064
	p	0,834	0,848	0,623
<i>Eucalyptus</i>	r	0,066	0,064	0,022
	p	0,610	0,621	0,866
<i>Eupatorium</i>	r	0,068	0,089	-0,072
	p	0,600	0,489	0,580
Euphorbiaceae	r	-0,073	0,029	-0,090
	p	0,575	0,821	0,489
Fabaceae Faboideae espécie ¹	r	0,171	-0,006	0,138
	p	0,183	0,966	0,285
Fabaceae	r	0,218	0,018	0,089
	p	0,088	0,890	0,489

“Continua”

"Tabela 31 Continuação"

Tipo polínico		<i>E. coli</i>	<i>S. epidermides</i>	<i>C. albicans</i>
Illex	r	0,057	0,082	0,033
	p	0,658	0,526	0,799
Malpighiaceae	r	-0,097	-0,068	-0,215
	p	0,455	0,600	0,094
Melastomataceae	r	-0,082	0,068	0,111
	p	0,525	0,600	0,391
Mimosa caesalpiniaefolia	r	0,016	0,011	0,086
	p	0,902	0,935	0,506
Mimosa scabrella	r	-0,251	-0,293	-0,206
	p	0,049	0,021	0,109
Mimosa verrucosa	r	0,181	0,091	0,197
	p	0,159	0,480	0,124
Myrcia	r	0,021	-0,232	-0,154
	p	0,870	0,070	0,233
Onagraceae	r	0,073	0,095	-0,070
	p	0,574	0,465	0,594
Poaceae	r	-0,055	0,094	0,196
	p	0,669	0,467	0,128
Persea	r	-0,068	-0,043	-0,021
	p	0,600	0,740	0,868
Richardia	r	-0,111	-0,161	-0,183
	p	0,391	0,211	0,156
Schinus	r	-0,031	0,039	-0,018
	p	0,813	0,763	0,887
Sebastiania	r	-0,026	0,034	-0,043
	p	0,841	0,792	0,743
Syagrus	r	-0,122	-0,018	0,011
	p	0,346	0,890	0,934
Tapirira	r	0,060	0,091	0,120
	p	0,642	0,484	0,354
Vernonia	r	0,214	0,183	0,260
	p	0,095	0,154	0,041
Não identificados	r	0,104	0,054	0,218
	p	0,422	0,679	0,088

[†] N=62; r: coeficiente de correlação de Spearman; p: probabilidade associada ao teste.

Foi observada relação inversamente proporcional das porcentagens de *Mimosa scabrella* com *E. coli* e *S. epidermides* (Tabela 30). Os valores para *C. albicans* apresentaram correlação positiva com *Vernonia* (Tabela 30).

Neste trabalho foram observadas somente correlações moderadas e fracas entre os tipos polínicos presentes e os parâmetros avaliados para as amostras desidratadas de pólen apícola.

A Tabela 32 apresenta os resultados das correlações de Pearson para a composição físico-química (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, glicose e frutose) das amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 32 - Correlação de Pearson entre os parâmetros da composição físico-química, avaliados nas amostras de pólen apícola desidratado¹.

Parâmetro		Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Frutose (%)
Cinzas (%)	r	-0,001				
	p	0,994				
Lipídeos (%)	r	-0,031	-0,661			
	p	0,811	<0,001			
Proteínas (%)	r	-0,084	0,460	-0,422		
	p	0,515	<0,001	0,001		
Frutose (%)	r	-0,107	0,144	-0,219	-0,197	
	p	0,410	0,263	0,088	0,124	
Glicose (%)	r	0,284	0,266	-0,209	0,035	0,000
	p	0,025	0,037	0,102	0,786	0,999

¹ N=62; r: coeficiente de correlação de Pearson; p: probabilidade associada ao teste.

Observou-se que amostras com valores mais elevados de cinzas apresentaram valores menores para lipídeos ($r = -0,661$) ($p < 0,001$) e amostras com valores mais altos de lipídeos apresentam menos proteínas ($r = -0,422$) ($p = 0,001$), já entre cinzas e proteínas ($r = 0,460$) ($p < 0,001$), cinzas e glicose ($r = -0,266$) ($p = 0,037$) e umidade e glicose ($r = 0,284$) ($p = 0,025$), houve correlação diretamente proporcional significativa.

A Tabela 33 apresenta os resultados das correlações de Pearson entre os parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 33 - Correlação de Pearson entre os parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de pólen apícola desidratado¹.

Parâmetro		Contagem de aeróbios mesófilos	Bolores e Leveduras (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)
Bolores e Leveduras (UFC/g)	r	0,421			
	p	0,001			
Coliformes Totais (UFC/g)	r	0,556	0,685		
	p	<0,001	<0,001		
<i>E. coli</i> (UFC/g)	r	0,398	0,437	0,340	
	p	0,001	<0,001	0,007	
<i>S. aureus</i>	r	0,308	0,579	0,421	0,397
	p	0,015	<0,001	0,001	0,001

¹ N=62; r: coeficiente de correlação de Pearson; p: probabilidade associada ao teste.

Observou-se que a contaminação por aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* estiveram positivamente correlacionados entre si (Tabela 33).

A Tabela 34 apresenta os resultados das correlações de Pearson entre os parâmetros antioxidantes avaliados para os extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 34 - Correlação de Pearson entre os fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC₅₀ (mg pólen/mL extrato), Sistema β -caroteno (%), ORAC (Conc. μ mols eq. Trolox /g pólen)¹.

Correlação		Fenólicos Totais mg GAE/g de pólen	Flavonóides Totais mg de quercetina/g de pólen	DPPH EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato)	ORAC Conc. μ mols eq. Trolox /g polen
Flavonóides Totais mg de quercetina/g de pólen	r	0,480			
	p	<0,001			
DPPH EC ₅₀ (mg pólen/mL extrato)	r	-0,436	-0,220		
	p	<0,001	0,086		
ORAC Conc. μ mols eq. Trolox /g polen	r	0,568	0,539	-0,479	
	p	<0,001	<0,001	<0,001	
Beta (%)	r	0,484	0,055	-0,419	0,436
	p	<0,001	0,671	0,001	<0,001

¹ N=62; r: coeficiente de correlação de Pearson; p: probabilidade associada ao teste.

