

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**EFEITO DA ENCAPSULAÇÃO NA QUALIDADE DO
PÓLEN DE ABELHAS E ESTUDOS DE
BIODISPONIBILIDADE**

MARIVALDA FIGUEREDO SANTA BÁRBARA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2018**

EFEITO DA ENCAPSULAÇÃO NA QUALIDADE DO PÓLEN DE ABELHAS E ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE

MARIVALDA FIGUEREDO SANTA BÁRBARA

Engenheira agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Geni da Silva Sodré

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho

Coorientadora: Dr^a Cerilene Santiago Machado

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

FEVEREIRO - 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S231e	<p>Santa Bárbara, Marivalda Figueredo. Efeito da encapsulação na qualidade do pólen de abelhas e estudos de biodisponibilidade / Marivalda Figueredo Santa Barbara._ Cruz das Almas, BA, 2018. 134f.; il.</p> <p>Orientadora: Geni da Silva Sodré. Coorientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Pólen – Alimento – Qualidade microbiológica. 2.Pólen – Encapsulação. 3.Biodisponibilidade – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Estevinho, Maria Letícia. III.Título.</p> <p>CDD: 664</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas
(Bibliotecário - CRB5 / 1615). Os dados para catalogação foram enviados
pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**EFEITO DA ENCAPSULAÇÃO NA QUALIDADE DO PÓLEN DE
ABELHAS E ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
MARIVALDA FIGUEREDO SANTA BÁRBARA**

Realizada em 26 de Fevereiro de 2018

Prof^a. Dr^a. Geni da Silva Sodré
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Rogéria Comastri de Castro Almeida
Universidade Federal da Bahia
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Manuela Oliveira de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Adriana Regina Bagaldo,
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Fabiane de Lima Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Dalva e Rosalvo, pelos ensinamentos e exemplos de vida.

Aos meus irmãos Elieni, Roseval e aos meus sobrinhos, pelas alegrias.

*"Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei"*

Almir Sater

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que esse dia chegasse e por todas as realizações na minha vida.

À minha família por compreender a minha ausência e apoiar as minhas decisões. A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Instituto Politécnico de Bragança e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade.

À minha orientadora Dr^a. Geni da Silva Sodré, pela confiança, paciência, ensinamentos e incentivo e aos Coorientadores a Dr^a. Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho pela recepção em Portugal, atenção, incentivo, dedicação e transmissão de conhecimentos, contribuindo no desenvolvimento desse trabalho, ao Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho pelas inúmeras oportunidades a mim concedidas, conselhos, incentivos e contribuições para meu aperfeiçoamento e desenvolvimento deste trabalho e, a Dr^a Cerilene Santiago Machado por compartilhar conhecimentos e experiências profissionais.

Aos doutores Dr. Emerson Dechechi Chambó, Msc. Mariese Conceição Alves dos Santos e Dr^a. Fabiane de Lima Silva pela realização das análises estatísticas, Ao Dr Fernando Nunes do departamento de Química Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.Vila Real, Portugal e a Dra Cristina Delerue-Matos e Manuela M. Moreira do Instituto Politécnico do Porto pelas realizações de análises cromatográficas.

Ao Grupo de Pesquisa INSECTA, pela estrutura física, oportunidade de crescimento profissional, convivência e apoio. Em especial às estudantes de Iniciação Científica, Lin Lye e Iraneide Paim pela dedicação e auxílio no desenvolvimento dos trabalhos, a Daniel Vieira, Rosane Sant'Ana e Irana Paim pelo compartilhamento de conhecimentos, aprendizados e momentos de descontração.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado sanduíche.

E por fim a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERENCIAL TEÓRICO	10
ARTIGO 1	
INFLUÊNCIA DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PROPRIEDADES BIOATIVAS DO PÓLEN DE ABELHAS DE ABELHAS DO BRASIL	41
ARTIGO 2	
ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO PÓLEN DE <i>Apis mellifera</i> LINNAEUS, 1758 E DE <i>Trigona spinipes</i> FABRICIUS, 1793, SUBMETIDOS A MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E ENCAPSULAMENTO.....	64
ARTIGO 3	
EFEITO DO PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO EM CÁPSULA NA BIODISPONIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PÓLEN DE <i>Apis mellifera</i> LINNAEUS, 1758 e <i>Trigona spinipes</i> FABRICIUS, 1793.....	106
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133

EFEITO DA ENCAPSULAÇÃO NA QUALIDADE DO PÓLEN DE ABELHAS E ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE

Autora: Marivalda Figueredo Santa Bárbara

Orientadora: Dr^a. Geni da Silva Sodré

RESUMO: O presente estudo objetivou encapsular o pólen de abelha e avaliar o efeito na qualidade microbiológica, físico-química e bioativa ao longo do armazenamento, estudando a sua biodisponibilidade. Para tanto, foram coletados os polens de *Apis mellifera* (município de Canavieiras, Bahia) e de *Trigona spinipes* (Território de Identidade Piemonte do Paraguaçu, Bahia). Os pólenes foram submetidos a secagem em estufa, liofilização e encapsulamento, em seguida foram armazenados em condições controlada. Foram realizadas análises trimestrais da qualidade microbiológica e físico-química e semestrais para fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante (métodos atividade de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo - DPPH, atividade de redução férrica - FRAP e branqueamento de β -caroteno) e análises cromatográficas para quantificação de açúcares, ácidos graxos e compostos fenólicos. Não houve presença de *Salmonella* spp. e esporos de *Clostridium* sulfito redutores, a contagem de coliformes totais manteve-se $<10^3$. Os parâmetros físico-químicos (cinza, lipídeos, proteínas acidez, pH e açúcares) mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente para o pólen apícola. Ocorreu predominância de glicose e frutose no pólen de *A. mellifera* e trealose e glicose no pólen de *T. spinipes*. Os pólenes das duas espécies apresentaram de 59 a 62% de ácidos graxos polinsaturado e baixa relação ω -6/ ω -3. Foram quantificados 16 compostos fenólicos, dos quais, 14 no pólen de *T. spinipes*, com predominância de kaempferol-3-O-glucoside e miricetina e 11 no pólen de *A. mellifera*, o kaempferol-3-O-glucoside e quercetina foram os mais abundantes. Os polens das espécies estudadas apresentaram atividade antioxidante. Os métodos de conservação não afetaram a biodisponibilidade *in vitro* dos compostos bioativos, mostrando-se um produto com propriedades benéficas para a saúde humana.

Palavras-chaves: Antioxidante, ácidos graxos, fenólicos, liofilização

EFFECT OF ENCAPSULATION ON BEE POLLEN QUALITY AND BIOAVAILABILITY STUDIES

Author: Marivalda Figueredo Santa Bárbara

Advisor: Dr^a. Geni da Silva Sodré

ABSTRACT: This work encapsulated bee pollen and evaluated the effect on its microbiological, physical-chemical and bioactive quality during storage, studying its bioavailability. We collected the pollens of *Apis mellifera* (municipality of Canavieiras, Bahia) and *Trigona spinipes* (municipality of Identidade Piemonte do Paraguaçu, Bahia). The pollen was oven dried, freeze-dried, encapsulated, and stored in controlled conditions. Analyses on microbiological and physical-chemical quality were conducted every three months. Analyses on total phenols and flavonoids, antioxidant activity (elimination methods of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH, chlorosis activity reduction – FRAP and β -carotene bleaching). We conducted chromatographic analyses for quantification of sugars, fatty acids and phenolic compounds. There was no presence of *Salmonella* spp. and sulfite reducing *Clostridium* spores, and total coliform count was $<10^3$. The physical and chemical parameters (ash, lipids, proteins, acidity, pH and sugars) remained within the limits established by current legislation for pollen. There was predominance of glucose and fructose in pollen of *A. mellifera* and trehalose and glucose in pollen of *T. spinipes*. Pollens of both species showed 59 to 62% of polyunsaturated fatty acids and low - ω -6/ ω -3 ratio. We quantified 16 phenolic compounds with 14 in pollen of *T. spinipes*, with predominance of kaempferol-3-O-glucoside and myricetin, and 11 in pollen of *A. mellifera*, where kaempferol-3-O-glucoside and quercetin were the most abundant. Pollens of the species studied showed antioxidant activity. The conservation methods did not affect *in vitro* bioavailability of bioactive compounds, showing a product with beneficial properties for human health.

Key words: Antioxidant, fatty acids, phenolics, freeze-drying

REFERENCIAL TEÓRICO

1. CRIAÇÃO DE ABELHAS

A apicultura e a meliponicultura são atividades que envolvem a criação de abelhas de forma racional. Enquanto a apicultura está relacionada à criação das abelhas do gênero *Apis*, as mais utilizadas comercialmente, a meliponicultura se ocupa da criação de abelhas sem ferrão (VENTURIERI, 2003). No entanto, são as abelhas *Apis mellifera* as responsáveis pela produção apícola do país (MARTINEZ; SOARES, 2012).

Antes da introdução da espécie *A. mellifera*, no Brasil existiam as abelhas nativas, também conhecidas por meliponíneos, abelhas sem ferrão e como eram manejadas pelos indígenas, também são chamadas de “abelha indígena”. Estas abelhas estão inseridas na família Apidae, subfamília Meliponinae, tribo Meliponini e subtribo Meliponina com apenas um gênero (*Melipona*) e a subtribo Trigonina com os demais gêneros (SILVEIRA et al., 2002; CAMARGO e PEDRO 2013).

A subtribo Trigonina possui espécies distribuídas em toda a área dos trópicos sendo representada por diversos gêneros tais como: *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811, *Trigona spinipes* Fabricius, 1793, *Scaptotrigona depilis* Moure, 1942, entre outras (NOGUEIRA-NETO, 1997; PALAZUELOS BALLIVIÁN, 2008).

Os meliponíneos ocorrem nas regiões tropicais e em algumas subtropicais do mundo. São encontrados na América do Sul, América Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África. Atualmente, considera-se que existam aproximadamente 400 espécies. Cerca de 87 são endêmicas do Brasil, correspondendo a 20% de espécies de abelhas sem ferrão estimadas para a região Neotropical (NOGUEIRA-NETO, 1997; PEDRO, 2014).

A diversidade de abelhas sem ferrão no Brasil se deve ao fato dos ecossistemas brasileiros apresentarem características que possibilitam a criação

destas espécies, tanto pelas condições climáticas favoráveis quanto pela oferta abundante de alimento (néctar e pólen) (VENTURIERI, 2008).

A criação de abelhas sem ferrão é muito comum entre as populações brasileiras e tem sido realizada há séculos pelas populações rurais, principalmente, do norte e nordeste, bem como nas comunidades tradicionais formadas por indígenas e quilombolas (CARVALHO; MARTINS; MOURÃO, 2014). Estas comunidades tinham práticas de manejo muito ligadas à cultura local, com a finalidade de obtenção de mel e pólen para uso como alimento, em ritos espirituais e para fins medicinais (CAPPAS e SOUSA, 1995; NOGUEIRA-NETO, 1997; BRUENING, 2006).

O principal produto obtido da criação de abelhas sem ferrão no Brasil ainda é o mel, além da comercialização de novos ninhos oriundos de multiplicação, do lazer, preservação da espécie e educação ambiental que são alguns dos produtos oferecidos pela meliponicultura (MAIA et al., 2017).

Apesar do desenvolvimento e crescimento da meliponicultura, no Brasil, esta atividade é carente de outras práticas tecnológicas que aprimorem o processo de extração dos produtos, tornando-os mais valorativos e, principalmente, de uma legislação condizente com as suas necessidades (COLETTTO-SILVA, 2005). Diferentemente da apicultura com a criação da *A. mellifera*, a meliponicultura apresenta deficiências, principalmente na parte higiênica sanitária, o que dificulta a ampliação de mercado dos seus produtos, especialmente no que se refere à exportação e comercialização (LOPES; FERREIRA; SANTOS et al., 2005).

As abelhas são responsáveis não só pela elaboração de um produto muito apreciado e largamente comercializado, o mel, como também do pólen apícola e da própolis, dentre outros, com elevado valor de mercado. O interesse pela criação racional dessas abelhas ao longo dos tempos, justifica-se pelas propriedades funcionais de seus produtos utilizados pela medicina tradicional.

2. POLÉN

Produzido pelas anteras o pólen é o gameta masculino das flores, o qual é transferido para o ovário, onde ocorre a fecundação, garantindo assim a

reprodução da planta e conseqüentemente a sobrevivência da espécie (BOGDANOV, 2014).

As abelhas recolhem os grãos de pólen das anteras das flores, e aglutinam em pequenos peletes com o auxílio de pequenas quantidades de néctar e de secreções salivares (CAMPOS et al., 2008; CARPES et al., 2008; FEÁS et al., 2012; ARRUDA et al., 2013).

Segundo a Normativa nº 03, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), define-se pólen apícola como 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 armazenado em colmeia ou o "pão de abelha" geralmente se refere ao pólen de flores coletado pelas abelhas, misturado com néctar e depositado nos alvéolos ou potes de cera. O produto final do armazenamento do pólen é altamente ácido (pH 4) e o pólen armazenado em células eventualmente contém 40-50% de açúcares simples (ANDERSON et al., 2014; NICOLSON, 2017).

Durante o armazenamento do pólen, este passa por processos fermentativos que modificam consideravelmente o seu odor, o sabor, a cor e a textura (MENEZES et al., 2013). De acordo com Vasquez e Olofsson (2009) as bactérias lácticas estão envolvidas na produção do "pão de abelha", dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação.

Pesquisas recentes comprovam que não há preferência de consumo pelas abelhas *A. mellifera* entre o pólen armazenado e o pólen recém-coletado (CARROLL et al., 2017; NICOLSON et al., 2017). No entanto, as abelhas campeiras de *A. mellifera* se alimentam do pólen recém-coletado (ANDERSON et al., 2014). As abelhas sem ferrão alimentam-se de pólen armazenado (pão de abelha) (VOLLET-NETO et al., 2017).

O pólen de abelha contém substâncias nutricionais importantes, como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios, vitaminas, minerais, e vestígios de micronutrientes (CARPES et al., 2013).

Cada tipo de pólen apícola tem características específicas associada à espécie floral, e o valor nutricional desse produto varia com a origem botânica e geográfica (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

2.1. Importância do pólen para as abelhas

Todas as espécies de abelhas necessitam dos recursos florais para sua alimentação, entre eles o néctar e pólen. O néctar representa a fonte de energia para os adultos e imaturos. O pólen representa a principal fonte proteica e é disponibilizado para os imaturos dentro da célula de cria (PINHEIRO et al., 2014).

O pólen é considerado a principal fonte de alimento não líquido para as abelhas, pois contém todos os nutrientes essenciais para a produção da geleia real, com a qual nutre as larvas das abelhas operárias e zangões e a rainha durante toda sua vida. É a fonte de proteínas e lipídios para as larvas, possivelmente para todas as espécies de gêneros de Apidae, pois a quantidade de proteínas e gorduras no néctar é insignificante (MORETI, 2006).

O pólen possui funções fundamentais no desenvolvimento adequado das crias e nutrição de abelhas jovens, no funcionamento das glândulas e ovários e formação das gorduras corporais, além de servir como fonte de nitrogênio (SCHÄFER et al., 2006; BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

De acordo com o Nicolson et al. (2017) as abelhas tanto consomem o pólen armazenado como o pólen recém-coletado, no entanto o pólen armazenado é importante para a ativação do ovário nas abelhas. Portanto, a carência de pólen na natureza, pode afetar a produtividade das colônias, bem como a fisiologia das próprias abelhas e sua longevidade (SCHAFASCHEK, 2005; HUMAN et al., 2006).

A deficiência de proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais e água pode prejudicar o desenvolvimento, manutenção e reprodução das colônias, reduzir a vida das abelhas, provocar estresse e facilitar o aparecimento de doenças além de afetar a capacidade das abelhas de cuidarem das crias novas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Sabe-se que as abelhas necessitam de 10 aminoácidos essenciais como a arginina, histidina, lisina, triptofano, felinina, metionina, treonina, leucina, isoleucina e valina, os quais são todos obtidos do pólen. Uma dieta deficiente em qualquer um destes aminoácidos pode provocar sintomas específicos de carência, uma vez que as proteínas que os contêm não poderão ser sintetizadas pelas abelhas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

As abelhas recorrem à sua própria fonte de reserva na ausência do pólen, e, ao receberem material nutritivo, no caso pólen, rapidamente assimilam os principais nutrientes que haviam perdido, reintegrando-se à normalidade (MARCHINI et al., 2006).

2.2. Produção de pólen

A produção mundial de pólen apícola é estimada em 1500 toneladas, sendo a Espanha o maior produtor mundial, seguido da China, Austrália e da Argentina. Os maiores exportadores mundiais são Espanha, China, Argentina e Hungria, e os principais importadores os EUA, Reino Unido, Alemanha, França e a Itália (ESTEVINHO et al., 2012).

No Brasil, a produção de pólen apícola iniciou-se discretamente no final da década de 80. Atualmente, o mercado é favorável ao consumo de produtos naturais, complementares à dieta ou com efeitos terapêuticos. O consumo do pólen é proposto devido a todas as qualidades e características físico-químicas e por ser considerado um "nutriente verde", uma vez que não requer processamento elaborado, exceto a secagem para conservação durante o armazenamento, depois de ser recolhido (MORES-ARROCHA et al., 2018).

Estima-se que a produção nacional de pólen seja superior a 200 toneladas ao ano, quantidade insuficiente para atender o mercado interno. Há produção em praticamente todos os Estados da Federação, porém a Bahia, Santa Catarina e Paraná são responsáveis por grande parte do pólen comercializado em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (ALVES, 2013).

No ranking nacional, os estados da Bahia, de Santa Catarina e de Sergipe lideram a produção *in natura* de pólen apícola no país. Na Bahia o município de Canavieiras é o maior produtor e pioneiro e, se destaca por produzir pólen de janeiro a dezembro. Em 2016, uma cooperativa local produziu de 4 a 5 toneladas (SEBRAE, 2017).

O Brasil apresenta potencial para se tornar um dos grandes produtores mundiais de pólen de alta qualidade, particularmente devido à grande diversidade de flora tropical e da resistência das abelhas *A. mellifera*. Esta diversidade floral permite que as abelhas colem pólen durante todo o ano (FREIRE et al., 2012). Não existem dados para a produção e comercialização de pólen apícola no Brasil,

mas é de conhecimento que existe uma produção e uma demanda pelo produto. No entanto, para as espécies de abelhas sem ferrão não é relatado produção em escala comercial, tão pouco sua comercialização. O mercado do pólen dessas abelhas ainda é local e seu consumo baseado no empirismo.

2.3. Importância na alimentação humana

O pólen apícola é definido como um alimento, no entanto, é consumido em pequenas quantidades, e devido às suas propriedades poderá vir a ser usado como um alimento funcional ou suplemento alimentar (CAMPOS et al., 2010).

Há muitos anos o pólen apícola tem sido usado na medicina tradicional, nutrição suplementar e em dietas alternativas, principalmente devido às suas propriedades nutricionais e benefícios à saúde (PEREIRA et al., 2007; BOGDANOV, 2014). Por conter todos os aminoácidos essenciais para o organismo humano, o pólen apícola é conhecido como o “único alimento perfeitamente completo” (PASCOAL et al., 2014).

Este produto da colmeia tem sido usado tradicionalmente para consumo humano, bem como em medicina popular e complementar. De fato, estudos recentes relatam valiosas propriedades biológicas, entre as quais: antimicrobiano, anti-inflamatório, antimutagênica (ÖZCAN et al., 2004; KACÁNIOVÁ et al., 2012), antioxidante (MORAIS et al., 2011; JIN; SARAVANAKUMAR; WANG, 2017), antialérgica (MOITA et al., 2014), antiviral, hipoglicêmica, hipolipidêmica e imunestimulante (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015); estrogênica (CUSHNIE; Lamb et al., 2005); redutor dos níveis séricos de triglicérides e colesterol (LENGLER, 2002), imunomoduladora (FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ et al., 2013) atividade anticancerígena (MARKIEWICZ-ŽUKOWSKA et al., 2013) inibição da atividade de melanogênese (SUN et al., 2017), inibição enzimática (ARAUJO et al., 2017).

Segundo a literatura as propriedades biológicas do “pão de abelha” dependem não só dos compostos fenólicos, mas também de antioxidantes não-fenólicos como os ácidos graxos e seus derivados, com predominância dos ácidos graxos insaturados (MARKIEWICZ-ŽUKOWSKA et al., 2013).

A composição nutricional também é importante para a atividade bioativa do pólen, este produto é uma fonte natural de antioxidantes como os ácidos fenólicos

e flavonoides, responsáveis por sua atividade biológica. Trabalho desenvolvido por Rzepecka-Stojko et al. (2016) indicou a correlação entre polifenóis alimentares e efeitos cardioprotetores, hepatoprotetores, anti-inflamatórios, antibacterianos, anticancerígenos, imunoestimulantes e antianêmicos.

3. QUALIDADE

3.1. Qualidade microbiológica do pólen

A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e potencial risco à saúde da população, isto é, potencial de ser um veículo de transmissão de doenças de origem alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

O pólen apresenta muitos benefícios para a saúde, porém, o produto é susceptível a contaminações ambientais e ao crescimento de microrganismos devido, sobretudo, ao seu elevado teor de nutrientes. De fato, o pólen está exposto a contaminações microbianas, que podem ter origem nas abelhas, materiais vegetais, insetos, animais, manipulação e equipamentos agrícolas (HANI et al., 2012). O que o torna suscetível a uma rápida deterioração, aumentando o risco de intoxicação alimentar por contaminação microbiana.

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos nos alimentos depende de fatores intrínsecos como a atividade de água, pH, composição química, presença de fatores antimicrobianos naturais, interações entre os microrganismos presentes nos alimentos, dentre outros os fatores extrínsecos os mais importantes são umidade, a temperatura ambiente e a composição química da atmosfera que envolve o alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

De acordo com Estevinho et al. (2012), devido as características do pólen apícola, uma enorme variedade de microrganismos podem se multiplicar se as práticas de colheita, armazenamento e comercialização não forem apropriadas.

Não há legislação internacional específica para este produto e a legislação brasileira estabelece limites apenas para parâmetros físico-químicos,

(BRASIL, 2001). A legislação cubana, que inclui o pólen apícola no grupo dos alimentos de origem vegetal, estabelece limites para aeróbios mesófilos $< 10^4$, bolores e leveduras $< 10^2$, coliformes totais, $< 10^3$ e ausência de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* em 25g (PUIG-PEÑA et al., 2012). A legislação da Argentina estabelece limite máximo de $1,5 \times 10^5$ UFC/g para aeróbios mesófilos, máximo de 10^2 UFC/g para bolores e leveduras e ausência de microrganismos patogênicos (ARGENTINA, 1990).

Com a finalidade de propor critérios de qualidade e um padrão internacional de identidade e qualidade para o pólen de abelha, pesquisadores da *International Honey Commission* (IHC), recomendaram limites para os microrganismos aeróbios mesófilos totais ($< 10^5$ UFC/ g), bolores e leveduras ($< 5 \times 10^4$ UFC g⁻¹), Enterobacteriaceae (10^2 UFC/ g), *E. coli* (ausência em 1 g), *Salmonella* spp. (ausência em 10 g) e *Staphylococcus aureus* (ausência em 1 g) (CAMPOS et al., 2008).

Foi relatado por Arruda et al. (2017) a presença de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* spp em amostras de pólen comerciais de todo o Brasil. A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foi mencionada em trabalhos de diversos países (ESTEVINHO et al., 2012; FEÁS et al., 2012; HANI et al., 2012 ; NOGUEIRA et al., 2012), ambos na faixa de < 10 a 10^4 CFU/ g, dentro dos limites pré estabelecidos.

Ainda não foram relatados as presenças de *Salmonella* sp. e *Clostridium* sulfito redutor para amostras de pólen apícola brasileiro.

3.2. Qualidade físico-química

Para ser comercializado no Brasil, o pólen apícola deve apresentar os seguintes requisitos físico-químicos: umidade máxima de 30% para o pólen recém-coletado e umidade máxima de 4% para o pólen seco; teor de cinzas máximo de 4%; lipídios mínimo de 1,8%; proteínas mínimo de 8%; açúcares totais de 14,5% a 55,0%; fibra bruta mínimo de 2% e pH de 4 a 6 (BRASIL, 2001).

O pólen apícola é rico em carboidratos, proteínas, lipídios, (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005; SAGONA et al., 2017). Também é rico em aminoácidos essenciais (prolina, ácido aspártico, fenilalanina e ácido glutâmico) (PARAMAS et al., 2006; YANG et al., 2013), ácidos graxos (ácido linoléico e linolênico), esteróis, fosfolípidos e carotenóides (XU et al., 2009; SAGONA et al.,

2017). Além disso, é uma fonte de diferentes carboidratos como: glicose, frutose e maltose (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005) minerais (SERRA BONVEHÍ; ESCOLÀ JORDÀ, 1997; YANG et al., 2013; KOSTIĆ et al., 2015; SATTLER et al., 2016;) e vitaminas (ARRUDA et al., 2013; SATTLER et al., 2015).

Ainda destaca-se na composição do pólen os minerais cálcio, cloro, cobre, ferro, magnésio, iodo, molibdênio, selênio, estrôncio, estanho, boro, flúor, fósforo, potássio, enxofre, alumínio, ferro, manganês e zinco, fibras, compostos fenólicos, flavonóides, esteróis e 12 terpenos, além de corantes, enzimas e coenzimas (VILLANUEVA et al., 2002; BOGDANOV, 2011).

A composição do pólen não possui um padrão rigoroso, pois varia com a origem floral, áreas geográficas, condições ambientais, climáticas, idade e estado nutricional da planta e estações do ano. De fato o pólen é um dos produtos da colmeia que apresenta maior diversidade em sua composição (CARPES et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2012, ESWARAN; BHARGAVA, 2014).

Assim o conhecimento da composição físico-química do pólen, se traduz em importante ferramenta, no sentido de tipificar o produto obtido em diferentes regiões (MARCHINI et al., 2006).

Estudos mais detalhados e específicos também são bem-vindos para avaliar as suas propriedades terapêuticas (FREIRE et al., 2012).

3.3. Compostos fenólicos

Os fitoquímicos são metabolitos secundários das plantas, tendo como uma classe importante os compostos fenólicos ("fenóis" e "polifenóis"). Esses são essenciais para as plantas na sua pigmentação, crescimento, reprodução, resistência a agentes patogênicos, dentre outras funções. Representando a principal fonte de antioxidantes exógenos na dieta humana (GIOXARI et al., 2016).

Os compostos fenólicos são classificados de acordo com as diferenças em sua estrutura química, o número de anéis fenólicos e grupamentos que os ligam. As principais classes são ácidos fenólicos, flavonoides, amidas fenólicas, além de outros polifenóis não flavonoides encontrados em alimentos que são considerados importantes para a saúde humana (TSAO, 2010).

Os ácidos fenólicos incluem derivados de ácido hidroxibenzóico tais como ácidos p-hidroxibenzóico, protocatequico, gálico, vanílico e siringídico e derivados de ácido hidroxicinâmico tais como ácidos cafeico, ferulico, p-couárico e sinápico (SINGH et al., 2017).

Os flavonoides são os maiores grupos de fenólicos e representam a metade dos compostos fenólicos conhecidos nas plantas. Composto por 15 átomos de carbono dispostos em três anéis (C6-C3-C6) rotulados como A, B e C, respectivamente; A e B são dois anéis aromáticos, e C é uma ponte de três carbonos, geralmente na forma de um anel heterocíclico. Com base no grau de saturação e nos substituintes do anel C, os flavonoides são divididos em seis subgrupos, incluindo flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanonóis e antocianinas (XU et al., 2017).

Existem muitos métodos disponíveis para a extração de compostos fenólicos, mas nenhum método pode ser categorizado como um método padrão. A extração de compostos fenólicos é principalmente afetada por vários parâmetros como o tamanho de partícula das amostras, o tipo de solvente utilizado, a relação soluto e solvente, taxa de agitação, eficiência de transferência de massa e temperatura utilizada (SINGH et al., 2017).

Os compostos fenólicos do pólen são obtidos por meio de uma extração com solvente (etanol ou metanol) e mistura de água. O método clássico Folin Ciocalteu, tem sido predominantemente empregado para avaliar o conteúdo fenólico total no pólen de abelhas. (MONTENEGRO et al., 2013; PASCOAL et al., 2014, BARBARA et al., 2015; GABRIELE et al., 2015).

Na separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos são utilizadas técnicas avançadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) com detector de arranjo de diodos (DAD) e/ou detector de espectrometria de massa (LC-MS) é a ferramenta analítica mais utilizada para a quantificação de polifenóis em amostras de pólen apícola. Compostos fenólicos como rutina, quercetina, ácido cafeico, resveratrol ou kaempferol foram detectados em amostras de pólen (RZEPECKA-STOJKO et al., 2016; SUN et al., 2017).

3.4. Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes nos alimentos ou no corpo, em concentrações muito baixas, retardam, controlam ou impedem processos oxidativos (SHAHIDI; ZHONG, 2015). Os antioxidantes que se enquadram nesta definição incluem eliminadores de radicais livres, extintores de oxigênio singulares, inativadores de peróxidos e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), quelantes de íons metálicos, extintores de produtos de oxidação secundária e inibidores de enzimas pró-oxidativas (SHAHIDI; ZHONG, 2007).

Os radicais livres são compostos reativos que tendem a capturar elétrons de moléculas biológicas estáveis para se estabilizarem. Em condições patológicas, existe uma superprodução de radicais livres devido à presença de compostos pró-oxidantes e / ou outros fatores de risco como tabagismo, excesso de atividade física, estresse, entre outros, dando origem ao estresse oxidativo (CÖMERT; GÖKMEN, 2018).

As principais espécies reativas ao oxigênio (EROs) produzidas são hidroxila ($\text{OH}\cdot$), íon superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), alcóxila ($\text{RO}\cdot$), peróxila ($\text{ROO}\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peridroxila ($\text{HOO}\cdot$). Além de oxigênio singlete, complexos de metais de transição, radicais de nitrogênio entre outros (FERREIRA; BARROS; ABREU, 2009).

A capacidade de eliminação natural do radical de antioxidantes pode ser classificada como dois mecanismos principais: transferência de átomos de hidrogênio (HAT) e transferência de elétrons (ET). Os antioxidantes naturais que possuem essa capacidade são chamados de eliminador de radicais livres (FRS) (CHEN; XU, 2017).

As atividades antioxidantes dos extratos de pólen de abelhas são amplamente estudadas por meio dos métodos *in vitro* e resultados indicam que os compostos fenólicos derivados do pólen aumentam significativamente a atividade antioxidante (ALIČIĆ et al., 2014; WU et al., 2014; HARIF FADZILAH et al., 2017). Segundo Jin; Saravanakumar; Wang (2017) o pólen apresenta bons resultados em estudo de atividade antioxidante *in vivo*.

Há também confirmação que o uso de pólen de abelha como antioxidante natural, combinado com o armazenamento em temperatura refrigerada, pode ser considerado um método efetivo para retardar a oxidação lipídica na salsicha de porco, podendo ser uma alternativa aos antioxidantes

sintéticos (FLORIO ALMEIDA et al., 2017). O seu uso também foi apontado para aumentar a atividade antioxidante em alimentos de confeitarias (KRYSTYJAN et al., 2015).

4. CONSERVAÇÃO DO PÓLEN

A conservação de alimentos tem como objetivos manter a qualidade nutritiva e características organolépticas, além de impedir a multiplicação de microrganismos e de suas toxinas, aumentando o tempo de prateleira e estabilidade dos produtos. Os processos de conservação visam eliminar ou inibir a ação dos microrganismos, evitar a proliferação patogênica, evitar reações enzimáticas, reduzir a velocidade das reações químicas de oxidação e preservar as características originais (MARTINS, 2008; CARDOSO; RÜBENSAM, 2011).

A vida de prateleira compreende o período de tempo durante o qual um alimento se mantém seguro (sem estragar) para o consumidor, com as características sensoriais, físicas, químicas, funcionais (cor, sabor, odor, textura) e nutricionais desejadas, explicitadas no rótulo, e sob as condições de armazenagem recomendadas (CARDOSO; RÜBENSAM, 2011).

Atualmente pesquisas vêm investigando novos métodos de conservação do pólen de abelhas. A exemplo do estudo com emprego de liofilização realizado por Ranieri et al. (2017). Assim como em tratamento com micro-ondas (CANALE et al., 2016; CONTE et al., 2017).

A legislação brasileira cita a desidratação como um passo importante para a preservação do pólen apícola, uma vez que a umidade inicial que no momento da coleta está em torno de 30%, deve ser reduzida a 4%. Uma vez desidratado, o pólen é designado como "pólen apícola desidratado", para o qual a legislação brasileira estabelece uma temperatura máxima para a desidratação de 42°C (BRASIL, 2001; BARRETO; FURANI; ORSI, 2005).

4.1. Secagem

A secagem ou desidratação, é um dos métodos mais antigos utilizados para a conservação de alimentos. É uma técnica, que se baseia em reduzir o teor de umidade de um alimento para um nível em que o crescimento microbiano é

inibido ou onde a velocidade de uma reação química adversa é minimizada (BARAT; GRAU, 2016).

Contudo, a temperatura de processamento costuma ser insuficiente para provocar a inativação microbiana em um alimento. Portanto, qualquer aumento no teor de umidade durante a estocagem, devido, por exemplo, a uma embalagem defeituosa resultará em uma rápida deterioração (FELLOWS, 2006).

A remoção da água a partir de um alimento sólido ou solução por evaporação requer energia térmica, e esta é muitas vezes fornecida em forma de vapor ou ar quente. Conseqüentemente, a secagem é considerada tanto como uma transferência de calor quanto de transferência de massa (SMITH et al., 2011). Os produtos secos têm peso reduzido, vida útil prolongada e exigem menor custo de transporte (SURIYA et al., 2016).

Entre os diferentes processos de secagem, o método de secagem mais convencional utiliza ar quente, contudo, a sua elevada temperatura e longos ciclos de secagem geralmente resultam em degradação importante do sabor, cor e compostos nutricionais (KEJING et al., 2016).

Nesse contexto a secagem do pólen apícola é um processo de extrema importância para a sua conservação e conseqüentemente para a segurança alimentar deste produto. O processo de secagem reduz o teor de umidade de 25-30% para valores entre 4% e 8%, considerados adequados para a sua preservação (CAMPOS et al., 2008).

De acordo com Marchini et al. (2006), o pólen é altamente higroscópico e, influenciado pelo tipo de embalagem utilizada, além das condições de armazenamento, tais como a temperatura e umidade relativa do ambiente. Desta forma, a encapsulação pode vir a ser uma forma de proteção do pólen dos fatores ambientais durante o armazenamento.

4.2. Liofilização

É também conhecida como criosecagem, incluindo o processo onde ocorre a desidratação dos produtos sob condições de pressão e temperatura específicas, de forma que a água, previamente congelada, passa do estado sólido diretamente para o estado gasoso (processo físico de sublimação) (WOJSLAW, 2012).

O processo consiste, principalmente, de congelamento e desidratação sob pressão reduzida (HARNKARNSUJARIT et al., 2016). Um processo de liofilização

bem sucedido preserva a maior parte das propriedades das matérias-primas iniciais, tais como forma, dimensões, aparência, sabor, cor, textura, atividade biológica, nutrientes, e elevada capacidade de reidratação. O produto, no estado seco, é geralmente muito poroso, quebradiço, higroscópico e com excelente capacidade de reidratação (CEBALLOS; GIRALDO; ORREGO, 2012; HARNKARNSUJARIT et al., 2016).

De acordo com Sattler et al. (2015) o pólen apícola quando liofilizado apresenta níveis mais elevados de proteínas, lipídios, (vitamina E) e compostos fenólicos, portanto, o uso de liofilização pode ser uma alternativa viável para o atual processo de desidratação, resultando em pólen apícola com propriedades nutricionais e biológicas mais elevados.

4.3. Microencapsulação

A microencapsulação pode ser definida como a tecnologia de embalagem de sólidos, de líquidos ou material gasoso com revestimentos poliméricos finos, formando pequenas partículas chamadas microcápsulas (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Esta técnica tem sido aplicada em uma grande variedade de produtos em diferentes áreas, e estudos demonstraram um enorme potencial para proporcionar o núcleo com características vantajosas, resultando em produtos de qualidade superior, incluindo na indústria alimentar (SILVA et al., 2014).

O encapsulamento de elementos nutracêuticos e funcionais é uma área de interesse crescente nos últimos anos, pois, permite a sua incorporação em diferentes matrizes alimentares que resulta em novos produtos alimentares funcionais, com potenciais benefícios para a saúde (PÉREZ-MASIÁ et al., 2015).

O uso mais comum da encapsulação em alimentos é para a proteção de compostos de aroma, que podem ser perdidos por evaporação, oxidação ou interações com outros compostos, como os carotenoides, pigmentos naturais que são muito instáveis quimicamente, é muito suscetível a oxidação e isomerização, resultando na perda de cor, vitaminas (que são altamente oxidáveis) e ácidos orgânicos utilizados como conservantes (AZEREDO, 2005).

A prática da encapsulação é um método bem estabelecido para a preservação de óleos bioativos. Ela oferece uma infinidade de vantagens, incluindo a proteção efetiva do óleo encapsulado contra a degradação, com a

possibilidade de precisão ao controlar a liberação (RODRÍGUEZ et al., 2016), além de proteger estes produtos de condições ambientais adversas e, assim, aumentando o seu período de vida útil, e assegurando as suas propriedades promotoras da saúde (PÉREZ-MASIÁ et al., 2015).

A técnica também, é uma forma de melhorar as características organolépticas de um produto, mascarando sabores indesejáveis, odores e cores. Pode proteger alguns compostos da degradação ou perda de funcionalidade devido aos efeitos da luz, oxigênio, pH, umidade, ou interação com outros componentes da matriz de alimentos (DE VOS et al., 2010; NEDOVIC et al., 2011).

Ao considerar todas as técnicas de encapsulamento que vem sendo objetos de estudos ultimamente, pode-se notar que muitas delas permanecem como técnicas de uso exclusivo em laboratório e apenas algumas são usadas em escala industrial (emulsificação, coacervação, secagem por pulverização, extrusão, fluido de revestimento de leite) (DIMA; DIMA; IORDĂCHESCU, 2015).

5. BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A bioacessibilidade corresponde à fração de compostos bioativos que é liberada da matriz alimentar após a digestão e solubilização no lúmen intestinal para a absorção na mucosa intestinal (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2014). É, portanto, a fração de um composto potencialmente disponível para posterior absorção (ALMINGER et al., 2014).

No entanto, a bioacessibilidade destes fitoquímicos também depende da estabilidade para sobreviver à digestão no trato gastrointestinal e como esses fitoquímicos fenólicos são absorvidos nos tecidos e órgãos alvos. Então, a biodisponibilidade é fundamental para o potencial das funções biológicas e fisiológicas *in vivo* (ZHANG et al., 2017).

A biodisponibilidade é definida como a fração de nutrientes secretados em circulação que está disponível para absorção de tecido e metabolismo (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2014).

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos é uma característica extremamente importante, e varia amplamente entre os diversos compostos

pórem, não necessariamente entre os mais abundantes em nossa dieta, ou os que apresentam maior capacidade antioxidante *in vitro* (MANACH et al., 2004). As características químicas de compostos bioativos, incluindo solubilidade, hidrofobicidade, peso molecular e configuração de isômeros, estão entre os fatores que afetam sua bioacessibilidade e biodisponibilidade.

A biodisponibilidade dos compostos bioativos de alimentos é um desafio, pois fatores, como a bioacessibilidade, o efeito da matriz alimentar e a microbiota intestinal podem afetar compostos alimentares bioativos durante a digestão (REIN et al., 2013).

Assim, uma compreensão completa das mudanças que ocorrem durante a digestão (como ação mecânica, atividades enzimáticas e pH alterado) é crucial para a compreensão da bioacessibilidade e para calcular a biodisponibilidade e a bioatividade, pois somente os fitoquímicos biodisponíveis exercerão plenamente seus potenciais efeitos benéficos (ALMINGER et al., 2014).

Várias metodologias podem ser utilizadas para avaliar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de compostos bioativos e estas são divididas em quatro grupos: *in vitro* (digestão gastrointestinal simulada, membranas artificiais, culturas celulares), *in situ* (perfusão intestinal em animal), *ex vivo* (avaliações gastrointestinais de órgão em laboratório) e modelos *in vivo* (estudos em animais e humanos). Entre estes grupos, a digestão gastrointestinal simulada é considerada uma alternativa válida e rápida (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; GULLON et al., 2015).

Estudos de bioacessibilidade para pólen apícola foi realizado utilizando o modelo de digestão *in vitro*, para investigar o conteúdo de fenóis totais, flavonoides e potencial antioxidante (YESILTAS et al., 2014; OZKAN et al. 2017).

Com base neste contexto, o presente estudo teve como objetivo encapsular o pólen de abelha e avaliar o efeito na qualidade microbiológica, físico-química e bioativa ao longo do armazenamento, estudando a sua biodisponibilidade.

Para atingir esse objetivo, o trabalho foi dividido nos seguintes artigos:

ARTIGO 1

Influência de métodos de conservação na composição fenólica e propriedades bioativas do pólen de abelhas do Brasil

ARTIGO 2

Estabilidade microbiológica e físico-química de pólen de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e de *Trigona spinipes* Fabricius, 1793, submetidos a métodos de conservação e encapsulamento

ARTIGO 3

Efeito do processamento e armazenamento em cápsula na biodisponibilidade *in vitro* de compostos fenólicos e atividade antioxidante do pólen de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Trigona spinipes* Fabricius, 1793.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIČIĆ, D. et al. Antioxidant properties of pollen. **Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku**, v. 3, n. 1, p. 6-12, 2014.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, n.1, p.105-111, 2005.

ALMINGER, Marie et al. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413-436, 2014.

ALVES, M. L. T. M. F. Pólen - alimento e grande fonte de renda para o apicultor. **Pesquisa & Tecnologia**, v.10, n.2, 2013. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

AN, K. et al. Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. **Food Chemistry**, v. 197, p.1292-1300, 2016.

ANDERSON, K. E. et al. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. **Molecular ecology**, v. 23, n. 23, p. 5904-5917, 2014.

ARAÚJO, J. S. et al. Chemical Composition and Biological Activities of Mono-and Heterofloral Bee Pollen of Different Geographical Origins. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 5, p. 921, 2017.

ARRUDA, V. A. S. de et al. Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 3, p. 231-238, 2017.

ARRUDA, V. A. S. et al. Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using diferente storage conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p.143-148, 2013.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.

BARAT, J.M; GRAU, R. Drying: Principles and Types, In: **Encyclopedia of Food and Health**, **Academic Press**, Oxford, 2016, Pages 456-461, ISBN 9780123849533, Disponível em: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472002403>). Acesso: 20 dez. 2017.

BÁRBARA, M. S. et al. Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12525-12544, 2015.

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 da Indústria Animal**, v. 62, n. 2, p. 167-175, 2005.

BOGDANOV, S. Pollen: nutrition, functional properties, health: A Review. **Bee Product Science**, 2011. Disponível em: <<http://www.bee->

hexagon.net/files/file/fileE/Health/PollenBook2Review.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2016.

BOVI, T. S. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** 2013. 69f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 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, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Publicado no Diário Oficial da União** de 23 de janeiro de 2001, Seção 1, Página 18.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 278-294, 2010.

BRUENING, H. **Abelha Jandaíra.** 3. ed. Natal, RN: SEBRAE/RN, 2006. 138 p.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region 2013- online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 20 jan. 2018.

CAMPOS, M. G. R. et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, v. 47, n. 2, p. 154-161, 2008.

CAMPOS, M. G. R. et al. What is the future of Bee-Pollen? **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 2, n. 4, p. 131-144, 2010.

CANALE, A. et al. Microwave-assisted drying for the conservation of honeybee pollen. **Materials**, v. 9, n. 5, p. 363, 2016.

CAPPAS E SOUSA, J. P. **Os maias e a meliponicultura.** O Apicultor, v. 3 n. 9, p.15-17, 1995.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.

CARDOSO, S.; RÜBENSAM, J. M. **Elaboração e avaliação de projetos para agroindústrias coordenado pela Universidade Aberta do Brasil - UAB/UFRGS** e pelo Curso de Graduação Tecnológica - Planejamento e Gestão para o Desenvolvimento Rural do SEAD/UFRGS. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2011. 66p.

CARPES, S. T. et al. Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. **J Food Agric Environ**, v. 7, p. 667-673, 2009.

CARPES, S. T. et al. 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. et al. Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. **CyTA-Journal of Food**, v. 11, n. 2, p. 150-161, 2013.

CARROLL, M. J. et al. Honey bees preferentially consume freshly-stored pollen. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175933, 2017.

CARVALHO, R. M. A.; MARTINS. C. F.; MOURÃO, J. S. Meliponiculture in Quilombola communities of Ipiranga and Gurugi, Paraíba state, Brazil: an ethnoecological approach. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 3, p. 1-12, 2014.

CHEN, B.; XU, M. Natural Antioxidants in Foods. In: **Reference Module in Food Science**, Amsterdam: Elsevier, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965215990>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO de pólen. Artículo 785 – Resolución 1550 de 12 de dezembro de 1990. Capítulo X, página 15. Disponível em: <http://www.apicultura.entupc.com/portal/legislacion/datos/polen.htm>. Acesso em 10/02/2018.

COLETTI-SILVA, A. Captura de enxames de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) sem destruição de árvores. **Acta Amazonica** v. 35, n.3, p. 383 – 388, 2005

CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76-93, 2018.

CONTE, G. et al. Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 55, p. 12-19, 2017.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v.26, n.5, p. 343-356, 2005.

FLORIO ALMEIDA, J.; et al. T. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. **LWT-Food Science and Technology**, v. 76, p. 299-305, 2017.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, p. 67-70, 1996.

DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.

DIMA, Ș.; DIMA, C.; IORDĂCHESCU, G. Encapsulation of Functional Lipophilic Food and Drug Biocomponents. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 417-438, 2015.

ESTEVINHO, L. M. et al. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 2, p. 429-435, 2012.

ESWARAN, V. U.; BHARGAVA, H. R. Chemical Analysis and Anti-Microbial Activity of Karnataka Bee Bread of *Apis* species. **World Applied Sciences Journal**, v. 32, n. 3, p. 379-385, 2014.