Foi observada correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos totais com: flavonoides totais ($r = 0,480$) ($p < 0,001$), ORAC ($r = 0,568$) ($p < 0,001$) e com o sistema do β -caroteno ($r = 0,484$) ($p < 0,001$) e inversa do o EC₅₀ ($r = -0,436$) ($p < 0,001$). Altos níveis de compostos fenólicos podem ser acompanhados por elevada capacidade antioxidante dos produtos apícolas (LEJA *et al.*, 2007; CARPES *et al.*, 2007, 2008; MEDA *et al.*, 2007). No estudo feito por Campos *et al.*, (2000) alguns polens com elevados níveis de compostos fenólicos não apresentaram diferenças significativas para o DPPH. Leja *et al.*, (2007), Carpes *et al.*, (2008) que trabalharam com pólen apícola e Meda *et al.*, (2007), que utilizaram amostras de mel, encontraram correlação positiva entre os compostos fenólicos e o potencial antioxidante (DPPH).

Dados de Moraes *et al.*, (2011) para amostras portuguesas de pólen apícola evidenciaram alta correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante (DPPH) enquanto que os trabalhos de Zheng e Wang (2001) com ervas culinárias e medicinais, e o de Atoui *et al.*, (2005) realizado em chás e infusões de ervas, evidenciaram correlações bastante fracas. Marghitas *et al.*, (2009) não encontraram correlação entre os fenólicos e a atividade antioxidante (DPPH). Os flavonoides totais

apresentaram correlação positiva com o método de ORAC ($r = 0,559$) ($p < 0,001$). Nos trabalhos de Campos *et al.*, (2000, 2003) não foi encontrada correlação direta entre a concentração de flavonoides e a atividade antioxidante pelo método de DPPH. Campos *et al.*, (2003), para amostras de pólen conservado durante quatro anos, relataram que a queda gradual da atividade antioxidante não foi acompanhada pela redução paralela de flavonoides.

Os resultados do DPPH apresentaram correlação moderada inversa com os resultados obtidos pelo método de ORAC ($r = - 0,479$) ($p < 0,001$) e com o sistema do β -caroteno ($r = - 0,419$) ($p < 0,001$). Morais *et al.*, (2011) evidenciaram alta correlação entre os métodos de DPPH e sistema do β -caroteno para amostras de pólen apícola português.

Entre os métodos do ORAC e do sistema do β -caroteno foi observada correlação positiva ($r = 0,436$) ($p < 0,001$).

As correlações observadas entre os fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado: EC_{50} , Sistema β -caroteno, ORAC, foram moderadas e sugerem que houve contribuição dos compostos fenólicos de flavonoides presentes nos extratos etanólicos de pólen apícola para atividades antioxidante medida, além da existência de paralelismo entre os resultados dos métodos utilizados para quantificar a atividade antioxidante das amostras.

Outros constituintes como vitaminas e proteínas também podem estar envolvidos na atividade antioxidante do pólen apícola.

A Tabela 35 apresenta os resultados das correlações de Pearson entre os parâmetros da atividade antimicrobiana avaliados para os extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado.

Tabela 35 - Correlação de Pearson entre os parâmetros da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola desidratado¹.

Parâmetro		<i>E. coli</i>	<i>S. epidermides</i>
<i>S. epidermides</i>	r	0,495	
	p	<0,001	
<i>C. albicans</i>	r	0,632	0,690
	p	<0,001	<0,001

¹ N=62; r: coeficiente de correlação de Pearson; p: probabilidade associada ao teste.

As concentrações mínimas inibitórias do pólen apícola desidratado contra o crescimento dos microrganismos em estudo (*Escherichia coli*, *Staphilococcus epidermides*, *Candida albicans*) apresentaram correlação positiva entre si (Tabela 35), significando que o aumento da concentração de pólen necessária para inibir um determinado microrganismo foi acompanhada do aumento requerido para inibir o crescimentos dos demais microrganismos.

6 CONCLUSÕES

A realização do presente estudo possibilitou concluir que:

O teor de umidade de 82,3% das amostras foi superior ao limite de 4% estabelecido pela Legislação Brasileira para amostras desidratadas de pólen apícola, indicando a dificuldade dos produtores em atender a exigência.

O teor de cinzas variou de 1,94 a 4,61%; das amostras analisadas 96,8% respeitaram o valor máximo de 4% estabelecido pela Legislação Brasileira. A quantidade de cinzas foi maior nas amostras da região Nordeste ($p < 0,001$).

O teor de lipídeos variou entre 3,35 e 10,96%; sendo que todas as amostras estiveram de acordo com o valor mínimo de 1,8% preconizado pela Legislação Brasileira. O conteúdo de lipídeos das amostras das regiões Nordeste e Sudeste foi menor do que o das amostras da região Sul ($p < 0,001$ e $p=0,029$, respectivamente).

Para as proteínas, os valores obtidos foram de 17,73 a 34,73%, das amostras analisadas 100% estiveram de acordo com o estabelecido na norma brasileira (mínimo 8%), não havendo diferença entre as regiões brasileiras estudadas ($p > 0,05$).

Os teores dos açúcares variaram entre 11,86 e 25,71% e de 2,77 e 15,87% para a frutose e para a glicose respectivamente, não houve diferença entre as regiões brasileiras ($p > 0,05$).

O índice frutose/glicose variou entre 0,74 e 5,88 para as amostras de pólen apícola desidratado sendo igual ou superior a razão encontrada para algumas amostras de mel e outros produtos classificados como moderado a baixo índice glicêmico.

A validação do método para determinação de glicose e frutose em pólen apícola apontou que o método é adequado para utilização num laboratório de controle de qualidade de alimentos.

Os resultados obtidos para os parâmetros indicadores de qualidade higiênico-sanitárias propostos (aeróbios mesófilos, bolores e leveduras) estiveram de acordo com o padrão estabelecido pelo Código Alimentar Argentino, que estabelece um valor máximo de $1,5 \times 10^5$ UFC/g para bolores e leveduras no pólen apícola desidratado. Neste trabalho os bolores e leveduras foram detectados em 60% das amostras analisadas.

Os aeróbios mesófilos estiveram presentes em 56% das amostras, oscilando entre <10 e $1,26 \times 10^3$.

Os indicadores de qualidade sanitária (coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*) estiveram presentes em 50, 11,3 e 30,6% das amostras, respectivamente. Os resultados para coliformes totais se enquadraram no limite estabelecido pela RDC 12 de Janeiro de 2001 que indica o máximo de 5×10^2 UFC/grama para o grupo 10 item N (granola e mistura de cereais não compactados, com ou sem adições, e similares).

Os indicadores de segurança (esporos de clostrídios sulfito redutores) estiveram ausentes em todas as amostras analisadas.

Sugere-se que haja um maior controle por parte dos manipuladores durante a produção, o que também deve ser realizado por parte dos entrepostos durante o fracionamento e envase do produto. Recomenda-se a inclusão dos parâmetros avaliados na legislação específica para o pólen apícola desidratado.