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 48, n. 2, p. 133-138, 2013.

FEÁS, X. et al. Organic bee pollen: bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v.17, n.7, p. 8359-8377. 2012.

FELLOWS, P. Tecnologia do processamento de alimentos: **princípios e prática**. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERREIRA, R. M. A. et al. Ponto de colheita da acerola visando à produção industrial de polpa. **Revista Verde**, v.4, n.2, p. 13-16, 2009.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FREIRE, K. R. L. et al. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, v.17, n. 2, p. 1652-1664, 2012.

GABRIELE, M. et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, n. 2, p. 248-259, 2015.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GIOXARI, A. et al. d A.C. Kaliora, Phenolic Compounds: Bioavailability and Health Effects, In: **Encyclopedia of Food and Health**, Oxford: Academic Press, 2016, 339-345p.

GULLON, B. et al. Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 78, p. 169-176, 2015.

HANI, B. et al. Microbiological Sanitary aspects of pollen. **Advances in Environmental Biology**, v. 6, n. 4, p. 1415-1420, 2012.

HARIF FADZILAH, N. et al. Total phenolic content, total flavonoid and antioxidant activity of ethanolic bee pollen extracts from three species of Malaysian stingless bee. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 2, p. 130-135, 2017.

HARNKARNSUJARIT, N. et al. Effects of freezing on microstructure and rehydration properties of freeze-dried soybean curd. **Journal of Food Engineering**, v. 184, p.10-20, 2016.

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

JIN, T. Y.; SARAVANAKUMAR, K.; WANG, M. H. In vitro and *in vivo* antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2017.

KACÁNIOVÁ, M. et al. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. **Archives of Biological Sciences**, v.64, n.3, p. 927-934, 2012.

KALAYCIOĞLU, Z. et al. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. **LWT-Food Science and Technology**, v. 84, p. 402-408, 2017.

KEJING, N. et al. Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. **Food Chemistry**, v. 197, 2016.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. et al. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

KOSTIĆ, A. Ž. et al. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. **LWT-Food Science and Technology**, v.62, n.1, p. 301-309, 2015.

KRYSTYJAN, M. et al. The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 640-646, 2015.

LEGLER, S. **Apicultura** - Manejo, Nutrição, Sanidade e Produtos das Abelhas. 6 ed. Santa Maria: UFSC 2002.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. dos. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, p. 7-9, 2005.

GABRIELE, M. et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, n. p. 248, 2015.

MAIA, U. M. et al. Meliponiculture in Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 4, p. 327-333, dec. 2017.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

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, São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p. 949-953, 2006.

MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA, R. et al. Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG). **Journal of Apicultural Science**, v.57, n.2, p. 147-157, 2013.

MARTINEZ, O, A.; SOARES, A.E.E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.13, n.4, 2012

MARTINS, T. R. **Métodos de conservação de alimentos I**. 2008. Disponível em: <<http://aprender.unoeste.br/moodle/mod/forum/discuss.php?d=4088>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

MENEZES, C. et al. The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: **Pot-Honey**. Springer, New York, NY, 2013. p. 153-171.

MENDES, G. C. et al. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, v.22, n.2, p. 7-14, 2009.

MICHENER, C. D. The bees of the world. 2. ed. Baltimore: **The Johns Hopkins University Press**, 2007. 913 p.

MOITA, E. et al. Effects of *Echium plantagineum* L. bee pollen on basophil degranulation: Relationship with metabolic profile. **Molecules**, v.19, n.7, p. 10635-10649, 2014.

MONTENEGRO, G., PIZARRO, R., MEJIAS, E.; RODRIGUEZ, S.. Biological evaluation of bee pollen from native Chilean plants. **Phyton (Buenos Aires)**, v. 82, p. 7-14, 2013.

MORAIS, M. et al. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1096-1101, 2011.

MORES-ARROCHA, A. et al. Evaluation of the use of multiflora bee pollen on the volatile compounds and sensorial profile of *Palomino fino* and Riesling white young wines. **Food Research International**, v. 105, p. 197-209, 2018.

MORETI, A. C. C. C. **Pólen: Alimento Proteico para as abelhas - Complemento Alimentar para o Homem**. 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Polen/index.htm>. Acesso em: 01 ago. 2015.

NEDOVIC, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1806-1815, 2011.

NICOLSON, S. W. et al. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (*Apis mellifera scutellata*). **Journal of insect physiology**, 2017.

NOGUEIRA, C. et al. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International journal of molecular sciences**, v.13, n.9, p. 11173-11187, 2012.

NOGUEIRA-NETO P. **Vida e criação de abelha sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 445p.

ÖZCAN, M. et al. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. **Nahrung**, v.48, n.3, p.188-194, 2004.

OZKAN, K. et al. Bioactive and bioaccessibility characteristics of honeybee pollens collected from different regions of Turkey. **Journal of Food Measurement and Characterization**, p. 1-7, 2017.

PALAZUELOS BALLIVIAN, J. M. P. **Abelhas nativas sem ferrão**. São Leopoldo: Oikos, 2008. 187p.

PARAMÁS, A. M. G. et al. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). **Food Chemistry**, v. 95, n. 1, p. 148-156, 2006.

PASCOAL, A. et al. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 233-239, 2014.

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PEREIRA, F. M. et al. Efeito tóxico de alimentos alternativos para abelhas *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.533-538, 2007.

MANACH, Claudine et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

PINHEIRO, M. et al. Polinização por abelhas. In: RECH, A. R. et al. **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural. 2014. 205-234p.

PUIG-PEÑA, Y. et al. Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 43, n. 1, 2012.

RANIERI, A. et al. Freeze-drying duration influences the amino acid and rutin content in honeybee-collected chestnut pollen. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017.

REIN, M. J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588-602, 2013.

RODRÍGUEZ, Julia et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41-59, 2016.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M, J. et al. In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice-and milk-based beverages. **Food research international**, v. 62, p. 771-778, 2014.

RZEPECKA-STOJKO, A. et al. Polyphenol content and antioxidant activity of bee pollen extracts from Poland. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 482-490, 2016.

RZEPECKA-STOJKO, A. et al. Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21732-21749, 2015.

SAGONA, S. et al. Palynological origin, chemical composition, lipid peroxidation and fatty acid profile of organic Tuscanian bee-pollen. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 2, p. 136-143, 2017.

SATTLER, J. A. G. et al. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**, v. 77, p. 82-91, 2015.

SATTLER, J. A. G. et al. Essential minerals and inorganic contaminants (barium, cadmium, lithium, lead and vanadium) in dried bee pollen produced in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 36, n. 3, p. 505-509, 2016.

SCHAFASCHEK, T. P. **Do convencional ao ecológico: normas, divergências e implicações sobre a produção apícola**. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2005.

SCHÄFER, M. O. et al. Individual versus social pathway to honeybee worker reproduction (*Apis mellifera*): pollen or jelly as protein source for oogenesis?. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 192, n. 7, p. 761, 2006.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Agronegócios: produção de pólen**. 2017. Disponível em: <<http://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/BA/Anexos/P%C3%B3len%20na%20Bahia.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2018.

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

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidante activity. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SILVA, P. T. da et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.

SILVA, P. T. et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras, sistemática e identificação. Ed. MMA e Fundação Araucárias, Belo Horizonte-MG, 2002, 253p.

SINGH, B. et al. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, p. 1-16. 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v.299, p. 152-178, 1999.

SMITH, P.G. Low-Temperature Preservation. In: **Introduction to food process engineering**, food science text series. 2011, p. 275–296.

SUN, Liping et al. Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 104, 2017.

SURIYA, M. et al. Influence of blanching and drying methods on molecular structure and functional properties of elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) flour. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 235-243, 2016.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.

VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. **Journal of apicultural research**, v. 48, n. 3, p. 189-195, 2009.

VENTURIERI, G. C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2 ed. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 60p.

VILLANUEVA, M. T. O. et al. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. **International Journal of Food and Nutrition**, v.53, n.3, p.217-224, 2002.

VOLLET-NETO, A. et al. Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona aff. depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. **Apidologie**, v. 48, n. 2, p. 204-210, 2017.

WANG, J. et al. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

WOJSLAW, E. B. **Tecnologia de Alimentos**. Conselho Editorial. Brasília-DF. 2012.

XU, C. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese journal of natural medicines**, v. 15, n. 10, p. 721-731, 2017.

YANG, Kai et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 3, p. 708-718, 2013.

YESILTAS, B. et al. Investigating the in-vitro bioaccessibility of propolis and pollen using a simulated gastrointestinal digestion System. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 1, p. 101-108, 2014.

ZHANG, B. et al. Bioaccessibility, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 248-255, 2017.

ARTIGO 1

INFLUÊNCIA DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PROPRIEDADES BIOATIVAS DO PÓLEN DE ABELHAS DO BRASIL ¹

¹Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico do *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

INFLUÊNCIA DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PROPRIEDADES BIOATIVAS DO PÓLEN DE ABELHAS DO BRASIL

RESUMO: Este estudo objetivou avaliar a influência da liofilização e secagem em estufa sobre o conteúdo de compostos fenólicos na atividade biológica do pólen de *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*, produzidos no Brasil. Os extratos de pólen foram obtidos por extração etanol-água 700 g.L⁻¹. Perfis fenólicos dos extratos foram caracterizados por cromatografia líquida de alto desempenho com detecção de matriz de fotodiodo (HPLC-PDA). Foram quantificados 16 compostos fenólicos, dos quais 14 no pólen de *T. spinipes* e 11 em pólen de *A. mellifera*, o caempferol-3-O-glucoside foi mais abundante, (65,50a ± 2,76 mg.100 g) no pólen de *A. mellifera* liofilizado, já, para *T. spinipes* os compostos ácido-β-resorcílico + epicatequina (82,70±0,80 e 101,90±1,78 mg 100 g) foram predominantes ao pólen liofilizado e seco. O ensaio de oxidação do β-caroteno e ácido linoleico exibiu atividade entre 87,87±1,07 a 96,71±0,06%. O pólen de *T. spinipes* evidenciou atividade antioxidante superior ao pólen de *A. mellifera*. A menor concentração mínima inibitória 10 mg g⁻¹ para o pólen de *A. mellifera* fresco e seco foi constatado para *Staphylococcus aureus*. A *T. spinipes* apresentou melhor atividade (20 mg g⁻¹) no pólen liofilizado. A liofilização foi o método de desidratação que melhor conservou a composição dos compostos fenólicos do pólen em ambas espécies.

Palavras-chave: Compostos fenólicos-HPLC-PDA, Liofilização, *T spinipes*, Trolox

INFLUENCE OF CONSERVATION METHODS ON PHENOLIC COMPOSITION AND BIOACTIVE PROPERTIES OF BEE POLLEN IN BRAZIL

ABSTRACT: This study evaluated the influence of freeze-drying and oven drying on phenolic compounds contents in the pollen biological activity of *Apis mellifera* and *Trigona spinipes*, produced in Brazil. Pollens were extracted with ethanol-water 700 g.L⁻¹. Phenolic profiles of the extracts were characterized by high-performance liquid chromatography with photodiode detection of array (HPLC-PDA). We quantified 16 phenolic compounds with 14 in pollen of *T. spinipes* and 11 in pollen of *A. mellifera*, with predominance of kaempferol-3-O-glucoside (65.50a ± 2.76 mg. 100 g) in freeze-dried pollen of *A. mellifera*. For pollen of *T. spinipes*, compounds acid-β-resorcinol + epicatechin (82.70±0.80 and 101.90±1.78 mg 100 g) were predominant in freeze-dried and dried pollen. Oxidation of β-carotene and linoleic acid exhibited activity between 87.87±1.07 and 96.71±0.06%. Pollen of *T. spinipes* showed higher antioxidant activity than pollen of *A. mellifera*. The lowest minimum inhibitory concentration of 10 mg g⁻¹ for fresh and dry pollen of *A. mellifera* was found for *Staphylococcus aureus*. *T. spinipes* presented the best activity (20 mg g⁻¹) in the freeze-dried pollen. Freeze-drying was the dehydration method that best preserved the composition of phenolic compounds of pollen in both species.

Key words: HPLC-PDA phenolics, Freeze-drying, *T spinipes*, Trolox

INTRODUÇÃO

Os alimentos são fontes naturais de várias substâncias promotoras da saúde com atividades biológicas significativas. Conseqüentemente, existe um interesse crescente por estudos sobre propriedades nutricionais e funcionais dos constituintes alimentares como um importante instrumento para promover a saúde humana. Devido a isto, nos últimos tempos o pólen de abelhas tornou-se um produto de interesse, o que vem aumentando as investigações a respeito da sua composição e da sua atividade biológica.

O uso do pólen como alimento suplementar em dietas é recomendado devido a sua bioatividade (Tomas et al., 2017). Os compostos fenólicos são as substâncias bioativas mais importante do pólen, são importantes fontes de metabolitos secundários (Bogdanov, 2017). Há evidências crescentes de que o consumo de uma enorme variedade de compostos fenólicos presentes em alimentos naturais podem diminuir os riscos de transtornos graves da saúde devido a sua atividade antioxidante, entre outros mecanismos (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

O pólen de abelhas possui alto valor nutricional, sendo extremamente rico, uma vez que contém uma variedade de aminoácidos, vitaminas, minerais, proteínas ácidos orgânicos e carboidratos (Yang et al. 2013; Kostić et al., 2015; Kalaycioğlu et al. 2017). Os estudos também comprovaram uma grande quantidade de compostos biologicamente ativos, como flavonoides e polifenóis (Carpes et al., 2013; Kaškonienė et al., 2015) , e tem uma vasta gama de propriedades terapêuticas, incluindo atividade antitumoral (Wang et al., 2013), antimutagênica (Dias et al., 2016), hepatoprotetora e renal (Huang et al., 2017), antibacteriana (Fatrková-Šramková et al., 2016) anti-inflamatória (Pascoal et al., 2014) e antioxidante natural (Florio Almeida et al., 2017; Kalaycioğlu et al., 2017).

Apesar de existir diversos estudos que comprovam a qualidade do pólen de *A. mellifera* em todo o mundo, ainda são escassas as pesquisas com pólen armazenado por espécies de abelhas sem ferrão em especial *T. spinipes*. Este pólen passa por processos fermentativos dentro da colmeia para a obtenção do pão de abelha, aumentando a disponibilidade de nutrientes e a sua preservação dentro da colmeia (Araneda et al., 2014; Sobral et al., 2014).

O pólen tem sua composição bastante variável e dependente sobretudo da fonte floral. No entanto, fatores sazonais e ambientais e método de processamento também desempenham um importante papel na sua qualidade (De-Melo et al., 2016). Considerando a escassez de recurso nesta área, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos processamentos sobre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade biológica do pólen de *A. mellifera* e do pólen armazenado *T. spinipes*, produzidos do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

O pólen armazenado por *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (Arapuá) foi coletado no período de maio a agosto de 2016, no Território de Identidade Piemonte do Paraguaçu, macrorregião do Semiárido baiano, sob o domínio da caatinga, com características de clima semiárido e como principal bacia hidrográfica o rio Paraguaçu. A economia dessa região está pautada, na exploração dos recursos naturais, com extração mineral e, principalmente, na agropecuária (Perfil. 2015).

O pólen de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 foi coletado em junho de 2016, por apicultores do município de Canavieiras (15°41'S, 38°57'W), localizado no "Litoral Sul" microrregião econômica do estado da Bahia. Essa região caracteriza-se por amplas áreas de mangue, mas também tem grandes extensões de floresta, restinga e dunas, com ocorrências de espécies da família arecaceae (Dórea; Novais; Santos, 2010).

Todo o material coletado foi acondicionado em recipientes, previamente esterilizados e colocados em caixa térmica com gelo para o transporte ao laboratório, onde foi homogeneizado e congelado em freezer a - 18°C. Cada amostra foi dividida em três subamostras: a) foi congelada a -80 °C e depois desidratada em um liofilizador a vácuo (Terroni-Enterprise II- Brasil) durante 24h; b) seca em uma estufa de secagem com circulação de ar forçada (tecnal-Brasil) a 42 °C durante 48-52 h (De-Melo et al., 2016); c) foi usada recém-coletada ou fresca.

Reagentes:

Metanol, clorofórmio (CHCl_3), carbonato de sódio (Na_2CO_3), monooleato de sorbitano (Tween 40), Cloreto de ferro(III) hexahidratado, gentamicina. Foram obtidos Merck (Darmstadt, Alemanha). Trolox, ácido gálico, quercetina-, ácido linoleico (LA), β -caroteno, reagente de Folin-Ciocalteu, cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). Água de alta pureza (18 MX cm) foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Barnstrad, MA, EUA). Metanol e ácido fórmico de qualidade HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os padrões de referência dos compostos fenólicos adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) utilizados neste estudo foram os ácidos fenólicos, nomeadamente o ácido gálico (GA, $\geq 99\%$), ácido protocatequico (99,63%), ácido vanílico ($\geq 97\%$), ácido siringílico ($\geq 98\%$), ácido β -resorcílico ($\geq 97\%$), ácido 4-hidroxibenzóico ($\geq 99\%$), 4-hidroxibenzaldeído (98%), ácido ferúlico ($\geq 99\%$), ácido sinápico ($\geq 99\%$), ácido cinâmico ($\geq 99\%$), ácido cafeico ($\geq 98\%$), ácido *p*-cumarico ($\geq 98\%$), ácido clorogênico ($> 95\%$), ácido 4-hidroxifenilacético (98%); os flavonóides (+) - catequina ($\geq 98\%$), naringina ($\geq 95\%$), naringenina (98%), rutina ($\geq 94\%$), quercetina (95%), kaempferol ($\geq 98\%$), miricetina ($\geq 96\%$), pinocembrina (95%), quercetina-3-O-glucopiranosídeo ($\geq 99\%$), kaempferol-3-O-rutinosídeo ($\geq 98\%$), kaempferol-3-O-glucósídeo ($\geq 95\%$); tilirosídeo ($\geq 98\%$); as chalcones: floridzina desidratada (99%) e floretina ($\geq 98,5\%$); e o resveratrol ($\geq 99\%$).

Obtenção de Extrato Hidroetanólico de Pólen

Para a obtenção do extrato hidroetanoico de pólen, amostras contendo 10 g de pólen de abelhas foram submetidas a extração com 50 mL de solução de etanol 700g L^{-1} , após agitação em placa por 45 minutos em temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados através de filtro de papel qualitativo e os sobrenadantes evaporados em evaporador rotativo (IKA-RV-USA). Os extratos secos foram armazenados em refrigeração até o momento das análises (Flório Almeida et al., 2017).

Ensaio de branqueamento de β -caroteno

Para o ensaio de branqueamento de β -caroteno utilizou-se a técnica descrita por Marco (1968) com modificações para uso de microplacas por Lorenzo et al. (2015). Resumidamente, 4 mg de β -caroteno, 0,5 mL de ácido linoleico e 4 g de Tween-40 foram dissolvidos em 20 mL de clorofórmio, a solução mãe distribuída em alíquotas de 1 mL e o clorofórmio evaporado em evaporador rotativo (IKA® RV-USA) a 45 °C durante 15 min. A solução mãe foi ressuspensa em 25 mL de água mili-Q a 45 °C. Para a medição da capacidade antioxidante, 50 μ L de amostra foi adicionada juntamente com 250 μ L de reagente em microplaca de 96 poços. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras de absorvância (470 nm) feitas em leitor de microplacas Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA) foram conduzidas até que o β -caroteno fosse descolorido (cerca de 2 h). A atividade antioxidante (AA) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$AA = (RDC_{\text{Controle}} - RDA_{\text{Amostra}}) / RDC_{\text{Controle}} * 100$$

$RDC_{\text{Controle}} [= \ln(a / b) / 120]$ o controle é a porcentagem de branqueamento do β -caroteno sem a presença do antioxidante. Onde: \ln é o logaritmo natural; a = absorvância no tempo 0; b = absorvância depois de 120 minutos. $RDA_{\text{Amostra}} [= \ln(a / b) / 120]$ a porcentagem de branqueamento do β -caroteno com a presença do antioxidante (amostra).

Determinação de DPPH

A atividade antioxidante foi determinada em microplaca de 96 poços, de acordo com Bobo-García et al. (2015). Para tanto, 20 μ L da amostra diluída foram adicionados a 180 μ L de solução de DPPH ($150 \mu\text{M L}^{-1}$) em metanol-água (80:20, v / v) e agitada durante 60 segundos numa microplaca de 96 poços. Depois de 40min, no escuro, e, a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 515 nm no leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O Trolox foi utilizado como padrão a 50-500 $\mu\text{M L}^{-1}$ para gerar a curva de calibração.

Determinação do Poder de redução do ferro (FRAP)

O potencial antioxidante total dos extratos foi determinado utilizando a capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) descrita por Tachakittirungrod et al. (2007) e LeBlanc et al. (2009). O reagente FRAP recém preparado: 2,4,6-

tripiridil-S-triazina (TPZ) 10 mM em HCl 40 mM, solução de FeCl₃ 20 mM e tampão acetato de sódio e ácido acético 0,3 M a pH 3,6 foram juntados (1: 1: 10) partes por volume, respectivamente. Os extratos foram dissolvidos em etanol a uma concentração de 10 mg mL⁻¹ uma alíquota de 20 µL do extrato de pólen foi misturado com 180 µL de solução FRAP. A absorção da mistura reacional foi medida a 590nm utilizando o leitor de microplacas. As soluções etanoicas de concentração (50-500mM) de trolox foi utilizada para construção de uma curva de calibração.

Determinação de fenóis totais

Os polifenóis totais foram determinados pelo método Folin-Ciocalteu Singleton et al. (1999), baseado na microplaca de 96 poços descrito por Bobo-García et al. (2015). Alíquota de 20 µL do extrato de hidroetanoico de pólen foi misturada com 100 µL de Folin-Ciocalteu diluído 1: 4 e agitados durante 60s numa microplaca de 96 poços. A mistura foi deixada em repouso durante 240 s e depois adicionou-se 75 µL de solução de carbonato de sódio (100 g L⁻¹) seguida de agitada contínua por 1 minuto. Após 2 h à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 750 nm utilizando o leitor de microplacas. Foram utilizadas diluições de ácido gálico (10-200 g.L⁻¹) para construção de uma curva padrão.

Determinação de flavonoides totais

A análise foi feita segundo a metodologia proposta por Herald et al. (2012), adicionou-se 100 µL de água destilada, seguido por 10 µL NaNO₂ (50 g L⁻¹) e 25 µL de extrato da amostra ou solução padrão. Após 5 minutos foi adicionado 15 µL de ALCl₃ (100 g L⁻¹) à mistura, posteriormente, após 6 minutos foram adicionados 50 µL de NaOH a (40 g L⁻¹) e 50 µL de água destilada. A placa foi agitada durante 30 segundo no leitor de microplacas antes da medição da absorbância a 515 nm. A quercetina (5-100 g.L⁻¹) foi usada para construção da curva padrão.