Os resultados encontrados para fenólicos totais variaram entre 12,60 e 84,22 mg GAE/g de pólen, sendo menor para as amostras da região Nordeste quando comparado com o das amostras das regiões Sudeste e Sul ($p = 0,027$ e $p = 0,002$ respectivamente).

Os resultados para flavonóides totais variaram entre 1,90 e 36,85 mg de quercetina/g de pólen, sendo que o conteúdo médio foi maior na região Sul em comparação com as regiões Nordeste ($p = 0,050$) e com a região Sudeste ($p = 0,025$).

Os resultados encontrados para a atividade antioxidante do polen apícola brasileiro são consideravelmente diferentes entre as amostras analisadas, tendo para o EC_{50} valores entre 0,35 a 13,42 mg pólen/mL extrato. A atividade antioxidante quantificada pelo método de DPPH foi

menor na região Centro-Oeste quando comparada a todas as demais regiões ($p < 0,05$) e maior na região Sul quando comparada com a região Nordeste ($p = 0,016$).

Quando quantificada pelo método ORAC, a atividade antioxidante variou entre 132,98 a 575,85 $\mu\text{mols eq. Trolox /g pólen}$ e foi maior na região Sul quando comparado a todas as demais regiões ($p < 0,05$).

Quando utilizado o método do sistema β -caroteno foram observados valores entre 52,58 e 98,37 % para a atividade antioxidante das amostras sendo maior para as amostras da região Sul quando comparada com a região Nordeste ($p = 0,003$) e Centro-Oeste ($p = 0,007$).

De modo geral as amostras de pólen apícola desidratado, produzidas na região Sul seguidas pelas amostras produzidas na região Sudeste apresentaram maiores concentrações de compostos bioativos e atividade antioxidante mais elevada quando comparadas com as demais regiões.

Todos os extratos analisados evidenciaram atividade antimicrobiana, e mostraram seletividade e MICs diferentes para cada microrganismo. O pólen apícola desidratado inibiu o crescimento de todos os microrganismos em estudo, sendo o efeito dependente do gênero. *Candida albicans* evidenciou maior resistência, sendo *Staphylococcus epidermidis* mais sensível. O produto apresenta potencial de novos agentes antimicrobianos, assim os extratos de pólen apícola podem ser uma promessa no combate a proliferação microbiana, uma vez que um número crescente de bactérias têm desenvolvido resistência aos antibióticos comerciais.

Foram identificados 36 tipos polínicos diferentes nas 62 amostras dentre os quais se destacaram *Cocos nucifera*, *Mimosa scabrella* (Benth.), *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Asteraceae*, *Poaceae*, *Euphorbiaceae* e *Brassica sp.* que ocorreram com maior frequência entre as amostras. Somente 6 amostras apresentaram um único tipo polínico em contagem superior a 90% do total da soma de grãos, incluindo *Ambrosia sp.*, *Cecropia sp.*, *Eucalyptus sp.*, *Fabaceae*, *Mimosa scabrella* (Benth.) spp. e *Schinus sp.*, sendo consideradas como pólen apícola monofloral.

Foram observadas somente correlações moderadas e fracas entre os tipos polínicos presentes e a composição físico-química (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos), qualidade sanitária (bolores e leveduras, aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E.coli*, clostrídios sulfito redutores e *S.aureus*.), propriedades biológicas (compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante - DPPH, sistema β -caroteno e ORAC) e atividade antimicrobiana (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).

Foi observada correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos totais com: flavonoides totais ($r = 0,480$) ($p < 0,001$), ORAC ($r = 0,568$) ($p < 0,001$) e com o sistema do β -caroteno ($r = 0,484$) ($p < 0,001$) e inversa do EC_{50} ($r = - 0,436$) ($p < 0,001$).

Os flavonoides totais apresentaram correlação positiva com o método de ORAC ($r = 0,559$) ($p < 0,001$).

Os resultados do DPPH apresentaram correlação moderada inversa com os resultados obtidos pelo método de ORAC ($r = - 0,479$) ($p < 0,001$) e com o sistema do β -caroteno ($r = - 0,419$) ($p < 0,001$).

Entre os métodos do ORAC e do sistema do β -caroteno foi observada correlação positiva ($r = 0,436$) ($p < 0,001$).

REFERÊNCIAS*

- ABOUDA, Z.; ZERDANI, I.; KALALOU, I.; FAID, M.; AHAMI, M.T. The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. **Research Journal of Microbiology**, v.6, n.4, p.376-384, 2011.
- AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.728-729, 2004.
- AIRES, E.R.B.; FREITAS, B.M.; 2001. Caracterização palinológica de algumas amostras de mel do Ceará. **Ciencia Agronômica**, v.32, p.22-29, 2001.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Legislação nacional e internacional de produtos apícolas. **Mensagem Doce**, n.115, 2012. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/115/artigo3.htm>. Acesso em: 7 mar. 2013.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; ARRUDA, V.A.S.; BARRETO, L.M.R.C. **Manual de controle da qualidade do pólen apícola**. São Paulo: APACAME, 2012. 28p.
- 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.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 203p.
- 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.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M.; Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v.22, p1041-1047, 2002.

* De acordo com a NBR 6023/10 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI) 1999.

ALMAS, K.; MAHMOUD, A.; DAHLAN, A. A comparative study of propolis and saline application on human dentin: a SEM study. **Indian Journal of Dental Research**, v.12, n.1, p.21-27, 2001.

ALMARAZ-ABARCA, N.; CAMPOS, M.G.; DELGADO-ALVARADO, E.A.; ÁVILA-REYES, J.A.; HERRERA-CORRAL, J.; GONZALEZ-VALDEZ, L.S.; NARANJO JIMENEZ, N.; FRIGERIO, C.; TOMATAS, F.A.; ALMEIDA, A.J.; VIEIRA, A.; URIBE SOOTO, 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.

ALMARAZ-ABARCA, N.; CAMPOS, M.D.; AVILA-REYES, J.A.; NARANJO-JIMENEZ, N.; HERRERA-CORRAL, J.; GONZALEZ-VALDEZ, L.S. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. **Interciencia**, v.29, p.574–578, 2004.

ALVES, M.L.T.M.F. Coletores de pólen. In: _____. **Produção de pólen**. Pindamonhangaba: Instituto de Zootecnia do Centro de Apicultura Tropical, 1997. p.24-30.

ALVES, E.U.; SADER, R.; BRUNO, R.L.A.; ALVES, U.A. Dormência e desenvolvimento de sementes de sabiá (*Mimosa Caesalpinifolia Benth.*). **Revista Árvore**, v.28, p.655-662, 2004.