Análise de compostos fenólicos por HPLC-PDA

A identificação e quantificação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método anteriormente descrito por Moreira et al. (2017). Os extratos de pólen (20 µL) foram injetados em um sistema de HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20AD, um

desgaseificador DGU-20AS, um forno de coluna VPN CTO-10AS, um Multímetro automático SIL-20A HT e um detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A (PDA). A separação dos compostos fenólicos foi efetuada utilizando uma coluna *Phenomenex Gemini C₁₈* (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) a 25 °C e os cromatogramas foram registrados a 280, 320 e 360 nm, dependendo do comprimento de onda máximo do composto fenólico. A fase móvel composta por metanol (solvente A) e água (solvente B) ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Os compostos fenólicos foram analisados utilizando uma eluição em modo gradiente a 1,0 mL/min com o seguinte programa: 0-13 min: 20-26.5%A; 13-18 min: 26.5% A; 18-25 min: 26.5-30% A; 25-50 min: 30-45%A; 50-60 min: 45-50%A; 60-70 min: 50-55% A; 70-90 min: 55-70% A; 90-100 min: 70-100% A, seguido de 100% A por 5 min e de volta a 20% A em 10 min e 5 min de acondicionamento antes da próxima injeção. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada comparando os espectros de absorção de UV e o tempo de retenção de cada composto com os de padrões puros injetados nas mesmas condições. Para a quantificação dos compostos fenólicos foram preparadas diferentes concentrações de cada padrão a partir da solução mãe respectiva e os resultados foram expressos em miligramas de composto por litro (mg L⁻¹).

Atividade antibacteriana

Os microrganismos utilizados para os ensaios de atividade antimicrobianos foram estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) TM, *Staphylococcus aureus* (ESA 83138150, *Staphylococcus aureus* (ESA 32), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) TM e *Pseudomonas metilina resistentes* (MRC.4) *Pseudomonas metilina resistentes* (MRC.10) de referências obtidos de distribuidor autorizado (LGC Standards SLU, Barcelona) ATCC (American Type Culture Collection), assim como, *Pseudomonas* spp de isolados clínicos de fluidos biológicos, identificados no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrárias de Bragança, Portugal.

Os inoculos das bactérias foram suspensos em meio líquido, Brain Heart Infusion (BHI-Himedia, Mumbai, Índia) e incubados a 37°C durante 24 horas. Foi preparada uma suspensão bacteriana de 1x10⁸ UFC em uma solução salina estéril a 0,85% com densidade ótica de 0,3 na escala *McFarland*, leitura realizada

a 540 nm em espectrofotômetro UV-visível (Unicam Hekios Alpha), seguindo três diluições sucessivas (1:10) para obtenção de uma suspensão equivalente a 1×10^5 UFC mL⁻¹. A atividade antimicrobiana foi realizada por meio da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) baseada no método de microdiluições em microplaca de 96 poços (Morais et al., 2011).

Procedimentos estatísticos

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas, com seis tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos pela combinação de duas espécies de abelhas (*Apis mellifera* e *Trigona spinipes*), que foram alocadas nas parcelas, e três métodos de conservação do pólen (seco, liofilizado e fresco), nas subparcelas. O efeito de interação espécie *versus* método sobre as variáveis analisadas foi verificado por meio de análise de variância. O efeito de espécie, em cada método, foi comparado usando-se o teste F e o efeito de método, em cada espécie de abelha, foi comparado por meio do teste de Tukey. Além disso, foi realizada análise multivariada de componentes principais para verificar a relação entre variáveis e amostras. Todas as análises foram realizadas empregando-se o software R versão 3.0.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

RESULTADOS

Conteúdo de fenóis totais e flavonoides totais

O valor mais elevado de fenóis totais ($20,45 \pm 1,40$ mg GAE g⁻¹) foi observado no pólen de *A. mellifera* fresco. O pólen liofilizado foi o que apresentou menor conteúdo de fenóis totais para as amostras das duas espécies estudadas. Os valores encontrados para o teor de flavonoides totais estiveram entre $3,41 \pm 0,04$ a $4,82 \pm 0,04$ mg QE g⁻¹ (Tabela 1). Verificou-se efeito de interação significativa entre o pólen para as duas espécies estudadas e método de conservação para a variável fenóis totais ($p < 0.0001$). Entretanto, não houve efeito significativo entre o pólen das duas espécies e método de conservação para flavonoides totais.

Tabela 1. Teor de fenóis totais e flavonoides totais (mg g⁻¹) e atividade antioxidante do pólen de *Apis mellifera* e do pólen armazenado de *Trigona spinipes*, seco em estufa liofilizado e fresca.

Variável	Espécie	Pólen		
		Liofilizado	Seco	Fresco
Fenois totais (mg GAE g ⁻¹)	<i>A. mellifera</i>	9,9Bc±0,42	13,84b±0,78	20,45Aa±1,40
	<i>T. spinipes</i>	12,72Ab±0,50	14,06a±0,19	14,18Ba±0,46
Flav. Totais (mg QE g ⁻¹)	<i>A. mellifera</i>	3,82±0,33	3,41±0,04	3.53±0,03
	<i>T. spinipes</i>	4,63±0,16	4,73±0,44	4.82±0,04
FRAP (mM TE g ⁻¹)	<i>A. mellifera</i>	36,95Bb±2,38	36,71Bb±1,68	49,10Ba±2,38
	<i>T. spinipes.</i>	50,40Ab±2,91	64,21Aa±1,71	60,24Aa±4,36
DPPH (µM TE g ⁻¹)	<i>A. mellifera</i>	10,87Bb±0,05	11,21Bb±1,21	15,41Ba±1,17
	<i>T. spinipes</i>	17,68Ab±1,84	28,72Aa±1,85	26,36Aa±3,03
β-caroteno (%)	<i>A. mellifera</i>	91,86Ba±1,56	87,87Bb±1,07	91,27Ba±0,58
	<i>T. spinipes</i>	96,40Aab±0,04	95,62Ab±0,24	96,71Aa±0,06

Letras diferentes (maiúscula) na mesma coluna representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de *Tukey*. Letras diferentes (minúscula) na mesma linha dos resultados representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste *Tukey*. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Flavonoides (Flav), atividade de redução férrica (FRAP).

Análise de compostos fenólicos – HPLC

Foram identificados e quantificados os compostos ácido gálico, ácido 4-hidroxifenilacético, rutina, resveratrol, myrecitina, quercetina-3-O-glucopiranósido, kaempferol-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinosido, quercetina, floretina e kaempferol para o pólen de *A. mellifera*. Os compostos ácido 4-hidroxifenilacético e a floretina não foram quantificados para o pólen armazenado da espécie *T. spinipes*. O kaempferol-3-O-glucoside foi o composto mais abundante no pólen de *A. mellifera*, estando em maior concentração 65,50a ± 2,76 mg 100 g⁻¹ no pólen liofilizado. Para a *T. spinipes* os compostos epicatequina+ácido β-resorcílico 82,70±0,80 e 101,90±1,78 mg 100 g⁻¹) foram predominantes para o pólen liofilizado e seco, respectivamente. Verificou-se efeito de interação significativa entre o pólen para as duas espécies e método de conservação para as variáveis ácido gálico ($p < 0,0001$), rutina ($p < 0,0001$), resveratrol ($p = 0,0005$), kaempferol-3-O-glucoside ($p < 0,0001$), kaempferol-3-O-rutinoside ($p < 0,0001$) e quercetina

($p < 0,0001$). Os métodos de conservação influenciaram a concentração dos compostos fenólicos quantificados para o pólen de *A. mellifera*, verificando-se que a liofilização foi o método de desidratação mais eficiente, reduzindo as perdas de processamento. Para o pólen de *T. spinipes* os métodos de conservação não demonstraram influência significativa para a maioria dos compostos quantificados, tendo-se verificado que o pólen submetido a secagem e a liofilização tiveram o mesmo comportamento do pólen fresco. Os pólenes das duas espécies apresentaram maior teor de flavonoides entre os compostos quantificados (Tabela 2).

Tabela 2. Composição fenólica (media \pm SD) (mg 100 g⁻¹) do pólen de *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* seco em estufa, liofilizado e fresca por HPLC-PDA.

Variável	Espécie	Pólen		
		Liofilizado	Seco	Fresco
Ácido gálico	<i>A. mellifera</i>	10,07Bb \pm 1,01	33,63Ba \pm 1,75	10,74Bb \pm 0,71
	<i>T. spinipes</i>	46,20Ab \pm 1,65	81,77Aa \pm 1,67	34,07Ac \pm 1,65
Ácido 4-hidroxifenilacético	<i>A. mellifera</i>	nd	nd	5,55 \pm 0,39
	<i>T. spinipes</i>	nd	nd	nd
Epicatequina + Ácido resorcilico	<i>A. mellifera</i>	nd	nd	nd
	<i>T. spinipes</i>	82,70b \pm 0,80	101,90a \pm 1,78	nd
Ácido cinâmico	<i>A. mellifera</i>	nd	nd	nd
	<i>T. spinipes</i>	3,51 \pm 0,56	3,57 \pm 0,73	3,61 \pm 0,75
Rutina	<i>A. mellifera</i>	5,49Aa \pm 0,43	4,28b \pm 0,23	1,65Bc \pm 0,19
	<i>T. spinipes</i>	4,45B \pm 0,54	4,52 \pm 0,47	4,09A \pm 0,26
Resveratrol	<i>A. mellifera</i>	7,28Ba \pm 0,26	5,52Ba \pm 0,35	2,64Bb \pm 0,34
	<i>T. spinipes</i>	12,33A \pm 1,95	12,67A \pm 0,75	10,69A \pm 0,83
Floridzina	<i>A. mellifera</i>	nd	nd	nd
	<i>T. spinipes</i>	4,19 \pm 0,39	4,58 \pm 0,75	3,68 \pm 0,41
Mirecitina	<i>A. mellifera</i>	4,82a \pm 0,30	4,37ab \pm 0,32	3,70b \pm 0,46
	<i>T. spinipes</i>	5,23 \pm 0,34	5,22 \pm 0,50	4,70 \pm 0,54
Quercetina-3-O-glucopyranoside	<i>A. mellifera</i>	3,63a \pm 0,45	2,55b \pm 0,21	nd
	<i>T. spinipes</i>	4,36 \pm 0,36	3,24 \pm 0,73	nd
kaempferol -3-O-glucosido	<i>A. mellifera</i>	65,50Aa \pm 2,76	52,63Ab \pm 2,84	18,66Bc \pm 2,09
	<i>T. spinipes</i>	39,48Ba \pm 0,71	41,53Ba \pm 0,80	30,53Ab \pm 0,70
Kaempferol-3-O-rutinosido	<i>A. mellifera</i>	37,47Aa \pm 2,05	30,80Ab \pm 0,46	11,58Bc \pm 0,54
	<i>T. spinipes</i>	22,87Ba \pm 1,75	24,37Ba \pm 0,70	17,80Ab \pm 1,57
Naringenina	<i>A. mellifera</i>	nd	nd	nd
	<i>T. spinipes</i>	3,30 \pm 0,41	3,40 \pm 0,56	2,69 \pm 0,51
Quercetina	<i>A. mellifera</i>	6,48Aa \pm 0,45	7,23Aa \pm 0,41	2,26Bb \pm 0,39
	<i>T. spinipes</i>	3,65B \pm 0,68	3,82B \pm 0,70	3,67A \pm 0,41
Floretina	<i>A. mellifera</i>	nd	nd	9,55 \pm 0,53
	<i>T. spinipes</i>	nd	nd	nd
Tilirosídeo	<i>A. mellifera</i>	nd	nd	nd

	<i>T. spinipes</i>	23,10a±1,31	nd	19,57b±0,78
Kaempferol	<i>A. mellifera</i>	3,28±0,34	3,62±0,37	2,88±0,23
	<i>T. spinipes</i>	4,42±0,54	5,34±0,48	4,26±0,50

Letras diferentes (minúscula) na mesma linha representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de *Tukey*. Letras diferentes (maiúscula) na mesma coluna dos resultados representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste *Tukey*. ND: Não detectado.

Atividade antioxidante

Os resultados do estudo indicaram diferenças significativas na atividade antioxidante do pólen para todos os métodos de conservação utilizados, bem como entre as amostras de pólen das duas espécies de abelhas, diferença também verificada para todos os métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante FRAP ($p = 0,0005$), DPPH ($p < 0,0001$), β -caroteno ($p = 0,0006$) Tabela-1. A atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP), para o pólen de *A. mellifera* apresentou resultados semelhantes para os processos de secagem e liofilização, porém, o pólen armazenado por *T. spinipes* apresentou menor atividade antioxidante $64,21 \pm 1,71$ mM TE g^{-1} na amostra seca. A determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical (DPPH), obteve comportamento semelhante ao FRAP para ambas as espécies. Foi observada correlação significativa ($r = 0,849, 0,818$; $p < 0,05$) entre atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e FRAP e teor de flavonoides totais. Quanto a atividade antioxidante pelo método oxidação de β -caroteno e ácido linoleico foi verificado valor maior de neutralização do branqueamento do β -caroteno para o pólen de *T. spinipes* liofilizado e fresco com $96,40\% \pm 0,04$ e $96,71\% \pm 0,06$ respectivamente. A atividade antioxidante mostrou-se superior nos métodos DPPH e FRAP para o pólen armazenado por *A. mellifera*.

Determinação de atividade antibacteriana

Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* (ATCC 43300) TM e isolados clínicos *S. aureus* (ESA 83138150), *S. aureus* (ESA 32) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) TM e os isolados clínicos *Pseudomonas* sp (MRC.4) *Pseudomonas* sp (MRC.10). A amostra de pólen de *A. mellifera* liofilizado PLA não foi bactericida nas concentrações testadas contra *S. aureus*. A amostra de pólen de *A. mellifera* fresca PFA apresentou menor concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima

bactericida (CMB) para todos os microrganismos testados, sendo CMI de (10 mg mL⁻¹) apresentado para o *S. aureus* o mais baixo encontrado para este estudo.

Tabela 3. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) em (mg g⁻¹) do pólen de *Apis mellifera* e do pólen armazenado por *Trigona spinipes* para os microrganismos testados.

Microorganismo		<i>Apis mellifera</i>			<i>Trigona spinipes</i>		
		Liofilizado	Seco	Fresco	Liofilizado	Seco	Fresco
<i>S. aureus</i> (ATCC 3300)	CMI	100	50	10	30	50	50
	CMB	-	100	50	75	75	75
<i>S. aureus</i> (ESA 3138150)	CMI	30	10	30	20	50	50
	CMB	150	150	50	100	100	100
<i>S. aureus</i> (ESA 32)	CMI	100	75	20	30	30	30
	CMB	150	100	30	50	50	50
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	CMI	75	50	30	30	30	30
	CMB	-	100	75	100	75	100
<i>P. aeruginosa</i> (MRC4)	CMI	75	50	30	30	30	30
	CMB	150	100	50	75	75	50
<i>P. aeruginosa</i> (MCR10)	CMI	75	50	30	50	50	50
	CMB	150	100	50	75	75	75

-: Não apresentou CMB

Analise multivariada

Os dois primeiros componentes foram responsáveis por 83% da variação total dos dados, indicando que são suficientes para explicar as informações mais importantes. O grupo composto por amostras de pólen de *A. mellifera* (seco e liofilizado) foi caracterizado por possuir maiores valores de KpfGsd, KpfRsd, Qct, para as amostras frescas o pólen *A. mellifera* formou um grupo isolado com maior quantificação de (TPC, Pht, AcREp) e baixa quantidade (QctGsd, Rvt, Myt e Rtn), evidenciando as diferenças entre pólen fresco e pólen liofilizado e seco em estufa. O pólen de *T. spinipes* apresentou em sua composição os (Achac, AcREp, AcSp Pld, Ngn, Trd) compostos que não foram observados para o pólen de *A. mellifera*. O pólen seco e liofilizado de *T. spinipes* contem maiores conteúdo de AcGI, Myt, Kpf e Rvt. As amostras frescas do pólen de *T. spinipes* apresentaram valores superiores para as atividades antioxidantes avaliadas.

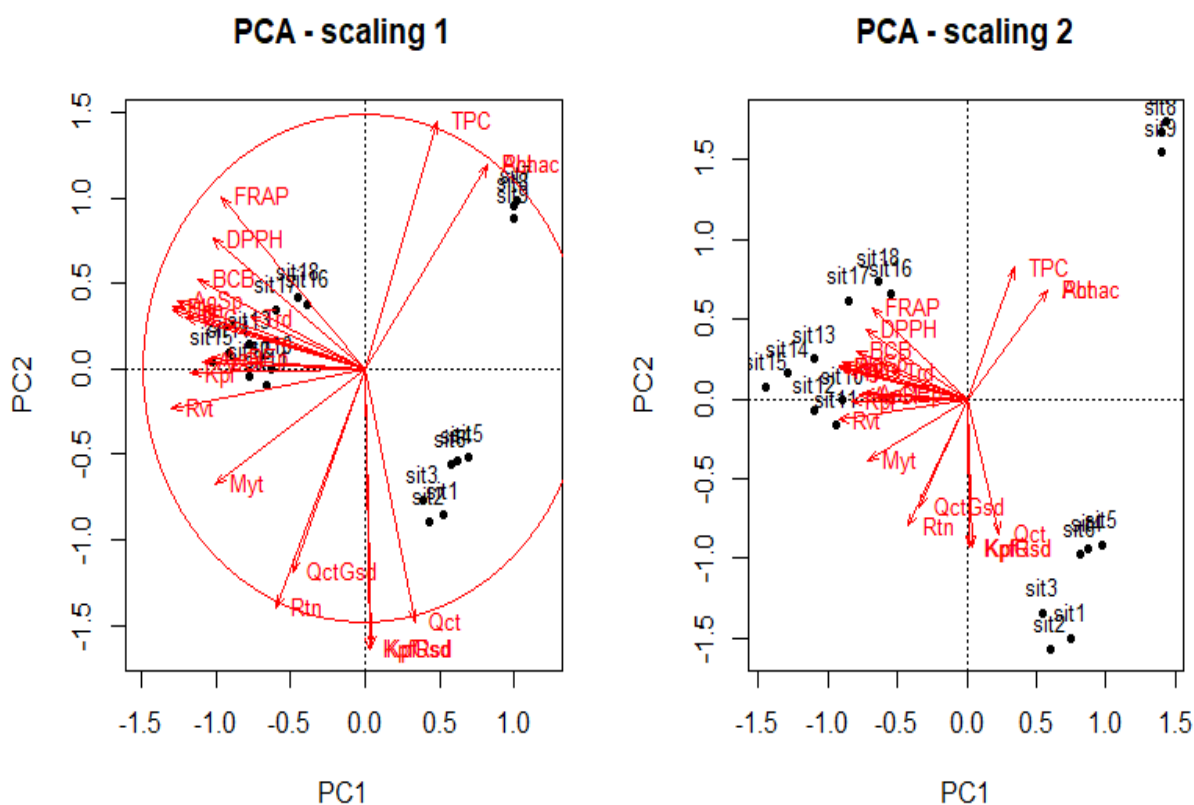


Figura 1- PCA biplots de Fenóis e flavonóides totais, composição fenólica e atividades antioxidantes (DPPH, FRAP e BCB). PC1 e PC2: 50,26% e 32,42%, respectivamente, da proporção explicada. Sit 1, Sit 2, Sit 3_pólen liofilizado de *A. mellifera*; Sit 4, Sit 5, Sit 6_ pólen seco de *A. mellifera*; Sit 7, Sit 8, Sit 9_ pólen fresco de *A. mellifera*; Sit 10, Sit 11, Sit 12_ pólen liofilizado de *T. spinipes*; Sit 13, Sit 14, Sit 15_ pólen seco de *T. spinipes*; Sit 16, Sit 17, Sit 18_ pólen fresco de *T. spinipes*. AcGI_ácido gálico; Achac_ ácido 4-hidroxifenilacético; AcREp_ Epicatequina +Ácido □- resorcilico; AcSp_ ácido cinâmico; Rtn_Rutina; Rvt_Resveratrol; Pld_ floridzina; Myt_Myrecitin; QctGsd_ quercetina-3-O-glucopiranosido; KpfGsd_ kaempferol-3-O-glucósido; KpfRsd_ kaempferol-3-O-rutinosido; Ngn_ naringenina; Qct_Quercetina; Pht_ floreтина; Trd_ tilirosídeo.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste estudo para o conteúdo de fenóis totais confirmam os encontrados por De-Melo et al. (2016) com valores entre (9,2 a 21,4 mg GAE g⁻¹) para pólen liofilizado e seco em estufa. Zuluaga et al. (2016) apresentaram valores superiores, 24,79 ± 3,3 a 33,69 ± 1,37 mg GAE g⁻¹ para o pólen de *A. mellifera* processado a alta pressão, no qual o método empregado influenciou na quantificação de fenóis totais. O elevado conteúdo de fenóis totais das amostras do pólen de *A. mellifera* fresco, pode ser devido a reações química

(reação de *Maillard*) que provocou o escurecimento da amostra. Fato semelhante foi relatado por Barene et al. (2015), em que o pão de abelha armazenado em temperaturas de 30-40 °C ficou mais escuras e com teor de umidade elevado. De acordo com Ares et al. (2018), o método de Folin ciocalteu apresenta limitações, pois este reagente não reage apenas com fenóis, mas com qualquer substância redutora da amostra. Desta forma os autores ressaltando a importância das análises cromatográficas.

Outros trabalhos como de Freire et al. (2012) também relataram a quantificação fenólica em pólen de *A. mellifera* da região de Canavieiras, Bahia e detectaram os flavonoides isoquercetina, miricetina, tricetina, quercetina, luteolina, selagina, kaempferol e isorhamnetina. Muitos dos compostos relatados foram semelhantes ao encontrados neste estudo. Em se tratando de outro tipo de pólen os compostos ácido p-hidroxicinâmico, dihidroquercetina, isorhamnetina, isorhamnetina-3-O- (6 "- O-Ep-cumaroyl) -p-D-glucopiranosido, luteolina e quercetina foram identificados em pão de abelha de *Melipona rufiventris* do norte do Brasil (Silva et al., 2009). Ainda, os flavonoides rutina e miricetina, foram referidos em pólen *A. mellifera* do Sul do Brasil por Carpes et al. (2013), e Florio Almeida et al. (2017).

Em pólen de *A. mellifera* oriundo da Grécia foram identificados nove polifenóis o - ácido p-cocmarico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cinâmico, quercetina, naringenina, hesperitina e kaempferol (Fanali et al., 2013). Rzepecka-Stojko et al. (2016) avaliando pólen de abelha da Polônia encontraram os seguintes compostos: ácido gálico, ácido cafeíco, ácido ferrulico, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido trans-p-cumárico e ácido trans-cinâmico, cinco flavonoides: rutina, miricetina, quercetina, kaempferol e isorhamnetina. Segundo Sun et al. (2017) a presença dos flavonoides, como quercetina e rutina, no pólen da abelha mostra a sua qualidade nutricional e biológica devido à sua alta função antioxidante e anti-melanogênese. O flavonoide é também considerado um composto importante para distinguir a origem floral do pólen, podendo ser um parâmetro importante para marcadores de denominação de origem (Zhou et al., 2015). Portanto, a origem floral, a localização geográfica da coleta e as espécies de abelhas são elementos responsáveis por imparidades na composição qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos de pólen de abelha, como o método de conservação também influenciou a composição fenólica do pólen de *A.*

mellifera. No entanto, para o pólen armazenado por *T. spinipes* o processamento não influenciou quantitativamente a sua composição fenólica. Em estudo realizado com pólen de *A. mellifera* por Domínguez-Valhondo et al. (2011), afirmaram que pólen fresco e liofilizado possuiu atributos semelhantes.

No presente estudo, vários métodos foram utilizados para analisar a atividade antioxidante devido a diferenças na composição e conteúdo dos agentes antioxidante, que apresentam diferentes mecanismos para suas atividades antioxidantes. Os resultados encontrados quando se usou o método de FRAP para o pólen armazenado por *T. spinipes* foram semelhantes aos resultados apresentados por Florio Almeida et al. (2017) que relataram $60,64 \text{ mM Fe}^{\text{II}} \text{ g}^{-1}$ de atividade para o pólen de *A. mellifera*. Nesse estudo, porém, para o pólen da mesma espécie foram encontrados valores ligeiramente inferiores, o que corroboram com estudos de Mărghitas et al. (2009) que relataram valor $3,670 \text{ mM Fe}^{\text{II}} \text{ g}^{-1}$ para pólen de *A. mellifera*. Avaliando atividade antioxidante pelo método DPPH De-Melo et al. (2016) encontraram valores entre $31,7 \pm 0,7$ a $81,1 \pm 3,7 \text{ mM TE g}^{-1}$ para pólen de *A. mellifera* seco e liofilizado ressaltado diferenças entre os métodos de processamento. Estudos afirmam que os compostos fenólicos presentes no pólen são responsáveis pela sua atividade antioxidante (Kim et al., 2015). Compostos como polifenóis (antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, cetonas, estilbenos e taninos), carotenoides, ácido ascórbico, presença de ácidos graxos, proteínas e outras substâncias podem influenciar esta atividade (Huang et al., 2017).

Os antioxidantes naturais podem ser usados como aditivos naturais, ajudando a preservar alguns nutrientes ou alguns ingredientes biologicamente ativos no processamento e no armazenamento de alimentos (Li et al., 2014).

A atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-positivas estão de acordo com os encontrados por Pascoal et al. (2014), onde foram relatados uma maior eficiência no extrato de pólen de *A. mellifera* para atividade antimicrobiana em cepas gram-positivas. Segundo Morais et al. (2011) as bactérias Gram-negativas são mais resistentes devido a estrutura química de sua parede celular ser mais complexa. Um dos compostos na parede, o polissacarídeo, determina a antigenicidade, a toxicidade e a patogenicidade dos microrganismos. Além disso, este grupo de bactérias tem uma maior quantidade de lipídios que atuam como um revestimento extra protetor em torno da membrana celular, reduzindo a sua

exposição ao extrato do pólen. Estudos como este são importantes devido à resistência a antibiótico e o crescente interesse em terapia natural com uso compostos farmacológicos efetivos e saudáveis.

CONCLUSÃO

O perfil da composição fenólica do pólen armazenado por *Trigona spinipes* difere tanto quantitativamente como qualitativamente em relação ao pólen da *Apis mellifera*.

Os métodos empregados na conservação influenciam a composição do pólen de *A. mellifera*, sugere o uso de liofilização para a desidratação do pólen, como forma de preservar a sua composição fenólica, entretanto o poder antioxidante se mostrou superior para o pólen de *T. spinipes*.

AGRADECIMENTOS

Os nossos agradecimentos a (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) (88881.062167/2014-01 para M.L.M.E.) e pela bolsa de doutorado para (M.F.S.B.).

REFERENCIAS

Araneda Durán, X., Quezada Mardones, I., Martínez Gutiérrez, M., & Morales Ulloa, D. (2014). Polifenoles totales en pan de abeja (*Apis mellifera* L.) de colmenas de la Región de La Araucanía. *Idesia (Arica)*, 32(1), 107-111.

Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2018). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 110-124.

Barene, I., Daberte, I., & Siksna, S. (2015). Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos teorija it praktika*, 21(1), 16-22.

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison

with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204-209.

Bogdanov, S. (2017): *Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health: A Review*. Bee Product Science, Available online: <http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PollenBook2Review.pdf>.

Carpes, S. T., De Alencar, S. M., Cabral, I. S. R., Oldoni, T. L. C., Mourao, G. B., Haminiuk, C. W. I., ... & Masson, M. L. (2013). Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *CyTA-Journal of Food*, 11(2), 150-161.

Florio Almeida, J., dos Reis, A. S., Heldt, L. F. S., Pereira, D., Bianchin, M., de Moura, C., & Carpes, S. T. (2017). Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 299-305.

De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., Sattler, J. A. G., Souza, B. R., da Silva Freitas, A., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 808-815.

Dias, L. G., Tolentino, G., Pascoal, A., & Estevinho, L. M. (2016). Effect of processing conditions on the bioactive compounds and biological properties of bee pollen. *Journal of Apicultural Research*, 55(5), 357-365.

Domínguez-Valhondo, D., Bohoyo Gil, D., Hernández, M. T., & González-Gómez, D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International journal of food science & technology*, 46(10), 2204-2211

Dórea, M. D. C., Novais, J. S. D., & Santos, F. D. A. R. D. (2010). Botanical profile of bee pollen from the southern coastal region of Bahia, Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, 24(3), 862-867.

Fanali, C., Dugo, L., & Rocco, A. (2013). Nano-liquid chromatography in nutraceutical analysis: determination of polyphenols in bee pollen. *Journal of Chromatography A*, 1313, 270-274.

Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Máriássyová, M., & Kačániová, M. (2016). Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the *Helianthus annuus* L. bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(3), 176-181

Freire, K. R., Lins, A., Dórea, M. C., Santos, F. A., Camara, C. A., & Silva, T. (2012). Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Molecules*, 17(2), 1652-1664.

Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2326-2331.

Huang, H., Shen, Z., Geng, Q., Wu, Z., Shi, P., & Miao, X. (2017). Protective effect of *Schisandra chinensis* bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1765-1776

Kalaycıoğlu, Z., Kaygusuz, H., Döker, S., Kolaylı, S., & Erim, F. B. (2017). Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 402-408.

Kaškonienė, V., Ruočkusienė, G., Kaškonas, P., Akuneca, I., & Maruška, A. (2015). Chemometric analysis of bee pollen based on volatile and phenolic compound compositions and antioxidant properties. *Food Analytical Methods*, 8(5), 1150-1163

Kim, S. B., Jo, Y. H., Liu, Q., Ahn, J. H., Hong, I. P., Han, S. M., ... & Lee, M. K. (2015). Optimization of extraction condition of bee pollen using response surface methodology: correlation between anti-melanogenesis, antioxidant activity, and phenolic content. *Molecules*, 20(11), 19764-19774.

Kostić, A. Ž., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., Šikoparija, B., ... & Pešić, M. B. (2015). Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 301-309.

LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLuca, A., & Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food chemistry*, 115(4), 1299-1305.

Li, S., Chen, G., Zhang, C., Wu, M., Wu, S., & Liu, Q. (2014). Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness*, 3(3), 110-116.

Lorenzo, J. M., Sineiro, J., Amado, I. R., & Franco, D. (2014). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat science*, 96(1), 526-534.

Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.

Mărghitaș, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Popescu, O., Bogdanov, S., & Campos, M. G. (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115(3), 878-883.

Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1096-1101.

Moreira, M. M., Barroso, M. F., Boeykens, A., Withouck, H., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2017). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 104, 210-220.

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 233-239.

Perfil Sintético. Território de Identidade Piemonte do Paraguaçu. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Governo da Bahia. Salvador, 2015. Disponível em: <http://www.sdr.ba.gov.br/arquivos/File/PerfilPiemontedoParaguacu.pdf>. Acesso em 15 dez. 2017.

Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Sobczak, A., Stojko, R., & Buszman, E. (2016). Polyphenol content and antioxidant activity of bee pollen extracts from Poland. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 482-490.

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.

Silva, T., Camara, C. A., Lins, A., Agra, M. D. F., Silva, E., Reis, I. T., & Freitas, B. M. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(2), 173-178.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299(1), 152-178.

Sobral, F., Calhelha, R. C., Barros, L., Dueñas, M., Tomás, A., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2017). Flavonoid Composition and Antitumor Activity of Bee Bread Collected in Northeast Portugal. *Molecules*, 22(2), 248.

Sun, L., Guo, Y., Zhang, Y., & Zhuang, Y. (2017). Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells. *Frontiers in pharmacology*, 8, 104.

Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103(2), 381-388

Tomás, A., Falcão, S. I., Russo-Almeida, P., & Vilas-Boas, M. (2017). Potentialities of beebread as a food supplement and source of nutraceuticals: Botanical origin, nutritional composition and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 219-230

Team, R. C. (2014). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>: (acesso em: 20 dez 2017).

Wang, B., Diao, Q., Zhang, Z., Liu, Y., Gao, Q., Zhou, Y., & Li, S. (2013). Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Molecular medicine reports*, 7(5), 1555-1558.

Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(3), 708-718.

Zhou, J., Qi, Y., Ritho, J., Zhang, Y., Zheng, X., Wu, L., & Sun, L. (2015). Flavonoid glycosides as floral origin markers to discriminate of unifloral bee pollen by LC–MS/MS. *Food Control*, 57, 54-61.

Zuluaga, C., Martínez, A., Fernández, J., López-Baldó, J., Quiles, A., & Rodrigo, D. (2016). Effect of high pressure processing on carotenoid and phenolic compounds, antioxidant capacity, and microbial counts of bee-pollen paste and ee-pollen-based beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 10-17.

ARTIGO 2

ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO PÓLEN DE *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 E DE *Trigona spinipes* FABRICIUS, 1793, SUBMETIDOS A MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E ENCAPSULAMENTO ²

² Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Apicultural Research*.

ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO PÓLEN DE *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 E DE *Trigona spinipes* FABRICIUS, 1793, SUBMETIDOS A MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E ENCAPSULAMENTO

RESUMO: O objetivo deste estudo foi verificar se os métodos empregados na conservação e a estocagem em cápsulas interferem na qualidade do pólen de *A. mellifera* e de *T. spinipes*. Foram utilizados os métodos de secagem em estufa e liofilização, após esses procedimentos a estabilidade do pólen foi avaliada trimestralmente durante um ano, por meio de análises microbiológicas e físico-químicas. Foi observado diminuição na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Bacillus* sp., imediatamente após o emprego da secagem e liofilização e durante o armazenamento por 12 meses. Não se observou presença de *Salmonella* spp. e esporos de *Clostridium* sulfito redutor, a contagem de coliformes totais manteve-se $<10^3$ UFC/g. Os parâmetros físico-químicos cinza, lipídeos, proteínas, acidez, pH e açúcares mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente para o pólen de *A. mellifera*. Verificou-se predominância de glicose e frutose no pólen de *A. mellifera* e trealose e glicose no pólen de *T. spinipes*. Os pólenes das duas espécies apresentaram de 59-62% de ácidos graxos polinsaturado e baixa relação ω -6/ ω -3, mostrando-se um produto com propriedades benéficas para a saúde humana.

Palavras-chave: Ácidos graxos, armazenamento, liofilização, melibiose,

**MICROBIOLOGICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL STABILITY OF POLLEN
FROM *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 and *Trigona spinipes* FABRICIUS,
1793, SUBJECTED TO CONSERVATION AND ENCAPSULATION
METHODS**

ABSTRACT: This study evaluated influence of conservation methods and storage in capsules on pollen quality of *A. mellifera* and *T. spinipes*. We used oven drying and freeze-drying methods. Pollen stability was evaluated by microbiological and physical-chemical analyses every three months during a year. There was a decrease in counts of mesophylls, molds and yeasts of aerobic microorganisms, *Staphylococcus coagulase* positive and *Bacillus* sp., immediately after oven drying and freeze-drying and during storage for 12 months. The occurrence of *Salmonella* spp. and spores of sulfite reducing *Clostridium* was not observed. The count of total coliforms was $<10^3$ UFC/g. The physical and chemical parameters ash, lipids, proteins, acidity, pH and sugars remained within the limits established by current legislation for pollen of *A. mellifera*. Glucose and fructose were predominant in pollen of *A. mellifera*, while trehalose and glucose were predominant in pollen of *T. spinipes*. Pollens of both species presented 59-62% of polyunsaturated fatty acids and low ω -6/ ω -3 ratio, showing a product with beneficial properties for human health.

Key words: Fatty acids, storage, freeze drying, melibiose

INTRODUÇÃO

Pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores, realizada pelas abelhas, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia (Brasil, 2001). O pólen misturado com suas enzimas digestivas, néctar e mel levado à colmeia e armazenado em células ou potes de cera, sofre diferentes processos químicos por ação de diferentes enzimas, microrganismos, umidade e temperatura, sendo chamado de “pão de abelha” (Nagai et al., 2005).

O “pão de abelha” é a principal fonte de proteínas, lipídios, micronutrientes e vitaminas; é o alimento mais nutritivo para as abelhas. A composição do “pão de abelha” difere ligeiramente do pólen, apresentando uma maior acidez devido à presença de ácido láctico e uma maior quantidade de vitamina K (Nagai et al., 2005).

O pólen de abelhas tem sido usado tanto na medicina tradicional quanto na nutrição humana por suas funções terapêuticas, preventivas e suas propriedades nutricionais e fisiológicas (Kostić et al., 2015; Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016).

Estudos têm relatado por volta de 200 substâncias em grãos de pólen de diferentes espécies de plantas. No grupo de substâncias químicas básicas, se destacam proteínas, aminoácidos, carboidratos e lipídios (Campos et al., 2008; Campos et al., 2010; Nogueira et al., 2012).

O pólen de abelha contém diferentes quantidade de açúcares redutores e não redutores (Qian et al., 2008), fibras (Funari et al., 2003), ácidos graxos saturados e insaturados (Human & Nicolson, 2006; Yang et al., 2013), minerais (Morgano et al., 2012; Yang et al., 2013) e vitaminas (Arruda et al., 2013; Sattler et al., 2015). No entanto, o valor nutricional do pólen pode ser alterado por condicionamento e processamento, principalmente quanto se trata da secagem artificial, realizada com métodos não padronizados (Canale et al., 2016).

Atualmente vários métodos de conservação para o pólen de abelhas têm sido estudados. A exemplos do estudo realizado por Ranieri et al. (2017), em que os autores relatam que o tempo empregado no processo de liofilização influencia no teor de alguns componentes do pólen de *A. mellifera*. Igualmente, no tratamento com micro-ondas, ocorrem perdas de compostos antioxidantes e

de proteínas (Canale et al., 2016; Conte et al., 2017). Em se tratando de vitaminas, Arruda et al. (2013) afirmaram que a perda desses nutrientes não está ligada aos processos de conservação do pólen, mas sim ao tempo em que este é armazenado.

Existem muitos estudos relatando a composição físico-química do pólen apícola processado, mas nenhum deles avaliou o efeito destes processos durante a estocagem do produto, principalmente quanto a composição em ácidos graxos. Também não há relatos na literatura sobre o processamento do pólen de espécies de abelha sem ferrão, e/ou conhecimento sobre a ação do processamento na qualidade deste produto. As informações disponíveis para o pólen de espécies de abelhas sem ferrão ainda são raras, e a maioria dos benefícios ligados ao seu consumo são baseados em informações empíricas.

Diante destas questões, o objetivo deste estudo foi verificar se os métodos empregados na conservação e a estocagem em cápsulas interferem na qualidade do pólen de *A. mellifera* e do pólen de *T. spinipes*.

MATERIAL E METODOS

A amostra

O pólen (pão de abelha) de *T. spinipes* (Arapuá) foi coletado no período de maio a agosto de 2016, no Território de Identidade Piemonte do Paraguaçu, Bahia, inserido na macrorregião do Semiárido, sob o domínio da caatinga, com características de clima semiárido, tendo como principal bacia hidrográfica a do rio Paraguaçu. A economia da região está pautada na exploração dos recursos naturais, com extração mineral e, principalmente, na agropecuária (Perfil, 2015).

O pólen de *A. mellifera* foi coletado em junho de 2016 por apicultores do município de Canavieiras (15°41'S, 38°57'W), localizado no "Litoral Sul", microrregião econômica do Estado da Bahia, caracterizada por amplas áreas de mangue, mas também com grandes extensões de floresta, restinga e dunas e vegetação, predominante por palmeiras (Arecaceae) (Dórea; Novais Santos, 2010).

Todo o material coletado foi acondicionado em recipientes, previamente esterilizados e colocado em caixa térmica com gelo para a transferência ao laboratório, onde foi homogeneizado e congelado em freezer a - 18°C.

As amostras de cada espécie foram divididas em três sub-amostras e processada nas condições pré-estabelecidas, ou seja: Uma sub-amostra foi congelada a -80 °C e depois desidratada em um liofilizador a vácuo (Terroni-Enterprise II- Brasil) durante 24h, a outra sub-amostra foi descongelada à temperatura ambiente e seca em uma estufa de secagem com circulação de ar forçada a 42 °C, durante 48-52 h (De-Melo et al., 2016). A terceira sub-amostra foi usada *in natura*.

Após a secagem e a liofilização do pólen, a encapsulação do produto foi realizada em farmácia de manipulação do município de Cruz das Almas, Bahia. Para tanto, foram utilizados dois tipos de capsulas: Cápsula de gelatina, composta por gelatina a 100% e dióxido de titânio a 2,90% (Informações do fabricante); e DRCaps, composta por hypromellose a 100% e gelatina a 5%, ambas com capacidade de 400 mg (DRCAPS, 2018).

Após a encapsulação, o pólen de *A. mellifera* e o pólen de *T. spinipes* (pão de abelha), juntamente com a sub-amostra *in natura*, foram embalados em potes de polietileno com tampas de rosca. O armazenamento foi feito em estufa com umidade a 60% e temperatura de 25 °C. Para avaliar a estabilidade foram efetuadas análises no tempo zero e 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento.

As análises foram realizadas no Núcleo de Estudos dos Insetos INSECTA do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas-BA. Parte do experimento foi conduzida no Laboratório de Microbiologia da Escola Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal em parceria com a Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Química, Vila Real, Portugal.

Determinação Microbiológica

A qualidade microbiológica das amostras de pólen de abelhas foi obtida a partir da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes a 3 °C, presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, bolores e

leveduras e *Clostridium* sulfito redutor pela American Public Health Association (APHA) Compendium for Microbiological Analysis of Foods (DOWES e ITO, 2001), traduzida por Silva et al. (2010).

Preparo das amostras

Foram pesado 10 g de pólen, seguido de homogeneização em 90 mL de água peptonada a 0,1%, correspondendo à diluição 10^{-1} , a partir da qual foi realizada diluições decimais até 10^{-3} em tubos com 9 mL de água peptonada a 0,1%. Para contagem de colônias típicas, foram selecionadas placas contendo entre 20 e 200 unidades formadoras de colônia por grama de pólen (UFC g^{-1}).

Detecção e contagem dos microrganismos

A quantificação dos microrganismos aeróbios mesófilos foi realizada em placa de Petri utilizando o meio de cultura Plate Count Agar- PCA (Himedia, Índia) e incubação a 37°C por 48 h. Para a contagem bolores e leveduras, utilizou-se o Dichloran Glycerol Medium Base (DG 18) (Himedia, Índia) e incubação a 25 °C, durante 5 dias. A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada em Agar Baird Parker suplementado com gema de ovo e Telurito de Potássio 1% (Himedia, Índia), e incubação por 24 h a 37 °C. Ambos os resultados foram expressos em UFC g^{-1} . Para detecção de *Bacillus* spp., as diluições do pólen em solução salina (NaCl 0,85%) foram incubadas a 70 °C, durante 1 h, seguida de plaqueado em meio sólido Plate Count Agar- PCA com (NaCl 1,5%) e mantido a 30 ° C, durante 48 h. As colônias semelhantes com *Bacillus* spp. foram inoculadas em Tryptone Soy Agar (TSA) e submetidos ao exame morfo-tintorial pelo Gram (Costa Filho et al., 2017).

A contagem de coliformes totais foi realizada através de Kit Simplate, da Bio Control (Feldsine et al., 2005). Para detecção de esporos de *Clostridium* sulfito redutor, utilizou-se 1 mL de solução salina em suspensão nos tubos de ensaio aquecidos no banho a 80°C, durante 10 min e posteriormente, plaqueados em Ágar Sulfito Base de Ferro (Himedia, Índia). Em seguida, adicionou-se outra camada de meio e, após solidificação foram incubadas a 37 °C durante 48h. A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada utilizando 1-2 test (Biocontrol) como descrito no método (AOAC 2000). Os resultados foram

interpretados visualmente, por monitoramento do desenvolvimento de uma imunobanda, que é um padrão característico de imobilização de células.

Análises físico-químicas

Reagentes e produtos químicos

Ácido sulfúrico concentrado, sulfato de potássio anidro, sulfato de cobre II, hidróxido de sódio, ácido bórico, etanol, éter de petróleo da Synth (Diadema, SP, Brasil). Sulfato de sódio anidro, hidróxido de potássio, n-Heptano foram obtidos Merck (Darmstadt, Alemanha). Os padrões de açúcar: glicose, frutose, sacarose, melibiose, trealose foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os ésteres metílicos de ácidos graxos - mistura padrão de detecção de ionização de chama (GC-FID) foram Supelco TM 37 Componente FAME Mix C4-C24, Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, EUA). Água de alta pureza (18 MX cm) foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Barnstrad, MA, EUA).

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

Umidade

Aproximadamente 1 g de cada amostra do pólen foi seca em estufa a 105 °C até peso constante (Zenebon; Tiglea et al., 2008).

Cinza

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria, após a incineração de 2 g da amostra em mufla a 600 ± 15 ° C (Zenebon; Tiglea et al., 2008).

pH e Acidez

O pH foi medido em fase aquosa obtida após mistura de 1 g de pólen em 75 mL de água destilada. A acidez foi determinada por titulometria com solução de NaOH 0,05 M (Zenebon; Tiglea et al., 2008).

Açúcares redutores

A quantificação dos carboidratos redutores foi realizada espectrofotometricamente a 540 nm (espectrometria UV-VIS, Unicam Helios,) (Nogueira et al., 2012).

Extrato etéreo-Lipídeos

O conteúdo lipídico foi determinado por gravimetria após extração com éter de petróleo, usando um dispositivo do tipo Soxlet (Tecnal-Brasil) (Zenebon; Tiglea et al., 2008).

Total de nitrogênio - teor de proteína

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl a partir de 200 mg de amostra. O fator de 6,25 foi utilizado para converter nitrogênio em proteína bruta (Zenebon; Tiglea et al., 2008).

Carboidratos

O teor total de carboidratos foi obtido por diferença [100 - (cinzas + proteínas + lipídios)] (%) (Nogueira et al., 2012).

Energia

A energia total (em kcal) foi estimada de acordo com a equação: energia (kcal) = 4 × (proteína g + g de carboidrato) + 9 × (g de lipídeo) (Nogueira et al., 2012).

Composição do Açúcar

Para a quantificação dos açúcares trealose sacarose, frutose, glicose e melibiose no pólen de abelha, 20 mg do produto foi homogeneizado com 0,5 mL de etanol 500g L⁻¹ e 0,5 mL de padrão interno 2-deoxy-D-glucose (1mg mL⁻¹), e colocados em banho ultrassom (Quimis-Brasil), durante 5 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionado 1mL de etanol 500g L⁻¹ no decantado que foi novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido por quatro vezes. O conteúdo resultante da extração foi analisado por cromatografia de troca de anions de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD, ICS-

3000, Dionex). A separação foi realizada com uma coluna CarboPac PA-20 (150 mm 33 mm) com uma pré-coluna CarboPac PA20 (Dionex), usando uma eluição isocrática com uma solução contendo NaOH (10 mM) e Ba (OH)₂ (2 mM). O volume de injeção foi de 5 µL, com fluxo de 0,3 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C, durante a corrida de 60min. Para quantificação da trealose, sacarose, frutose, glicose e melibiose, foi utilizado curva padrão usando padrões puros (Vilela et al., 2016).