ANDERSEN, O.M.; JORDHEIN M. The antocyanins. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R., eds. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.471-553.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ARGENTINA. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Alimentos. **Código Alimentario Argentino**. [Capítulo X: Alimentos Azucarados: Artículo 785 – Resolución 1550 de 12 de dezembro de 1990]. p.15. Disponível em: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/marco/caa/capitulo_10.htm. Acesso em: 9 nov. 2012.

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

ARRUDA, V.A.S.; PEREIRA, A.A.S.; ESTEVINHO, M.L.M.; MURADIAN, L.B.A. Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.143-148, 2013b.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, p.27, 2005.

BAQUERO, F.; BLAZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Trends in Ecology & Evolution**, v.12, p.482-487, 1997.

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.

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

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

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brasil: 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.; 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.; LUZ, C.F.P. Melissopalynological data obtained from a mangrove area near to Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.37, n.2, p.155-163, 1998.

BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L.; JUSTO, R.L. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil Meridional. **Ciência Rural**, v.29, p.663-667, 1999.

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

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. v.3, p.237-314.

BASIM, E.; BASIM, H.; ÖZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v.77, n.4, p.992-996, 2006.

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.

BATISTA, A.N.L.; COLOMBO, R.; PASCOLI, I.C.; TELES, H.L.; SILVA, G.H.; BOMFIM, G.C.C.; BURGOS, R.C.R.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; REIMBERG, M.C.H. Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.3, p.402–406, 2011.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v.219, n.6, p.561-571, 2004.

BECKER, H.; EBELING, L. Conservative therapy of benign prostate hyperplasia (BHP) with Cernilton®: results of a placebocontrolled Double-blind study. **Urologe**, v.28, p.301-306, 1998.

BICALHO, K.C.; OLIVEIRA, L.; SANTOS, J.; MESQUITA, A.C.; MENDONÇA, E.G. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p.1510–1515, 2008.

BIRCH, A.E.; FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4502-4507, 2001.

BOCCHESE, R.A.; OLIVEIRA, A.K.M.; LAURA, V.A. Germinação de sementes de *Cecropia pachystachya* Trécul (Cecropiaceae) em padrões anteriores e posteriores à passagem pelo trato digestório de aves dispersoras de sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8, n.2, p.19–26, 2008.

BOFF, S.; LUZ, C.F.P.; ARAUJO, A.C.; POTT, A. Pollen analysis reveals plants plants foraged by africanized honeybees in the southern Pantanal, Brazil. **Neotropical Entomology**, v.40, p.47-54, 2011.

BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and Beeswax. **Apiacta**, v.38, p.334-341, 2004.

BOGDANOV, S.; JURENDIC, T.; SIEBER, R.; GALLMANN, P. Honey for nutrition and health: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v.27, n.6, p.677–689, 2008.

BOGDANOV, S. Pollen: production, nutrition and health: a review. **Bee Product Science**, 2012. Disponível em: <http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PollenBook2Review.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2012.

BORELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.73, suppl.1, p.53-63, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. **Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001**. 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. Disponível em: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%203.htm>. Acesso em: 5 out. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fb4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 5 nov. 2012.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4841-4844, 2001.

BUCK, A.C.; COX, R.; REES, R.W.M.; EBELING, L.; JOHN, A. Treatment of outflow tract obstruction due to benign prostatic hyperplasia with the pollen extract, cernilton: a double-blind, placebo-controlled study. **British Journal of Urology**, v.66, n.4, p.398-404, 1990.

BUCK, A.C.; REES, R.W.M.; EBELING, L. Treatment of chronic prostatitis and prostatodyia with pollen extract. **British Journal of Urology**, v.64, p.496-499, 1989.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.12, p.5797-5808, 2001.

BURGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of mono and disaccharides in foods by interlaboratory study: Quantitation of bias components for liquid chromatography. **J. AOAC Int.** v.75, p.443-464, 1992.

CALLOU, M.J.A.; MIRANDA, R.C.M.; FEITOSA, T.R.; ARRUDA, F.V.F.; NASCIMENTO, M.S.; GUSMÃO, N.B. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca da *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth (Sabiá). **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, p.1-7, 2012. Disponível em: <<http://www.scientiaplena.org.br/ojs/index.php/sp/article/view/522>>. Acesso em: 27 maio 2013.

CAMARGO, M.T.L.A. **Medicina popular**: aspectos metodologicos de pesquisa: garrafada, objeto de pesquisa: componentes medicinais de origem vegetal, animal e mineral. São Paulo: Almed, 1985. 130p.

CAMPOS, M.G. **Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas**. Coimbra, 1997. 318p. Thesis - School of Pharmacy - Universidade de Coimbra.

CAMPOS, M.G.; 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. 154-161, 2008.

CAMPOS, M.G.; CUNHA, A.; MARKHAM, K.R. Bee pollen: composition, properties and application. In: MIZRAHI, A.; LENSKEY, Y., eds. **Bee products**: properties, applications and apitherapy. New York: Plenum Press, 1997. p.93-100. [Proceedings of an International Conference on Bee Products: properties, applications, and apitherapy, held May 26-30, 1996, in Tel Aviv, Israel].

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R. The unique occurrence of the flavone aglycone tricetin in Myrtaceae pollen. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Bioscience**, v.57, n.9/10, p.944-946, 2002.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MITCHELI, K.A.; COLETA, M.; MARKHAM, K.R.; CUNHA, A.P. Free-radical scavenging properties of bee pollens – the non-involvement of flavonoids? In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF POLYPHENOLS, 10, Munique, 2000. Conference. Munique, 2000. p.11-15. [Poster].

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MITCHELL, K.A.; MARKHAM, K.R.; 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.

CARPANEZZI, A.A.; IVANCHECHEN, S.L.; LISBÃO Jr., L. **Deposição de matéria orgânica e nutrientes por bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. Curitiba: EMBRAPA, URPFCs, 1984. 3p. (EMBRAPA-URPFCs. Pesquisa em Andamento, 2).

CARPANEZZI, A.A.; PAGANO, S.N.; BAGGIO, A.J. Banco de sementes de bracatinga em povoamentos do sistema agroflorestal tradicional de cultivo. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.35, p.3-19, 1997.

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.; CABRAL, I.S.; LUZ, C.F.P.; CAPELETTI, J.P.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.7, p.667–673, 2009a.

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, 2009b.

CARPES, S.T.; CABRAL, I.S.R.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.; MASSON, M.L. Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p.271–277, 2009c.

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**, p.1–12, 2012. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/19476337.2012.711776>. Acesso em: 22 abril 2013

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

CARVALHO, C.A.L.; MORETTI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R.M.O.; OLIVEIRA, P.C.F. Pollen spectrum of honey of “Uruçu” bee (*Melipona scutellaris* LATREILLE, 1811). **Revista Brasileira de Biologia**, v.61, n.1, p.63-67, 2000.