Quantificação de ácidos graxos-CG

Foram utilizados 0,6 g de amostra, extraídas com 5 mL de n-Heptano (Merck, Alemanha) e 0,5 mL de uma solução de KOH (Merck, Alemanha) 2 M em MeOH (Merck, Alemanha), usando se repouso por 60 minutos a temperatura ambiente (Kaplan et al., 2016). À mistura resultante foram adicionadas gotas de ácido acético glacial (Merck, Alemanha) e a mesma foi seca com Na₂SO₄ anidro (Merck) posteriormente, esta solução foi agitada durante 2 min., utilizando um vórtice (Modelo Reax 2000, Heidolph, Schwabach, Alemanha). O sobrenadante foi filtrado através de papel de filtro (Whatman n.º 2) para separar a fração sólida do extrato. A Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos foi realizada em um cromatógrafo gasoso da marca DANI (Izasa, Barcelona, Spain) modelo CG1000, equipado com um detector de ionização de chamas (FID) e com uma coluna Macherey-Nagel (OPTIMA 225: 50% de cianopropilmetil-50% fenilmetilpolisiloxano) (30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm df). O gás transportador foi H₂ a uma pressão de 0,61 bar e proporção de 1:40. A taxa de fluxo do gás transportador foi ajustada em 4,0 mL min⁻¹. Um gradiente térmico de 170 a 240 °C a 3,5 °C min⁻¹ foi utilizado com as temperaturas do injetor FID a 240 °C. O volume de injeção foi de 1 µL. A quantificação de ácidos graxos foi realizada pelo fator de resposta usando uma mistura padrão de ácidos graxos (Supelco[®] TM 3-sigma-aldrich-USA) como solução padrão e foi expresso como porcentagem de ácidos graxos. Os conteúdos de ácidos graxos, saturados, mono e poli-insaturados (SFA, MUFA e PUFA) foram calculados por somatório. Os índices de aterogenicidade (AI) e trombogenicidade (TI) foram calculados de acordo com (GHAENI et al., 2013).

Análise estatística

Foram utilizados os testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Para avaliar diferenças das medianas das variáveis físico-químicas entre os tratamentos e espécies, aplicou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos são apresentados através da média, intervalo e mediana, 25 e 75 percentis, para melhor representar a distribuição de dados. Todas as análises foram realizadas empregando-se o software R, versão 3.4.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

RESULTADOS

Microbiologia

A contagem total de bactérias mesófilas aeróbicas foi menor para o pólen quando submetido ao método de conservação secagem, sendo constatada para ambas as espécies A amostra *in natura* e a liofilizada, inicialmente, exibiram comportamento semelhante, apresentando altas contagens, 10^6 e 10^4 para *A. mellifera* e *T. spinipes*, respectivamente (Figura 1-2). Entretanto, foi observada uma diminuição nessa contagem a partir dos 90 dias de armazenamento, mantendo-se estável até a última avaliação aos 360 dias no pólen das duas espécies.

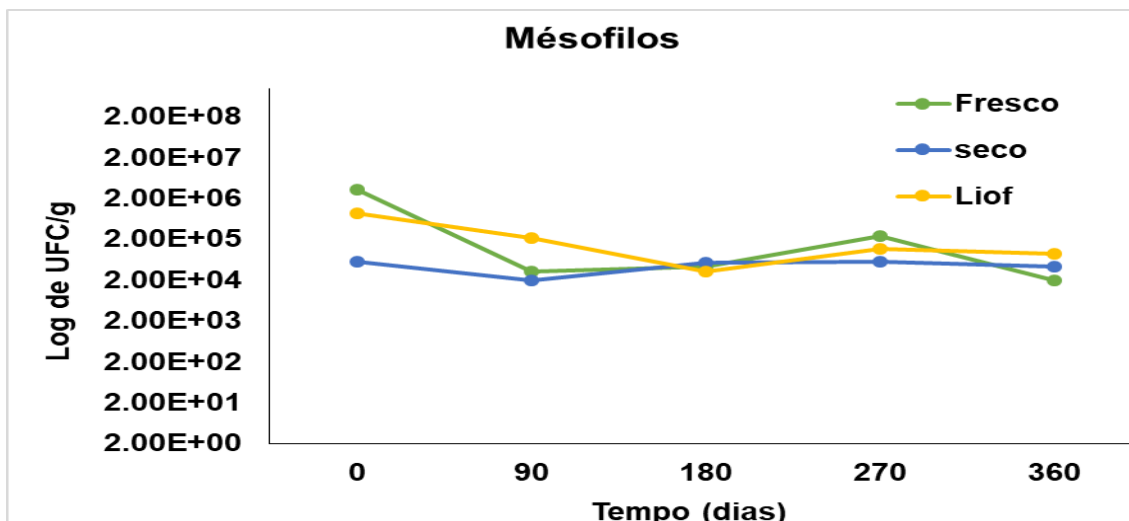


Figura 1- Efeito do armazenamento na contagem de microrganismos aeróbios mésofilos em log de UFC.g⁻¹ no pólen de *A. mellifera in natura*, liofilizado e seco.

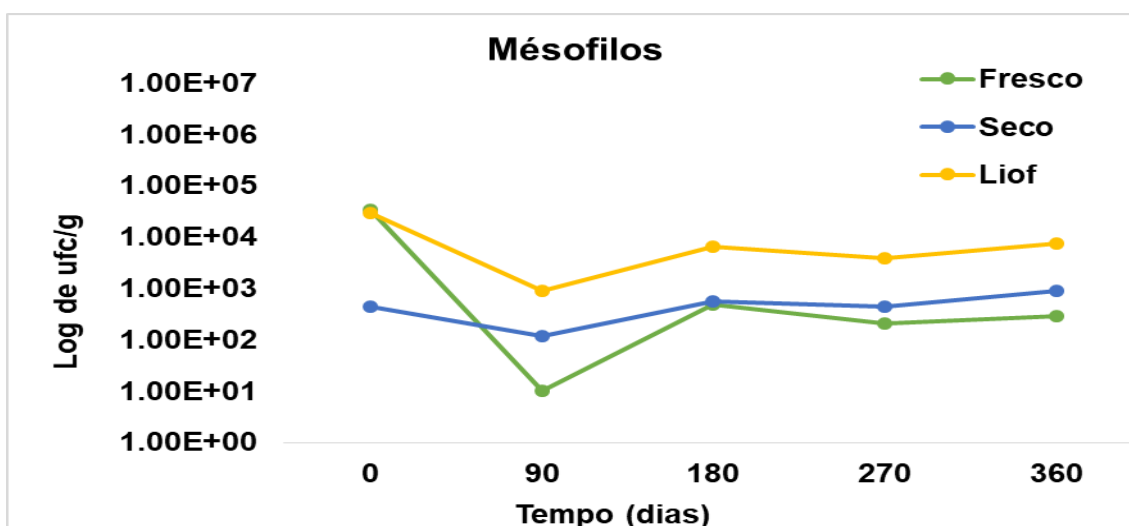


Figura 2- Efeito do armazenamento na contagem de microrganismos aeróbios mésofilos em log de UFC.g⁻¹ no pólen de *T. spinipes in natura*, liofilizado e seco.

A contagem de bolores e leveduras variou de $9,22 \times 10^5$ a $7,30 \times 10^6$ e *Staphylococcus* coagulase-positiva de $7,88 \times 10^3$ a $1,27 \times 10^6$ e foram observadas apenas para o pólen de *A. mellifera* no tempo inicial (tempo zero), estando presente em maior quantidade na amostra *in natura*, evidenciando uma contaminação prévia da amostra que foi utilizada posteriormente para secagem e liofilização (Figura 3). Para o pólen de *T. spinipes* não foi detectada contagem de bolores e leveduras e

Staphylococcus coagulase-positiva em nenhum dos tempos de avaliações das amostras.

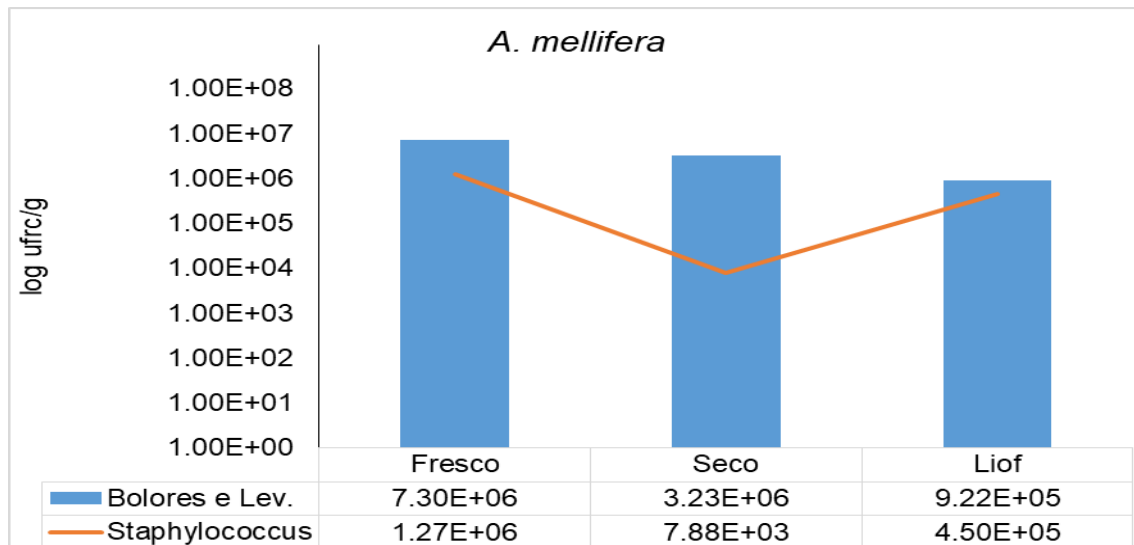


Figura 3- Contagem de bolores e leveduras *Staphylococcus* coagulase-positiva no pólen apícola *in natura*, seco e liofilizado de *A. mellifera*.

Todas as amostras de pólen de *A. mellifera* e *T. spinipes* exibiram contagem para coliformes totais $< 10^3$, se mantendo estável durante os 360 dias de avaliação. No entanto, *Salmonella* spp. e esporos de *Clostridium* sulfito redutores estavam ausentes em amostras, em ambas as espécies.

A contaminação indicativa de *Bacillus* spp nas amostras de pólen de *A. mellifera* atingiu valor máximo de $1,75 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, tendo diminuído com o tempo de armazenamento para 10^1 no pólen *in natura* e permanecendo constante para os polens secos e liofilizados. (Figura 4). Não havendo contagem para as amostras de pólen de *T. spinipes*.

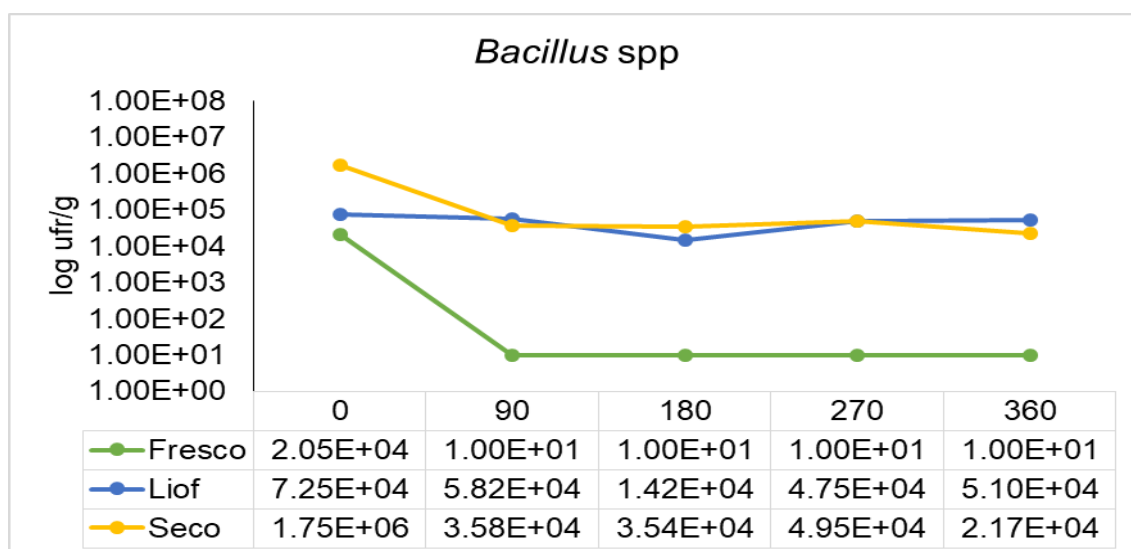


Figura 4- Contagem de *Bacillus spp.* em pólen de *A. mellifera in natura*, seco e liofilizado submetido em por um ano de armazenamento.

Analises físico – químicas

Os resultados dos parâmetros físico-químicos para o pólen de *A. mellifera* e de *T. spinioes* estão apresentados nas Figuras 5 e 6. Através do teste de Kruskal Wallis foram comparadas as variáveis físico-químicas no pólen das abelhas em relação aos métodos de conservação empregados. Foram encontrados valores significativos para os teores de umidade ($q=109,26$; $p=0,000$), cinzas ($q= 69,8$; $p=0,000$) açúcar redutor ($q= 59,68$; $p=0,000$); proteínas ($q=23,18$; $p=0,00$), carboidratos ($q= 79,07$; $p=0,00$), acidez ($q= 72,06$; $p=0,04$) e pH ($q= 69,08$; $p=0,00$). Não se observou diferença significativa para as variáveis lipídeos e calorias.

Umidade

Quanto ao teor de umidade, verificou se diferença entre o polén das espécies estudadas, ficando mais evidenciada nas amostras *in natura* do pólen de *A. mellifera*, onde a metade das amostras apresentou umidade superior a 40%, enquanto o pólen de *T. spinipes in natura* apresentou apenas 16%. Houve maior variabilidade no conteúdo de umidade para o pólen da espécie *T. spinipes*.

Acidez

Nas amostras de pólen de *A. mellifera* o comportamento da acidez foi bem diferenciado de acordo com os métodos de conservação empregados. O pólen de *A. mellifera* seco em estufa apresentou menor conteúdo de acidez, seguido pelo pólen liofilizado. O pólen *in natura* desta espécie apresentou teor de acidez média mais elevada em relação às demais amostras. O teor de acidez para o pólen de *T. spinipes* foi superior ao pólen de *A. mellifera*, com uma pequena variação entre os métodos de conservação, secagem e liofilização, sendo observados alguns outlines nas amostras de pólen em cápsulas. Além disso, houve uma grande variação intra amostral para o pólen *in natura*.

Carboidrato

O conteúdo de carboidratos nas amostras de pólen de *A. mellifera* seco e liofilizado estavam na faixa de 63 a 70%, enquanto nas amostras *in natura* os valores foram inferiores a 45%. Para o pólen de *T. spinipes* o conteúdo de carboidratos variou entre 56 e 66%, e o pólen encapsulado desta espécie apresentou menor variação média no conteúdo de carboidratos.

Cinza

Com relação ao teor de cinzas, foi observado o menor conteúdo (1,4%) para o pólen *in natura* de *A. mellifera*, e as menores variações observadas foram para as amostras encapsuladas. O pólen de *T. spinipes* obteve maior variação no teor de cinzas para as amostras secas e *in natura*. As concentrações de cinzas foram superiores nas amostras liofilizadas para as duas espécies.

Açúcares Redutores

O conteúdo de açúcares redutores para as amostras de pólen de *A. mellifera* secas, liofilizadas e encapsuladas apresentou 50% das amostras com valores superior a 32%, enquanto as amostras de *T. spinipes* apresentaram valores abaixo de 25%. A menor variação nos valores de açúcares redutores foi encontrada nas amostras *in natura* em ambas as espécies.

Por meio do teste de Kruskal Wallis foram comparados os tipos de açúcares encontrados no pólen das abelhas em relação aos métodos de conservação empregados. Assim, foram encontradas diferenças significativas para os teores de glicose ($q=13,17$; $p=0,040$), sacarose ($q= 51,69$; $p=0,00$) frutose ($q= 13,83$; $p=0,032$); melibiose ($q=32,54$; $p=0,00$). Entretanto, não foi encontrado diferença significativa para a trealose.

A frutose e a glicose foram os açúcares mais abundante no pólen de *A. mellifera* e as amostras liofilizadas apresentaram maior conteúdo destes açúcares seguida pela sacarose. As amostras *in natura* apresentaram menor teor de açúcares redutores glicose e frutose e maior conteúdo de Melibiose e trealose Figura 9.

O pólen de *T. spinipes* apresentou metade das amostras com teores de trealose com valores entre 9-12%, este foi o açúcar mais importante, seguido da frutose Figura 9. Ambos apresentaram maior variabilidade entre as amostras *in natura*, liofilizada e seca. O pólen de *T. spinipes* apresentou menor teor de açúcar redutor e maior quantidade de dissacarídeo não redutor em comparação com o pólen de *A. mellifera*.

Proteína

O conteúdo de proteínas nas amostras de pólen avaliadas para as duas espécies se situou entre 15 a 25%, e em torno de 50% das amostras de pólen de *T. spinipes* seco, liofilizado e encapsulados estiveram com valores entre 22-24%. Também, foi observado menor variação nos teores de proteínas para o pólen de *A. mellifera*, e o maior valor de proteína foi obtido nas amostras secas em estufa e o menor nas amostras *in natura*, para ambas as espécies.

pH

Quanto ao, o pH do pólen de *A. mellifera* apresentou valores entre 3,6 e 5,2, e as amostras liofilizadas demonstraram pH superiores a 4,7 sendo os mais elevados entre as amostras. As amostras *in natura* foram responsáveis por valores de pH inferiores a 4,0. Com relação ao pólen de *T. spinipes* apresentou aproximadamente 50% das amostras secas e liofilizadas apresentaram-se com pH entre 4,2 a 4,4 e as amostras *in natura* desse tipo de pólen apresentaram maior dispersão das medidas de pH.

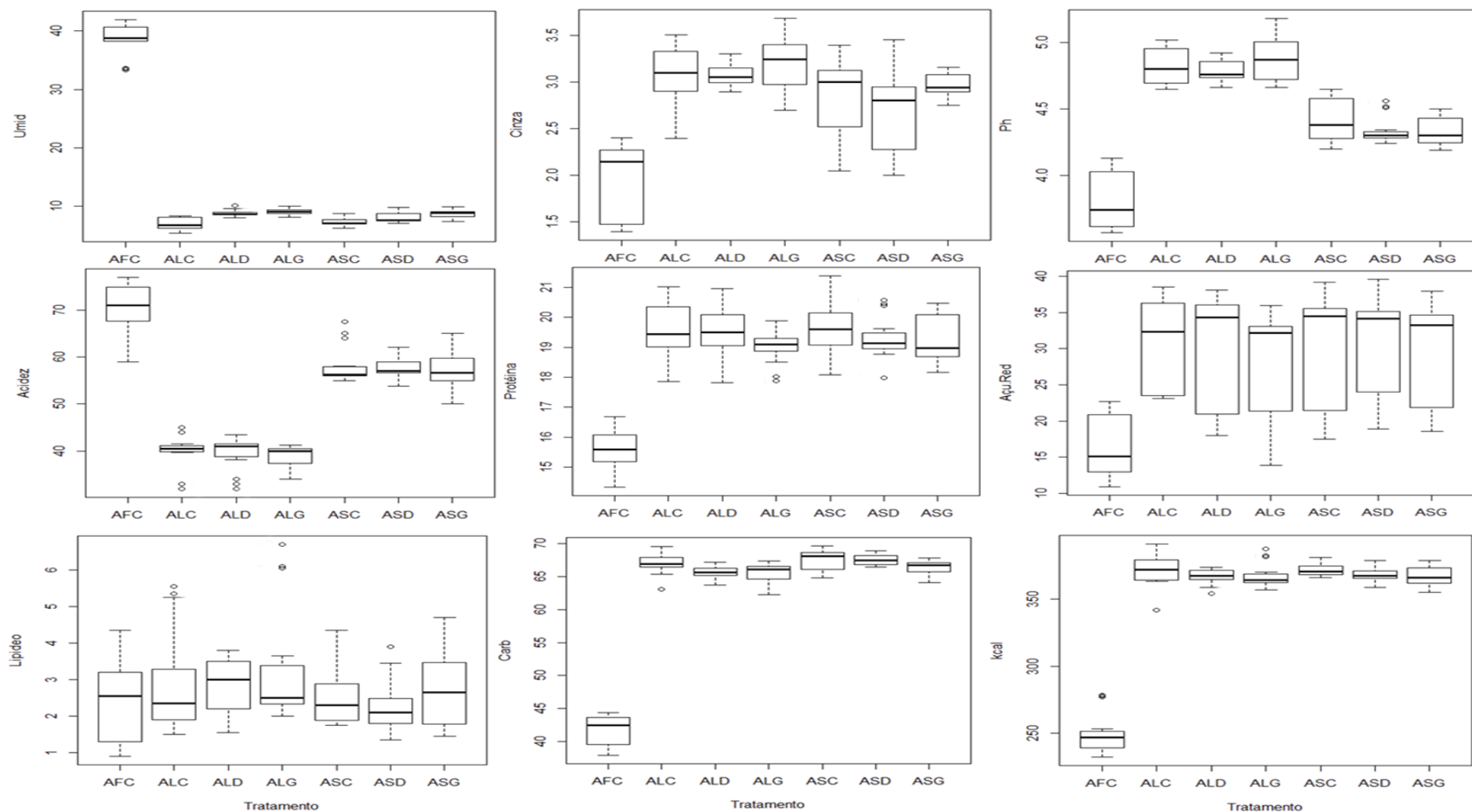


Figura 5- Box plot dos parâmetros físico-químicos de pólen seco, liofilizado encapsulado e *in natura* de *Apis mellifera*. AFC-pólen fresco, ALC-pólen liofilizado, ALD-pólen liofilizado em DRcaps, ALG-pólen liofilizado em capsula de gelatina, ASD-pólen seco, ASD-pólen seco em DRcaps, ASG-pólen seco em capsula de galatina.

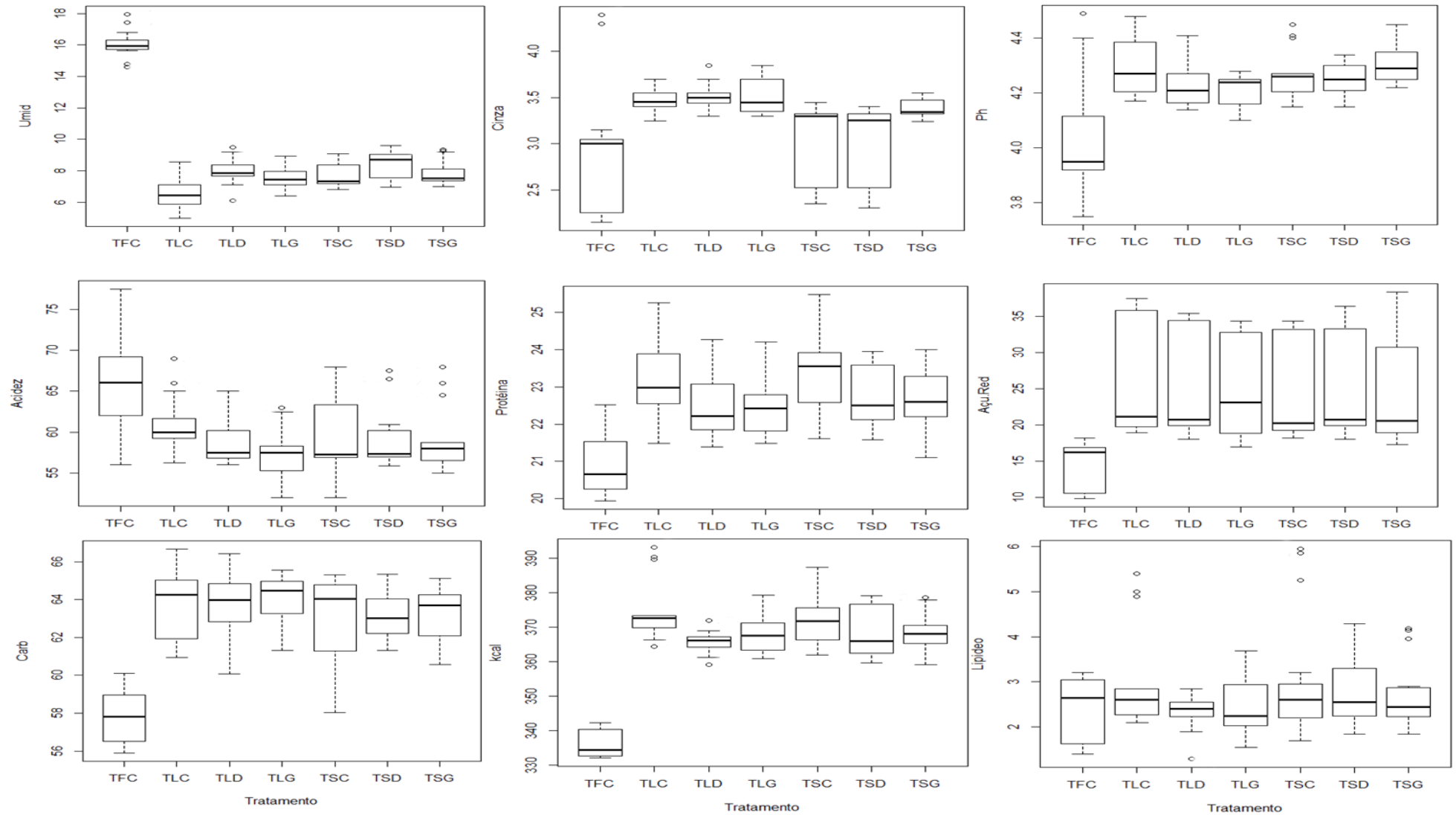


Figura 6- Box plot dos parâmetros físico-químicos de pólen seco, liofilizado encapsulado e *in natura* de *Trigona spinipes*. TFC-pólen fresco, TLC-pólen liofilizado, TLD-pólen liofilizado em DRcaps, TLG-pólen liofilizado em cápsula de gelatina, TSD-pólen seco, TSD-pólen seco em DRcaps, TSG-pólen seco em cápsula de gelatina.

Efeito do armazenamento

As Figuras 7 e 8 mostram o efeito dos métodos de conservação e do encapsulamento do pólen de *A. mellifera* e *T. spinipes*, durante um ano de estocagem. As amostras de pólen de ambas as espécies apresentaram tendência ao aumento de umidade, durante a estocagem, principalmente com relação ao pólen liofilizado. As amostras de pólen de *T. spinipes* a partir dos 270 dias de armazenamento, demonstraram queda no teor de umidade. As Amostras de polen de ambas as espécies, apresentaram comportamentos semelhantes para pH e acidez, ocorrendo aumento inicial do teor de acidez, seguido de queda acentuada, com maior estabilidade no pólen de *A. mellifera*. Nas amostras *in natura* notou-se uma relação inversa entre o pH e a acidez, na qual, o momento em que diminui o pH, houve aumento do teor de acidez.

Os açúcares redutores mostraram-se muito instáveis ao longo do armazenamento. As amostras *in natura* apresentaram comportamento oposto para o teor de açúcares redutores em relação às amostras secas em estufa e liofilizadas, para o pólen das duas espécies. O índice de carboidratos teve um leve aumento em todas as amostras avaliadas, independente da espécie.

O conteúdo em proteínas, tanto para *A. mellifera* quanto para *T. spinipes*, apresentou leve queda aos 90 dias, seguido de alta aos 180 dias, voltando a decrescer até a última avaliação. O pólen *in natura* apresentou uma queda mais acentuada de proteína em comparação com as amostras submetidas a desidratação.

Os teores de cinzas nas amostras liofilizadas do pólen de *A. mellifera* teve comportamento parecido com as amostras de *T. spinipes*. Enquanto a amostra *in natura* apresentou decréscimo mais rapidamente a partir dos 270 dias de armazenamento, as amostras secas em estufa apresentaram maior instabilidade com crescimento e decréscimo a cada avaliação. O conteúdo de cinzas para o pólen de *T. spinipes* seco reduziu a partir dos 180 dias de armazenamento, enquanto o liofilizado se manteve estável, com leve aumento aos 270 dias. A amostra *in natura* mostrou uma queda acentuada durante todo o tempo de armazenamento

O conteúdo de calorías apresentou um leve decréscimo ao longo do armazenamento para as amostras secas em estufa, liofilizadas e encapsuladas em ambas espécies. A amostra *in natura* teve um decréscimo inicial, seguido

de um pequeno aumento tendendo a uma nova queda no pólen de *A. mellifera* e diferentemente, a estabilidade no pólen de *T. spinipes*.

O teor de lipídeos apresentou comportamento semelhante para todas as amostras, com queda acentuada aos 90 dias de avaliação para as duas espécies. Aos 180 dias de armazenamento o pólen de *A. mellifera* teve um aumento, voltando a decrescer até os 360 dias.

A maior variabilidade no conteúdo de SFA, MUFA, PUFA, ω -6, ω -3, AI e TI foi observada para a amostra *in natura* do pólen de *A. mellifera* (Tabela 1). Os polens secos, liofilizados e encapsulados mantiveram a estabilidade durante o armazenamento para as duas espécies (Tabela 2). A relação ω -6/ ω -3 para o pólen de *A. mellifera* esteve entre 0,5 e 1,6 e as menores relações foram observadas para as amostras liofilizadas e secas, respectivamente. O pólen de *T. spinipes* apresentou uma estabilidade na ω -6/ ω -3 com valores oscilando entre 1,04-1,22. Os menores índices de AI e TI foram observados para o pólen de *T. spinipes*.

Tabela -1 Média e desvio padrão do conteúdo de ácidos graxos (g/100g) no pólen de *Apis mellifera* liofilizado, seco e *in natura* armazenado por 360 dias

Amostras	T (Dias)	SFA	MUFA	PUFA	ω -6	ω -3	ω -6/ ω -3	AI	TI
Liof.	0	40,27±0,08	7,40±0,11	52,32±0,03	19,08±0,01	33,16±0,01	0,57±0,00	0,47±0,00	0,69±0,00
	180	40,77±0,00	9,06±0,27	50,22±0,28	18,89±0,10	31,31±0,60	0,60±0,00	0,48±0,00	0,72±0,00
	360	40,46±0,64	6,63±0,71	52,71±0,09	18,52±0,06	34,18±0,02	0,54±0,00	0,52±0,02	0,71±0,01
Seco	0	43,85±0,60	5,64±2,28	50,50±1,67	18,53±0,80	31,89±0,87	0,58±0,00	0,57±0,04	0,81±0,02
	180	43,40±0,12	8,73±0,25	47,95±0,38	18,21±0,03	29,60±0,34	0,61±0,00	0,52±0,00	0,80±0,00
	360	43,85±0,26	6,50±0,11	49,45±0,35	18,24±0,12	31,20±0,23	0,58±0,00	0,59±0,00	0,83±0,01
<i>in natura</i>	0	59,83±0,03	4,38±0,04	35,50±0,06	20,60±0,00	13,63±0,12	1,51±0,01	1,31±0,01	1,91±0,01
	180	40,66±0,03	2,44±0,02	23,86±0,37	44,23±0,19	40,30±0,38	1,09±0,00	0,24±0,00	0,35±0,00
	360	33,73±0,97	7,88±0,60	57,71±1,58	14,09±0,21	8,86±0,20	1,59±0,01	0,86±0,03	1,46±0,00
Liof-DR	180	41,81±0,09	8,70±0,28	49,59±0,18	17,97±0,24	31,59±0,07	0,56±0,00	0,52±0,00	0,76±0,00
	360	42,71±0,02	5,91±0,17	51,22±0,21	17,53±0,08	33,69±0,12	0,52±0,00	0,59±0,00	0,79±0,00
Liof-GI	180	41,80±0,09	8,55±0,12	49,70±0,03	18,32±0,02	31,37±0,05	0,58±0,00	0,52±0,00	0,76±0,00
	360	43,92±0,20	6,05±0,00	49,75±0,20	17,29±0,06	32,46±0,13	0,53±0,00	0,62±0,00	0,83±0,00
Seco-DR	180	44,24±0,03	8,08±0,02	47,79±0,03	18,19±0,01	29,43±0,07	0,61±0,00	0,56±0,00	0,84±0,00
	360	44,49±0,38	6,26±0,01	49,09±0,41	17,48±0,37	31,61±0,03	0,55±0,01	0,62±0,01	0,85±0,01
Seco-GI	180	43,20±0,06	8,08±0,07	48,77±0,00	18,57±0,00	30,10±0,01	0,61±0,00	0,54±0,00	0,80±0,00
	360	44,83±0,13	6,14±0,07	48,80±0,05	17,97±0,02	30,82±0,03	0,58±0,00	0,62±0,00	0,87±0,00
Mediana		43,194	7,284	49,530	18,236	31,429	0,585	0,551	0,808
Mínimo		32,768	2,425	23,494	13,881	8,652	0,520	0,246	0,353
Máximo		59,866	9,341	59,297	44,431	40,687	1,604	1,328	1,930

Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, GI: capsula de gelatina SFA: Acido gráxo saturado; MUFA: Acido gráxo monoinsatuado; PUFA: Acido gráxo polinsatuado; AI: Índice Aterogênico, TI: Índice Trombogênico

Tabela-2 Média e desvio padrão do conteúdo de ácidos graxos (g/100g) no pólen de *T. spinipes* liofilizado, seco e *in natura* armazenado por 360 dias

Amostra	T. (dias)	SFA	MUFA	PUFA	ω -6	ω -3	ω -6/ ω -3	AI	TI
	0	37,69±0,14	4,21±0,04	58,08±0,10	30,42±0,07	27,66±0,03	1,09±0,00	0,46±0,00	0,69±0,00
Liof.	180	37,05±0,01	4,84±0,02	58,04±0,01	31,05±0,10	26,71±0,07	1,16±0,00	0,46±0,00	0,72±0,00
	360	36,60±0,52	4,06±0,05	59,05±0,52	30,15±0,15	28,59±0,37	1,05±0,00	0,48±0,01	0,70±0,01
Seco	0	36,42±0,05	3,47±0,05	60,09±0,00	31,12±0,01	28,96±0,00	1,07±0,00	0,45±0,00	0,68±0,00
	180	36,77±0,06	4,22±0,00	58,95±0,05	31,48±0,01	27,22±0,04	1,15±0,00	0,47±0,00	0,71±0,00
	360	36,70±0,41	3,80±0,07	59,48±0,48	30,76±0,16	28,41±0,30	1,08±0,00	0,49±0,00	0,71±0,01
<i>in natura</i>	0	35,45±0,29	2,47±0,10	62,07±0,18	33,02±0,08	29,05±0,27	1,13±0,01	0,46±0,01	0,68±0,01
	180	34,62±0,02	3,58±0,12	61,76±0,09	33,56±0,36	28,05±0,25	1,19±0,02	0,45±0,00	0,67±0,00
	360	34,96±0,19	2,95±0,08	62,17±0,12	33,44±0,14	28,60±0,25	1,16±0,01	0,47±0,00	0,68±0,00
Liof-DR	180	36,58±0,03	4,51±0,04	58,90±0,07	31,44±0,02	27,20±0,09	1,15±0,00	0,46±0,00	0,71±0,00
	360	36,98±0,31	3,70±0,14	59,31±0,17	30,53±0,33	28,51±0,16	1,07±0,01	0,50±0,01	0,72±0,01
Liof-GI	180	36,18±0,15	4,44±0,04	59,36±0,19	31,82±0,09	27,38±0,12	1,14±0,00	0,46±0,00	0,71±0,00
	360	36,05±0,24	3,64±0,00	60,31±0,24	31,09±0,02	29,09±0,26	1,08±0,01	0,42±0,00	0,67±0,00
Seco-DR	180	36,23±0,03	4,19±0,09	59,54±0,07	31,87±0,15	27,53±0,06	1,16±0,00	0,44±0,00	0,72±0,00
	360	36,35±0,02	3,42±0,09	60,12±0,11	31,18±0,09	28,81±0,22	1,07±0,01	0,41±0,00	0,79±0,00
Seco-GI	180	36,34±0,08	4,11±0,00	59,26±0,10	31,55±0,12	27,49±0,01	1,18±0,00	0,46±0,00	0,72±0,00
	360	36,21±0,05	3,48±0,02	60,29±0,07	31,33±0,04	28,71±0,03	1,09±0,00	0,48±0,00	0,70±0,00
Mediana		36,326	3,868	59,577	31,339	28,263	1,133	0,471	0,705
Mínimo		34,594	2,367	57,977	30,002	26,645	1,046	0,450	0,667
Máximo		37,846	4,875	62,297	33,930	29,327	1,221	0,519	0,740

Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, GI: capsula de gelatina SFA: Acido gráxo saturado; MUFA: Acido gráxo monoinsatuado; PUFA: Acido gráxo polinsatuado; AI: Índice Aterogênico, TI: Índice Trombogênico

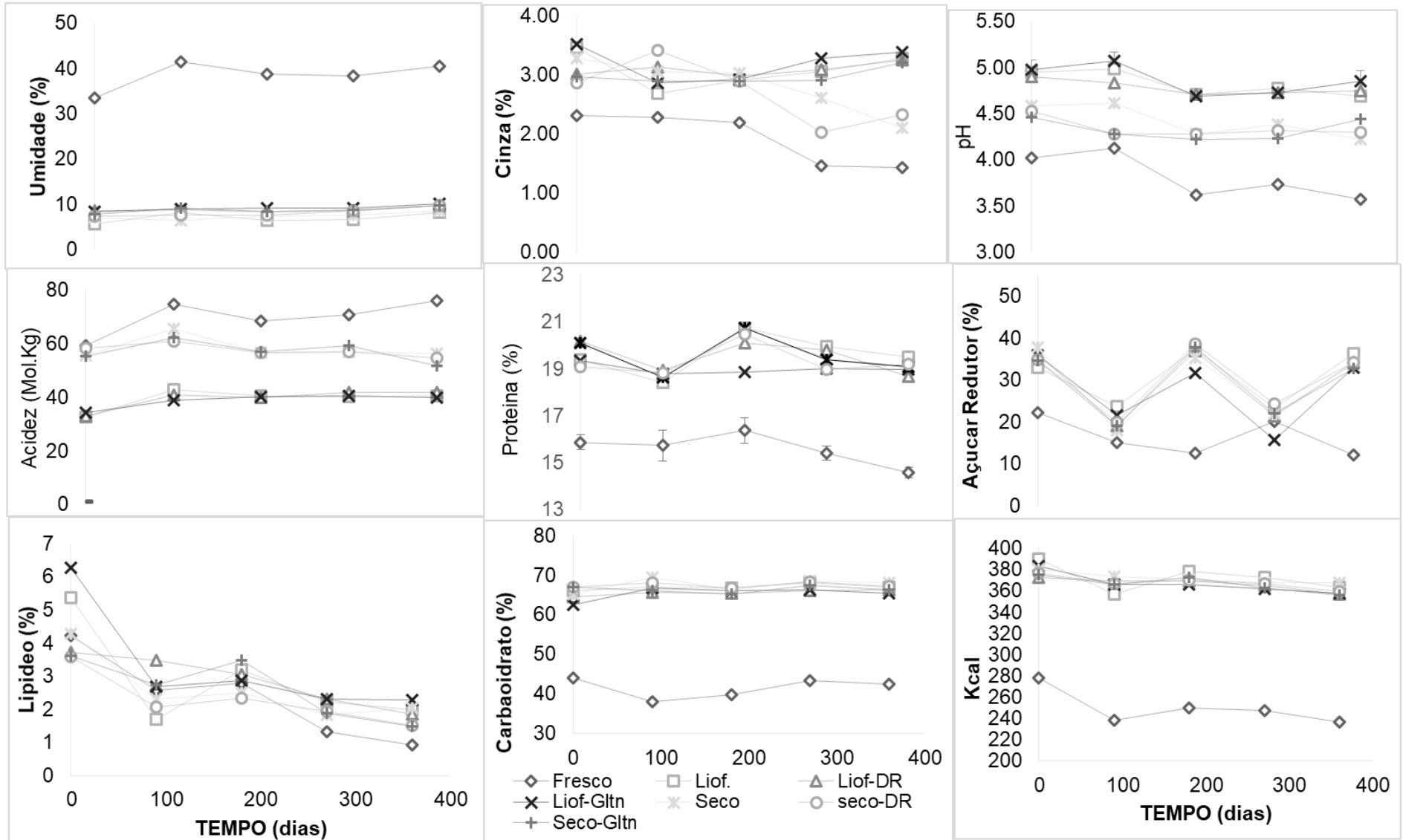


Figura 7 - Efeito do método de conservação secagem em estufa, liofilização e encapsulamento nas variáveis físico-químicas durante um ano de armazenamento do pólen de *Apis mellifera*. Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, Gltn: cápsula de gelatina.

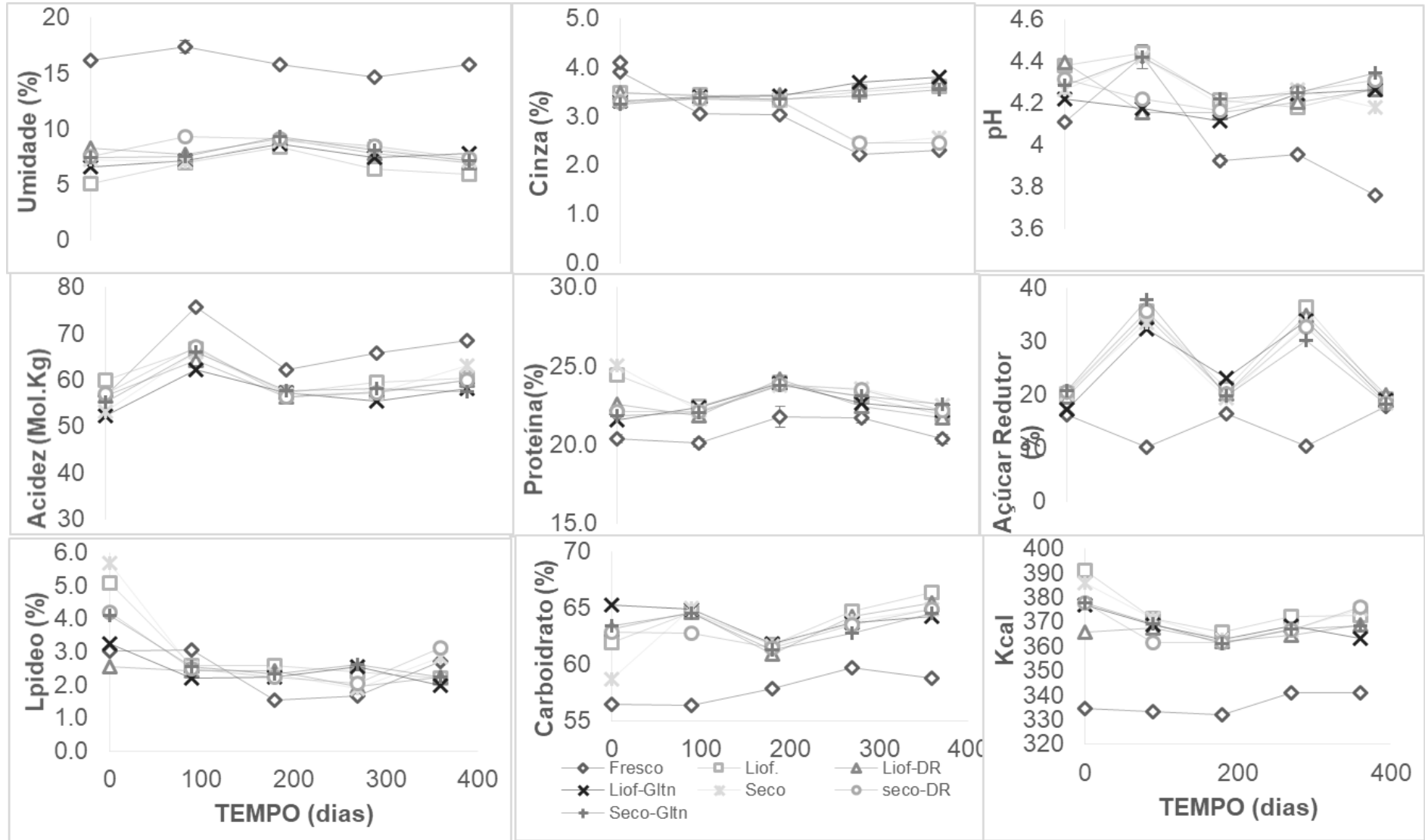


Figura 8- Efeito do método de conservação secagem em estufa, liofilização e encapsulamento nas variáveis físico-químicas durante um ano de armazenamento do pólen de *Trigona spinipes*. Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, Gltn: cápsula de gelatina.