CHEN, J.H.; HO, C.T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.7, p.2374-2378, 1997.

COLLIN, S.; VANHAVRE, T.; BODART, E.; BOUSETA, A. Heat treatment of pollens: impact on their volatile flavour constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.444-448, 1995.

CONCEIÇÃO, E.S.; DELABIE, J.H.C.; COSTA NETO, A.O. A entomofilia do coqueiro em questão: avaliação do transporte de pólen por formigas e abelhas nas inflorescências. **Neotropical Entomology**, v.33, n.6, p.679-683, 2004.

CONCEIÇÃO, G.M.; ARAGÃO, J.G. Diversidade e importância econômica das Myrtaceae do cerrado, Parque Estadual do Mirador, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.7, p.1-8, 2010. Disponível em: <http://www.scienciaplenu.org.br/ojs/index.php/sp/article/view/51>. Acesso em: 15 abr. 2013.

COOK, S.M.; AWMACK, C.S.; MURRAY, D.A.; WILLIAMS, I.H. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? **Ecological Entomology**, v.28, p.622-627, 2003.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.7, n.2, p.66-76, 1996.

CORNEJO, L.G. **Pólen: tecnologia de su producción, procesado, y comercialización**. Buenos Aires: IPTEA, 1994. 114p.

CORONEL, B.B.; GRASSO, D.S.C.; PEREIRA, G.; FERNÁNDEZ, A. Caracterización bromatológica del pólen apícola Argentino. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, ano.15, n.29, 145-181, 2004. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14502906>. Acesso em: 16 out. 2012.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. 670p.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.56, n.2, p.324-235, 1992.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v.43, n.4, p.348-361, 2007.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, n.3, p.417–433, 2010.

DAVIES, K.M.; SCHWINN, K.E. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R., eds. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press; 2006. p.143-218.

DEVILLA, I.A.; BARBOSA, L.S.; REIS, R.C.; REIS, J.S.; REIS, M.C. Avaliação das propriedades físicas da mamona (*Ricinus communis* L.) cultivar Paraguaçu. **Revista Agrotecnologia**, v.1, n.1, p.89–98, 2012.

DI PAOLA-NARANJO, R.D.; SÁNCHEZ, J.S.; PARAMÁS, A.M.G.; GONZALO, J.C.R. **Journal of Chromatography, A**, v.1054, n.1/2, p.205-210, 2004.

DONNELLY, J.K.; ROBINSON, D.S. Free radicals in foods. **Free Radical Research**, v.22, n.2, p.147-176, 1995.

DOREA, 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, p.862-867, 2010.

DORIA U.F. Correlação e Regressão Linear. In: Introdução à iostatística: Para simples mortais. São Paulo: Elsevier; 1999. p. 158.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.3, p.241–249, 2009.

DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA). 2001. 80p

DRUMOND, M.A.; SANTANA, A.C.; ANTONIOLE, A. Recomendações para o uso sustentável da biodiversidade no bioma da caatinga. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V., orgs. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. p.47-90.

DUARTE, M.C.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; STARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197–201, 2007.

DYRAGER, C.; WICKSTRÖM, M.; FRIDÉN-SAXIN, M.; FRIBERG, A.; DAHLÉN, K.; WALLÉN, E.A.; GULLBO, J.; GROTLI, M.; LUTHMANN, K. Inhibitors and promoters of tubulin polymerization: synthesis and biological evaluation of chalcones and related dienones as potential anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p.2659-2665, 2011.

EATON, C.V.; LAW, R. Marketing apitherapy products and the challenge of government regulation. **Bee World**, v.81, n.3, p.109-115, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUARIAS. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. Curitiba: Embrapa, 1988. 70p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 20). Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/publica/seriedoc/edicoes/doc20.pdf>. Acesso em: 01 maio 2013.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.P.; MOREIRA L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3774–3779, 2008.

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

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K.; NÔŽKOVÁ, J.; KAČÁNIOVÁ, M.; MARIÁSSYOVÁ, M.; ROVNA, K.; STRÍČEK, E.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. 12, p. 8359–8377, 2012.

FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2.ed. Brasília: Serviço de Publicação e Informação, Embrapa, 1998. 292p.

FERREIRA, A.C.F.; NETO J.C.; SILVA, A.C.M.; KUSTER, R.M.; CARVALHO, D.P. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, v.19, p.351-355, 2006.

FILGUEIRA F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3.ed. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FOSTER-POWELL, K.; HOLT, S.H.; BRAND-MILLER, J.C. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.5-56, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FREITAS, B.M. **Potencial da caatinga para produção de pólen e néctar para a exploração apícola**. Fortaleza, 1991. 140p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Ceará.

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.; OLIVEIRA ORSI, R. Composições bromatológica e mineral de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.11, n.2, p.88-93, 2003.

GARCÍA, M.; PÉREZ-ARQUILLUE, C.; JUAN, T.; JUAN, M.I.; HERRERA, A. Note: pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science and Technology International**, v.7, n.2, p.155-158, 2001.

GEBARA, E.C.E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.4, p.365-369, 2002.

GODOI, S.; TAKAKI, M. Efeito da temperatura e a participação do fitocromo no controle da germinação de sementes de embaúba. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.2, p.87–90, 2005.

GONDIM, B.L.C.; VIEIRA, T.I.; CUNHA, D.A.; SANTIAGO, B.M.; VALENÇA, A.M.G. Atividade antimicrobiana de produtos naturais frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.11, n.1, p.123–127, 2011.

GONZÁLEZ-GÜERCA, M.C.; ALMARAZ-ABARCA, N.; ÁVILA-REYES, J.A.; HERRERA-CORRAL, J.; NARANJO-JIMÉNEZ, N. Polen apícola: uma alternativa alimentícia y terapéutica. **Apitec**, v.28, p.19-23, 2001.

GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP; BARKER, N.P.; CLARK, L.G.; DAVIS, J.I.; DUVALL, M.R.; GUALA, G.F.; HSIAO, C.; KELLOGG, E.A.; LINDER, H.P.; MASON-GAMER, R.; MATHEWS, S.; SIMMONS, M.; SORENG, R.; SPANGLER, R. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.88, n.3, p.373-457, 2001.

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

HALLIWELL, B. Lipid preoxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, v.47, n.3, p.410-418, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Clarendon Press; New York: Oxford University Press, 1998. 936p. (Oxford science publications).

HANDELMAN, G.J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v.17, n.10, p.818-822, 2001.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA, J.N. A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.59, n.4, p.687–749, 2008.

HAYDAK, M.K. Changes in total nitrogen content during the life of the imago of to worker honey-bee. **Journal of Agricultural Research**, v.49, n.1, p.21-27, 1934.

HERBET Jr., E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v.9, n.1, p.33-40, 1978.

HERVANTIN, H.L. **Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas**. Campinas, 2009. 83p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.; PRIOR, R. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4437-4444, 2002.

HUANG, D.; OU, B.E.; 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.; NICHOLSON, S.W. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Alloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). **Phytochemistry**, v.67, p.486-1492, 2006.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; CANHOS, D.A.L.; ALVES, D.A.; SARAIVA, A.M., orgs. **Polinizadores do Brasil**, Contribuição e Perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. Edusp, 2012, p369-383

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**: revisão 01. INMETRO, 2003. 36p. (DOQ-CGCRE-008). Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf. Acesso em: 9 maio. 2013.

ISHAYEK, J.I.; KERN, M. US honey varying in glucose and fructose content elicit similar glycemic indexes. **Journal of the American Dietetic Association**, v.106, p.1260-1262, 2006.

KACANIOVÁ, M.; VUKOVIC, N.; CHLEBO, R.; HASCIK, P.; ROVNÁ, K.; CUBON, J.; DZUGAN, M.; PASTERNAKIEWICZ, A. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. **Archives of Biological Sciences**, v.64, n.3, p.927–934, 2012.

KIRKWOOD, B.R.; STERNE, J. A. C. **Essential medical statistics**. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2002006, p.502.

KNAZOVICKÁ, V.; MELICH, M.; KACÁNIOVÁ, M.; FIKSELOVÁ, M. Antimicrobial activity of selected bee products. **Acta Fytotechnica et Zootechnica - Mimoriadne Cislo**, p.280-285, 2009. Disponível em: <http://www.fem.uniag.sk/acta/download.php?id=575>. Acesso em: 15 abr. 2013.

KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996. p.87-113. (FAO Agricultural Services Bulletin, v.124).

KOO, M.H.; PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.61, p.367-369, 1997.

KOO, H.M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.6, p.3106-3112, 2001.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p. (Métodos cromatográficos de análise, 6).

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K.; Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v.100, p.237-240, 2007.

LIBERATO, M. C. T. C.; MORAIS, S. M.; SALUSTIANO, G. L. ; NOJOSA, A. C. B.; NOJOSA, A. K. B. Determinação de fenóis totais e flavonóides em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera L.* do Ceará. 49 Congresso Brasileiro de Química. Porto Alegre, RS. 2009

LIMA, I.C.A.R.; LIRA, M.A.; MELLO, A.C.L.; SANTOS, M.V.F.; FREITAS, E.V.; FERREIRA, R.L.C. Avaliação de sabiazeiro (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) quanto a acúleos e preferência por bovinos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, p.289-294, 2008.

LOPER, G.M.; STANDIFER, L.N.; THOMPSON, M.J.; GILLIAM, M. Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. **Apidologie**, v.11, n.1, p.63-73, 1980.

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.

LOSCHEN, G.; EBELING, L. Inhibition of the arachidonate metabolism by an extract of rye pollen. **Arzneimittel-Forschung**, v.41, n.2, p.162-167, 1991. in German; English [Abstract].

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology. **Bee World**, v.59, p.139-157, 1978.

LU, L.; CHEN, Y.; CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p.213-220, 2005.

LUZ, C.F.P.; THOMÉ, M.L.; BARTH, O.M. Recursos tróficos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) na região de Morro Azul do Tinguá, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, n.1, p.29–36, 2007.

MAGALHÃES, E.O. Manejo para a produção de pólen apícola no Nordeste. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA – PECNORDESTE, 9, Fortaleza, 2005. **Anais**. Fortaleza: FEAC, 2005.

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.

MĂRGHITAS, 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, p.878–883, 2009.

MARINOVA, E.M.; YANISHLIEVA, N.V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **Fett-Wissenschaft Technologie**, Leinfelden-Echterdingen, v.94, n.11, p.428-432, 1992.

MARKHAM, K.R.; CAMPOS, M. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-Osophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. **Phytochemistry**, v.43, p.763–767, 1996.

MARTÍNEZ, A.T. **Cotribución a la optimización del sistema productiva del pólen en los bosques altoandinos de Colombia**. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2006. Disponível em: <http://www.docstoc.com/docs/49354206/Contribuci%C3%B3n-a-la-optimizaci%C3%B3n-del-sistema-productivo-del-polen>. Acesso em: 06 nov. 2012.

MARTINS, C.R.; JESUS Jr., L.A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 30p. (Documentos; 164).

MARTINS, M.C.T.; MORGANO, M.A.; VICENTE, E.; BAGGIO, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Physicochemical composition of bee pollen from eleven brazilian states. **Journal of Apicultural Science**, v.55, p. 107-116, 2011.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUUMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, p.571-577, 2005.

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.58, N.3, P.346-353, 2009.

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.

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.

MILFONT, M.O.; FREITAS, B.M.; ALVES, J.E. **Pólen apícola: manejo para a produção de pólen no Brasil**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2011. 102p.

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.

MONSALVE, C.; CANO, A. La familia *Brassicaceae* em la provincia de Huaylas, Áncash. **Revista Peruana de Biología**, v.10, p.20-32, 2003.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEAS, 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, p.1096-1101, 2011.

MORETI, A.C.C.C. Coleta e utilização do pólen pelas abelhas. In: PRODUÇÃO de pólen. Pindamonhangaba: Instituto de Zootecnia do Centro de Apicultura Tropical, 1997. p.1-7.

MORETI, A.C.C.C.; CARVALHO, C.A.L.; MARCHINI, L.C.; OLIVEIRA, P.C.F. Espectro polínico de amostras de mel de *Apis mellifera* L., coletadas na Bahia. **Bragantia**, v.59, n.1, p.1-6, 2000.

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. 93p.

MORETI, A.C.C.C. **Pólen**: alimento protéico para as abelhas: complemento alimentar para o homem. In: INFOBIBOS. Informações Tecnológicas. Artigos. **Artigos de 2006**. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Polen/index.htm. Acesso em: 1 mar. 2013.

MORGANO, M.A.; MILANI, R.F.; MARTINS, M.C.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration. **Food Control**, v.22, p.1604–1608, 2011.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals. **Nutrition Research**, v.22, p.519-526, 2002.

NASCIMENTO, G.G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247–256, 2000.

NETER, J.; KUTNER, M.H.; NACHTSHEIM, C.J.; WASSERMAN, W.; **Applied Linear Statistical Models**. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing.1996, 1408p.

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**, p.107-110, 2009. Disponível em: http://bift.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0231.pdf. Acesso em: 16 maio 2012.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, M. G.; TAGAMI, P. M.; LORSCHIDE, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.93–97, 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. 12, p. 11173-11187, 2012.

NOVAIS, J.S.; LIMA, L.C.L.; SANTOS, F.A.R. Bee pollen loads and their use in indicating flowering in the Caatinga region of Brazil. **Journal of Arid Environments**, v.75, p.1355-1358, 2010.

OLIVEIRA, K.C.L.S. **Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadores do processo de desidratação**. São Paulo, 2006. 106p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.265-273, 2003.

ORSOLIC, N.; KNEZEVI, A.H.; SVER, L.; TERZI, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.307-315, 2004.

ORZÁEZ VILLANUEVA, M.T.; DÍAZ MARQUINA, A.; BRAVO SERRANO, R.; BLAZQUEZ ABELLÁN, G. The importance of bee collected pollen in the diet: a study of its composition. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.53, p.217-224, 2002.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4619-4626, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2914-2919, 2002.

ÖZKALP, B.; ÖZCAN, M.M. Antibacterial activity of pollen and propolis extracts. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.8, n.2, p.17–19, 2010.

ÖZCAN, M.; ÜNVER, A.; CEYLAN, D.A.; YETISIR, R. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. **Nahrung**, v.48, p.188-194, 2004.

ÖZAN, F.; SÜMER, Z.; POLAT, Z.A.; ER, K.; OZAN, U.; DEGER, O. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. **European Journal of Dentistry**, v.1, n.4, p.195-201, 2007.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1100-1103, 2004.

PASSOS, J.G.; PASSAMANI, M. *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae): biologia e dispersão de sementes no Parque do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa, (ES). ES. **Natureza on line**, v.1, n.1, p.1-6, 2013. Disponível em: http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/Revista_Online_Jordania%26Passamani.pdf. Acesso em: 16 maio 2012.

PEREIRA, J.A.; OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P.; FERREIRA, I.; FERRERES, F.; BENTO, A.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.2287-2295, 2007.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y. **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 113p. (Embrapa Florestas. Documentos, 38).

PERNAL, S.F.; CURRIE, R.W. Discrimination and preferences for pollen-based cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. **Animal Behaviour**, v.63, p.369-390, 2002.

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

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4487-4490, 2000.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.130-136, 2001.

PINHEIRO, E.B.; MARACAJÁ, P.B.; MESQUITA, L.X.; SOTO-BLANCO, B.; OLIVEIRA FILHO, R.B. Efeito de diferentes alimentos sobre a longevidade de operárias de abelhas Jandaíra em ambiente controlado. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.4, n.3, p.50-56, 2009.

PIRES, M.M.; COSTA, R.S.; SÃO JOSÉ, A.R.; MIDDLEJ, M.M.B.C.; ALVES, J.M. A cultura do coco: uma análise econômica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.173-176, 2004.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Serviço de Produção de informação, 1994. 320p.

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

RAUHA J.P.; REMES S.; HEINONEN M.; HOPIA A.; KÄHKÖNEN M.; KUJALA T.; PIHLAJA K.; VUORELA H.; VUORELA P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.** v.56, p.3-12, 2000.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

REIS, V.D.A. **Fatores que influenciam na coleta de pólen por Apis mellifera L. e análises físico-químicas do pólen coletado**. Piracicaba, 2001. 76p. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

REIS, V.D.A.; MARCHINI, L.C. Análises físico-químicas de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis Mellifera* L.) em Piracicaba, São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, Florianópolis, 2000. **Anais**. Florianópolis, 2000. Cd Rom.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, RR. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. 1005p.

RESENDE, G.P.S.R.; PIMENTA, F.C.; COSTA L.R.G. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v.5, p.967-970, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RICE-EVANAS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p.933-956,1996.

RIEDER, A.; DORES, E.F.G.C.; HIGA, N.; MORAES, M.P.L. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas**, v.10, p.87-112, 2000.

ROCHA, H.C.; SUZANA, J.; PORTO, S.; FUNARI, S.R.C.; LARA, A.A. O uso de pólen apícola no controle de anemia ferropriva. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 5, Ribeirão Preto, 2002. **Anais**. Ribeirão Preto, 2002. p.295.

ROSA, A.S., BLOCHTEIN, B.; LIMA, D.K. Honey contribution to canola pollination in Southern Brazil. *Sci.Agric.* v.68, n.2, p.255-259, 2011.

ROUBIK, D.W.; MORENO, J.E.P. **Pollen and spores of Barro Colorado Island**. Saint Louis: Missouri Botanical Garden, 1991. 268p. (Monographs in Systematics Botany, v.36).

ROULSTON, T.H.; CANE, J.H. The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). **Evolutionary Ecology**, v.16, p.49-65, 2002.

RUGENFORFF, E.W.; WEIDNER, W.; EBELING, L.; BUCK, A.C. Results of treatment with pollen extract (CerniltonN) in cronic prostatitis and prostadynia. **British Journal of Urology**, v.71, n.4, p.433-438, 1993.

SALOMÉ, J.A.; SALOMÉ, L.G. **Manual prático de produção de pólen apícola**. Florianópolis: EPAGRI, 1998. 53p.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v.13, n.esp., p.64–70, 2004.

SANTOS, F.A.M. Growth and leaf demography of two *Cecropia* species. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.2, p.133-141, 2000.

SCAZZOCCHIO F.; D'AURIA F.D.; ALESSANDRINI D.; PANTANELLA F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiol. Res.** v.161, p.327-333, 2006.

SEIJO, M.C.; AIRA, M.J.; IGLESIAS, I. Palynological characterization of honey from la Coruña province (NW Spain). **Journal of Apicultural Research**, v.31, p.149-155, 1992.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: _____. **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**. Champaign: AOCS Press, 1997. cap.1, p.1-11.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.403-427.

SILVA, C.I.; MAIA-SILVA, C.; SANTOS, F.A.R.; BAUERMANN. O uso da palinologia como ferramenta em estudos sobre a ecologia e conservação de polinizadores no Brasil. IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; CANHOS, D.A.L.; ALVES, D.A.; SARAIVA, A.M., orgs. **Polinizadores do Brasil**, Contribuição e Perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. Edusp, 2012, p369-383.

SCHMIDT, J.O.; BUCHMANN, S.L. Other products of hive. In: GRAHAM, J.M.; AMGROSE, J.T.; LANGSTROTH, L.L., eds. **The Hive and the honey bee**: a new book on beekeeping which continues the tradition of "Langstroth on the hive and the honeybee". Hamilton: Dadant, 1992. p.928-977.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.8, p.2432-2438, 2002.

SERRA-BONVEHÍ, J.; ESCOLÁ-JORDÁ, R. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.3, p.725-732, 1997.

SILVA, W.A.; ANDRADE, C.K.Z.; NAPOLITANO, H.B.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C.; CASTRO, M.R.C.; CAMARGO, A.J. Biological and structure-activity evaluation of chalcone derivatives against bacteria and fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, n.1, p.133-144, 2013.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. 1102p.

SHAPLYGIN, L.V.; SIVAKOV, A.A. Use of crenilton in the therapy of prostatic adenoma and chronic prostatitis. **Urologia**, v.39, n.3, p.35-37, 2007.

SHOSKES, D.A. Phytotherapy in chronic prostatitis. **Urology**, v.60, n.6, suppl., p.35-37, 2002.

SHOSKES, D.A.; MANICKAM, K. Herbal and complementary medicine in chronic prostatitis. **World Journal of Urology**, v.21, p.109-113, 2003.

SLUIS, A.A. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3606-3613, 2001.

SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; CARVALHO, C.A.; MORETI, A.C. Pollen analysis in honey samples from the two main producing regions in the Brazilian Northeast. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79, n.3, p.381–388, 2007.

SOUSA, D.C. **Apicultura**: manual do agente de desenvolvimento rural. 2.ed. Brasília: Sebrae, 2007. 186p. (Rede APIS – Apicultura Integrada e Sustentável).

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

SPERS, E.; KASSOUF, L. Abertura de mercado e a preocupação com a segurança dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.10, n.46, p.16-26, 1996.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v.30, p.3268-3295, 2007.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen**: biology, biochemistry, management. Berlin: Springer-Verlag; New York: Heidelberg, 1974. 287p.

STATISTICA Softwares. Versão SPSS 15.0 para Excel., 2003.

SUKUZI, T.; KUROKAWA, K.; MASHIMO, T.; TAKEZAWA, Y.; KOBAYASHI, D.; KAWASHIMA, K.; TOTSUKA, Y.; SHIONO, A.; IMAI, K.; YAMANAKA, H. Clinical effect of Cernilton in chronic, prostatitis. **Hinyokika Kiyo**, v.38, n.4, p.489-494, 1992.

SUZART, L.R.; DANIEL, J.F.S.; CARVALHO, M.G.; KAPLAN, M.A.C. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (OCHNACEAE). **Química Nova**, v.30, n.4, p.984–987, 2007.

SZCZESNA, T. Study on the sugar composition of honeybee-collected pollen. **Journal of Apicultural Science**, v.51, n.1, p.15-22, 2007.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H.T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1189-1194, 2009.

TOMAS-LORENTE, F.; GARCIA-GRAU, M.M.; NIETO, J.L.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. **Phytochemistry**, v.31, n.6, p.2027–2029, 1992.

TORRES, A.; GUINAND, J.; GUERRA MODERNELL, M. Propiedades nutricionales y estabilidad de los componentes de los alimentos. In: GUERRA MODERNELL, M., coord. **Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos**. Madrid, Miranda: CYTED, 2003. cap.1, p.1-18.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAĞ, Ö.; ÇOĞULU, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 189–195, 2005.

USDA **[Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods – 2007]**. Agricultural Research Service Beltsville Human Nutrition Research Center Nutrient Data Laboratory, Maryland, United States, 2007, 36p.

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 nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.10, n.5, p.1323-1338, 2007.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, p.159-163, 2004.

VECCHIA, P.D. **Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola (determinação de compostos fenólicos e flavonóides totais)**. Pato Branco: Fundação Araucária, 2010. 30p. [Programa Institucional de Iniciação Científica - Relatório Final de Atividades].

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.85–94, 2005.

VIANA, F.M.P.; UCHÔA, C.N.; FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; SARAIVA, H.A.O. **Tratamento do coco verde para exportação com ênfase no controle da podridão-basal-pós-colheita**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 29).

VIANA, P.L.; FILGUEIRAS, T.S. Inventário e distribuição geográfica das gramíneas (Poaceae) na Cadeia do Espinhaço, Brasil. **Megadiversidade**, v.4, p.71-88, 2008.

VIEIRA, E.L.; CARVALHO, F.F.R.; BATISTA, Â.M.V.; FERREIRA, R.L.C.; DOS SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; SILVA, M.J.; BONFIM-SILVA, E.M. Composição química de forrageiras e seletividade de bovinos em bosque-de-Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) nos períodos chuvoso e seco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1505-1511, 2005.

VILLANUEVA, M.T.O.; MARQUINA, A.D.; SERRANO, R.B.; ABELLÁN, G.B. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.53, n.3, p.217-224, 2002.

VINSON, J.A. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5315-5321, 2001.

WAGENLEHNER, F.M.; SCHNEIDER, H.; LUDWIG, M.; SCHNITKER, J.; BRÄHLER, E.; WEIDNER, W. A pollen extract (Cernilton) in patients with inflammatory chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome: a multicentre, randomized prospective, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. **European Urology**, v.56, n.3, p.544-551, 2009.

WANG, C.J.; WANG, J.M.; LIN, W.L.; CHU, C.Y.; CHOU, F.P.; TSENG, T.H. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hidroperoxideinduced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.411-416, 2000.

WANG, S.Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4977-4982, 2001.

WIERMANN, R.; VIETH, K. Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. **Protoplasma**, v.118, n.3, p.230-233, 1983.

WIESE, H. **Novo manual de apicultura**. Guaíba Agropecuária, 1995. 292p.

WIESE, H. **Apicultura: novos tempos**. Guaíba Agropecuária, 2000. 423p.

WISEMAN, H. Isoflavonoids and human health. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.371-396.

WINSTON, M.L. **The biology of the honey bee**. Cambridge: Harvard University Press, 1987. 281p.

WITHERELL, P.C. Otros productos de la colmena. In: DADANT, E. **La colmena y la abeja mellifera**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1975. p.684.

WOJCICKI, J.; SAMOCHOWIEC, L.; BARTLOMOWICZ, B.; HINEK, A.; JAWORSKA, M.; GAWRONSKA-SZKARZ, B. Effect of atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, v.62, p.39-45, 1986.

WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v.28, n.11, p.743-745, 1990.

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.

YILDRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4083-4089, 2001.

ZAFRA, A.O. **El polen em su salud**. Puebla, Pue: Florimiel, 1979. 61p.

ZHANG, X.; HABIB, F.K.; ROSS, M.; BURGER, U.; LEWENSTEIN, A.; ROSE, K.; JATON, J. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth *in vitro*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p.735-738, 1995.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.