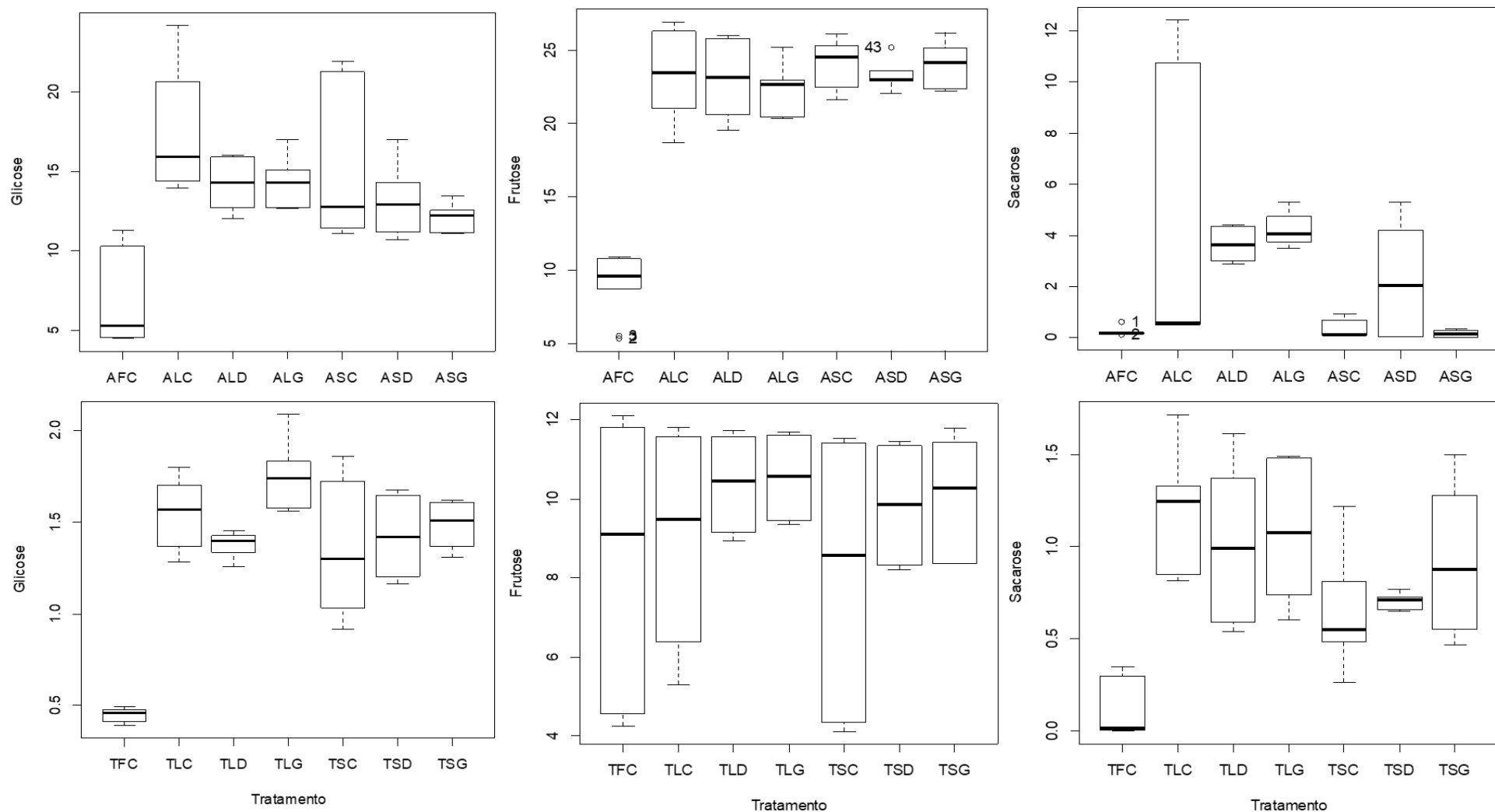
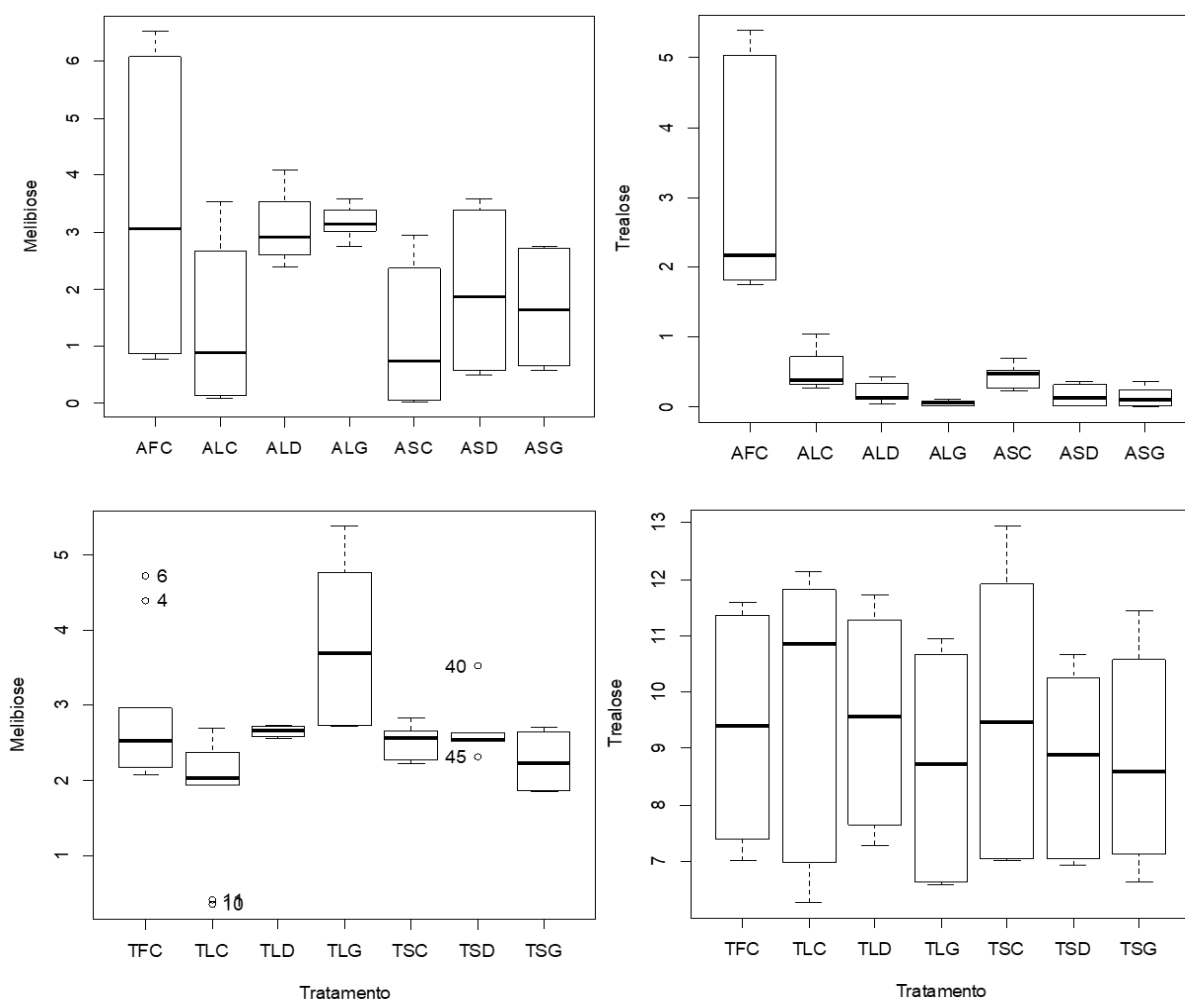


Figura 9- Teor de açúcares (g.100g⁻¹) do pólen de *A. mellifera* e *T. spinipes*. F: *in natura*, L: liofilizado, DR: DRcaps, S: seco, Gl: cápsula de gelatina. TFC-pólen fresco, TLC-pólen liofilizado, TLD-pólen liofilizado em DRcaps, TLG-pólen liofilizado em cápsula de gelatina, TSD-pólen seco, TSD-pólen seco em DRcaps, TSG-pólen seco em cápsula de gelatina.

Continuação Figura 9



DISCUSSÃO

Microbiologia

A contaminação do pólen de abelhas compromete seu consumo com base em seu risco para a saúde humana. Os regulamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não tratam esse produto como alimento. Desta forma não contempla os limites de contaminação microbiológica para o pólen apícola (Brasil 2001a).

Em países como Cuba e Argentina existem na legislação limites para alguns grupos de microrganismo. No caso da Argentina, observa-se limite máximo de $1,5 \times 10^5$ UFC g^{-1} para microrganismos aeróbios, máximo de 10^2 UFC g^{-1} para bolores e leveduras e ausência de microrganismos patogênicos (Argentina, 1990). A legislação cubana, estabelece limite máximo de 10^2 UFC

g⁻¹ para bolores e leveduras, <10⁵ UFC g⁻¹ para coliformes totais, ausência de *Salmonella* spp em 25 g de amostra e ausência de *E. coli* em 1 g de amostra (Puig-Peña et al., 2012). Incluindo o pólen na lista de alimentos de origem vegetal. Nesse estudo, o pólen de *T. spinipes* atendeu às duas legislações para todos os microrganismos testados.

Após o emprego dos métodos de conservação houve uma queda acentuada na contagem de colônias de *Staphylococcus* coagulase-positiva não sendo detectada contagem no decorrer do armazenamento. Apesar da redução observada nesse estudo após o emprego do método de secagem, a contagem do microrganismo ainda permaneceu alta, devido a resistência do microrganismo, evidenciando a importância das boas práticas de coleta e beneficiamento inicial do pólen. Considera-se que o *Staphylococcus aureus* é um microrganismo patogênico, é coagulase positiva e capaz de produzir enterotoxinas termoestáveis que, quando ingeridas, causam intoxicação alimentar (Franco; Landgraf, 2009).

São poucas as pesquisas realizadas para *Bacillus* spp em pólen apícola. Neste estudo a amostra *in natura* utilizada como controle no armazenamento passou por um processo de transformação que resultou em aumento de seu pH, o que provavelmente, inibiu o desenvolvimento do microrganismo. No entanto, as amostras secas e liofilizadas mantiveram a contagem estabilizada durante todo o armazenamento.

Cinco espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* foram isoladas no pólen de *A. mellifera* e no pólen de abelhas sem ferrão por Gilliam (1979) sendo o *Bacillus subtilis* associado ao pólen de abelha. Em pesquisa com pólen apícola *in natura*, seco e congelado Mauriello et al. (2017) relataram níveis de contaminação muito elevados no pólen *in natura*.

O pólen comercializado atualmente passa por processo de secagem, esta é realizada sob uma temperatura máxima de 42°C com um tempo variando entre 12-48 horas. Este processo é uma forma eficiente para controlar o desenvolvimento microbiano, uma vez que reduz a atividade de água do pólen. No entanto, o processo não é suficiente para eliminar a população microbiana pré-existente, principalmente quando se trata de esporos de bactérias mesófilas e fungos (Franco; Landgraf, 2009), o que explica a alta população de microrganismos encontrada no pólen após os processos de desidratação. Em estudos realizados por Puig-Peña et al. (2012), os autores

concluíram que, apesar da secagem deste produto contribuir para diminuir a microbiota, é insuficiente, porque não são alcançados, os níveis de aceitação exigidos. No entanto, Mauriello et al. (2017) e Dinkov, (2017) afirmaram que a secagem reduz significativamente a carga microbiana do pólen apícola, podendo chegar a níveis indetectáveis.

Físico-química

O conteúdo de água é um parâmetro importante para a qualidade e segurança do pólen. A percentagem elevada de umidade registada nesse estudo nas amostras de pólen, pode ser atribuída às condições de secagem impróprias e aumento de umidade durante o armazenamento. O conteúdo de água nas amostras secas em estufa e liofilizadas, logo após o processo, foi inferior a 60-80 g Kg⁻¹ relatado por De-Melo et al. (2016) em pólen liofilizados. Os resultados para pólen desidratado neste estudo estavam de acordo aos apresentados por Nogueira et al. (2012), Kostic et al. (2015) e Arruda et al. (2017).

No decorrer do armazenamento o teor de umidade se distanciou dos limites de 4 e 30 g 100 g⁻¹ propostos para pólen desidratado e fresco (Brasil 2001). Segundo Marchini; Reis; Moreti (2006) a variabilidade no conteúdo de umidade é devido à alta higroscopicidade do pólen.

O pólen de abelha é naturalmente ácido e as regulamentações brasileiras estipulam valores de pH variando de 4 a 6, com limite máximo de 300 meq / kg (Brasil, 2001). Os valores de pH e acidez encontrados nesse estudo estão de acordo com os apresentados por Nogueira et al (2012) e Marchini; Reis; Moreti (2006). Os ácidos mais importantes do pólen de abelha são os ácidos glucônico e láctico, Kalaycioğlu et al., 2017), e o ácido láctico é, muito provavelmente o produto final de processos de fermentação.

O teor de proteína encontrado nas amostras desse estudo está de acordo com os valores apresentados por Campos et al. (2008), Carpes et al. (2009), Martins et al. (2011), Sattler et al. (2015), De Melo et al. (2016), Arruda et al. (2017), Taha et al. (2017) e Tomas et al. (2017). A concentração de proteína mais elevada no pólen *T. spinipes*, sugere que algumas bactérias envolvidas no processo fermentativo fazem a conversão de aminoácidos livres em proteína (De Grandi-Hoffman et al., 2013).

A quantidade de cinzas reflete o conteúdo mineral, que inclui não apenas minerais importantes para uma boa nutrição, mas também metais pesados tóxicos (Morgano et al., 2010; Kostic et al., 2015). Os valores encontrados neste estudo estão de acordo com o valor máximo de 4% estabelecido pela legislação brasileira. Em pesquisas com pólen apícola brasileiro foram relatados valores semelhantes ao desse estudo por Carpes et al. (2009), Melo et al. (2009), Barreto et al. (2012), Sattler et al. (2015), Arruda et al. (2017). Em estudos com abelhas sem ferrão realizado por Vit et al. (2016) na Amazônia venezuelana também foram relatados níveis de cinza dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para pólen apícola.

O grupo dos carboidratos, que inclui açúcares, amido e fibra dietética, representa o componente principal das amostras de pólen de abelha. Os carboidratos correspondem a 2/3 dos constituintes totais (Carpes et al., 2009; Domínguez-Valhondo et al., 2011). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os apresentados por Nogueira et al. (2012), Kostic et al. (2015), Sagona et al. (2017) para pólen apícola desidratado. Em pesquisas realizadas com pólen *in natura* de abelhas sem ferrão, Rebelo et al. (2016) e Vit et al. (2016) encontraram valores de carboidratos entre 25,66 - 44,27%, valores próximos ao encontrados neste estudo para o pólen de *A. mellifera in natura*.

Os açúcares redutores são predominantes em relação ao não redutores, e representando de 38,2 a 56,6% dos açúcares do pólen apícola (Carpes et al. 2009). Os açúcares redutores mais abundantes no pólen de *A. mellifera* são glicose e frutose (Sattler et al., 2016; Arruda et al., 2017; Tomás et al., 2017). As concentrações mais elevadas do que outros sacarídeos são devido a adição de néctar pelas abelhas para a formação do pellet (Domínguez-Valhondo et al., 2011). Outros açúcares como dissacarídeos (sacarose) (Qian et al., 2008; Fuenmayor et al., 2014) e diversos polissacarídeos podem ser encontrados no pólen de abelhas, incluindo maltose, isomaltose, rafinose, erlose, amido, celulose e hemicelulose (Salazar-González & Díaz-Moreno 2016). O açúcar manitol foi encontrado em pólen de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* (Silva et al., 2006; Silva et al., 2014).

Os lipídios são importantes como moléculas nutritivas e de reserva de energia, como tal, são necessários para um desempenho adequado e desenvolvimento do grão de pólen. A quantificação de lipídeos em pólen de *A.*

mellifera tem sido bastante investigada no Brasil (Bastos et al., 2003, Carpes et al., 2009, Martins et al., 2011, Arruda et al., 2017). De acordo com Odoux et al., (2012) a quantidade de lipídeos é influenciada pela época de coleta do pólen pelas abelhas.

Ácidos graxos estão presentes na fração lipídica do pólen de abelha. Valores semelhantes aos apresentados neste estudo para SFAs (ácidos graxos saturados), MUFAs (ácidos graxos monoinsaturados), PUFAs (ácidos graxos polinsaturados), ω -6 (ômega -6), ω -3 (ômega -3) e a relação entre ω -6/ ω -3 foram relatados por Feas et al. (2012); Yang et al. (2013); Conte et al. (2017); Sagona et al. (2017).

Os PUFAS não podem ser sintetizados pelo corpo humano, portanto o consumo de pólen de abelha pode ser considerado uma fonte potencial de PUFAS para a dieta humana (Kaplan et al., 2016).

Além da presença relevante de PUFAs em alimentos consumidos, é muito importante que o conteúdo em ácidos graxos ω -3 e ω -6 estejam bem equilibradas. Portanto, a determinação da razão ω -6 / ω -3 é um dos parâmetros mais importantes para descrever os ácidos graxos como compostos com potenciais bioativos (Kaplan et al 2016; Melo et al., 2017). Os índices AI (Aterogênico) e TI (Trombogênico) foram estudados por Araújo et al. (2017) para o pólen de *A. mellifera* brasileiro, sendo constatada a influência da origem floral do pólen aos valores dos índices.

CONCLUSÃO

A secagem e a liofilização aplicadas para a conservação do pólen de *A. mellifera* e *T. spinipes* mantem a estabilidade dos parâmetros físico-químicas dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente para o pólen apícola, com exceção do teor de umidade.

Os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos não foram conclusivos quanto ao uso das cápsulas para conservação dos pólenes.

Os métodos de conservação foram eficientes para manutenção da qualidade microbiológica no pólen de ambas as espécies de abelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC (2000). Official Methods of Analysis, 17th edn. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.

Araújo, J. S., Chambó, E. D., Costa, M. A. P. D. C., Cavalcante da Silva, S. M. P., Lopes de Carvalho, C. A., & M Estevinho, L. (2017). Chemical composition and biological activities of mono-and heterofloral bee pollen of different geographical origins. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 921.

Argentina. (1990). 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). Disponível em : http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_X.pdf Acessado: 20 jan 2018.

Arruda, V. A. S., Pereira, A. A. S., Estevinho, L. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2013). Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. *Food and chemical toxicology*, 51, 143-148.

Arruda, V. A. S., Viera dos Santos, A., Figueiredo Sampaio, D., da Silva Araújo, E., de Castro Peixoto, A. L., Estevinho, M. L. F., & Bicudo de Almeida-Muradian, L. (2017). Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 231-238.

Barreto, L. M. R. C., Funari, S. R. C., & de Oliveira Orsi, R. (2005). Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Federal. *Boletim de Indústria animal*, 62(2), 167-175.

Barreto, L. M. R. C., Funari, S. R. C., Orsi, R. O., & Dib, A. P. S. (2006). Produção de pólen no Brasil. *Taubaté-SP: Cabral Editora e Livraria Universitária*, 99

Barreto, L. M. R. C., Nordi, J. C., Dib, A. P. D. S., César, V. S., Alvareli, L. G., Nordi, N. T., & Canella, J. B. (2012). Qualidade físico-química do pólen apícola produzido no Vale do Paraíba-SP. *Rev. Biocienc*, 18, 64-70.

Bastos, D. H., Rocha, C. I., Cunha, I. B. D. S., Carvalho, P. D. O., & Torres, E. A. (2003). Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais-Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 239-244.

Brasil. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 2001. Seção 1, p.18

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2001). Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução-RDC nº12, de 02/01/01.– Anvisa, 2001. Diário Oficial da União, Brasília, 10/01/01, nº 7, seção I, p. 45-53,

Campos, M. G. R., Frigerio, C., Lopes, J., & Bogdanov, S. (2010). What is the future of Bee-Pollen. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(4), 131-144.

Campos, M. G., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154-161.

Canale, A., Benelli, G., Castagna, A., Sgherri, C., Poli, P., Serra, A., ... & Nicoletta, C. (2016). Microwave-assisted drying for the conservation of honeybee pollen. *Materials*, 9(5), 363.

Carpes, S. T., Cabral, I. S., Luz, C. F. P., Capeletti, J. P., Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Palynological and physicochemical characterization of

Apis mellifera L. bee pollen in the Southern region of Brazil. *J Food Agric Environ*, 7, 667-673.

Conte, G., Benelli, G., Serra, A., Signorini, F., Bientinesi, M., Nicolella, C., & Canale, A. (2017). Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 55, 12-19.

Costa Filho, J., Jorge, S., Kremer, F. S., de Oliveira, N. R., Campos, V. F., da Silva Pinto, L., ... & Maggioni, R. (2018). Complete genome sequence of native *Bacillus cereus* strains isolated from intestinal tract of the crab *Ucides* sp. *Data in brief*, 16, 381-385.

Cousin, M.A., Jay, J.M. and Vasavada, P.C. (2001) Psychrotrophic microorganisms. In *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*, ed. Downes, F.P. and Ito, K. pp. 159–166. Washington, DC: American Public Health Association.

DRcaps® capsules overview brochure, https://s3.amazonaws.com/cpsl-web/kc/library/c1a-32029_DRCaps-A4_FIN,PDF (05 fev 2018),

De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., Sattler, J. A. G., Souza, B. R., da Silva Freitas, A., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 808-815.

Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4303-4309.

DeGrandi-Hoffman, G., Eckholm, B. J., & Huang, M. H. (2013). A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie*, 44(1), 52-63.

Dinkov, D. (2017). Isolation and Identification of Bacteria in Flower Bee Pollen. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 15(3), 225-234.

Domínguez-Valhondo, D., Bohoyo Gil, D., Hernández, M. T., & González-Gómez, D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International journal of food science & technology*, 46(10), 2204-2211.

Dórea, M. D. C., Novais, J. S. D., & Santos, F. D. A. R. D. (2010). Botanical profile of bee pollen from the southern coastal region of Bahia, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 24(3), 862-867.

Feldsine, P. T., Lienau, A. H., Roa, N. H., & Green, S. T. (2005). Enumeration of total coliforms and E. coli in foods by the SimPlate® coliform and E. coli color indicator method and conventional culture methods: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1318-1333.

Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17(7), 8359-8377.

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

Funari, S. R. C., Rocha, H. C., Sforcin, J. M., Curi, P. R., Funari, A. R. M., & Orsi, R. O. (2003). Efeitos da coleta de pólen no desenvolvimento de colônias e na composição bromatológica de pupas de *Apis mellifera*. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 11(2), 80-86.

Franco, B.D.G.M. and Landgraf, M. (2009) *Microbiologia dos alimentos*, 6th edn. São Paulo, BR: Atheneu.

Ghaeni, M., Ghahfarokhi, K. N., & Zaheri, L. (2013). Fatty acids profile, atherogenic (IA) and thrombogenic (IT) health lipid indices in *Leiognathus bindus*

and *Upeneussulphureus*. *Journal of Marine Science. Research & Development*, 3(4), 1.

Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie*, 10, 43–53.

Human, H., & Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67(14), 1486-1492.

Kalaycıoğlu, Z., Kaygusuz, H., Döker, S., Kolaylı, S., & Erim, F. B. (2017). Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 402-408.

Kaplan, M., Karaoglu, Ö., Eroglu, N., & Silici, S. (2016). Fatty acid and proximate composition of bee bread. *Food technology and biotechnology*, 54(4), 497.

Kostić, A. Ž., Pešić, M. B., Mosić, M. D., Dojčinović, B. P., Natić, M. M., & Trifković, J. Đ. (2015). Mineral content of bee pollen from Serbia/Sadržaj minerala u uzorcima pčelinjega peluda iz Srbije. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(4), 251-258.

Marchini, L. C., Reis, V. D. A. D., & Moreti, A. C. D. C. C. (2006). Physico-chemical composition of pollen samples collected by Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil. *Ciencia Rural*, 36(3), 949-953.

Martins, M. C., Morgano, M. A., Vicente, E., Baggio, S. R., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2011). Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states. *Journal of Apicultural Science*, 55(2), 107-116.

Mauriello, G., De Prisco, A., Di Prisco, G., La Storia, A., & Caprio, E. (2017). Microbial characterization of bee pollen from the Vesuvius area collected by using three different traps. *PloS one*, *12*(9), e0183208.

Melo, R. B., de Barros Silva, P. G., Oriá, R. B., de Souza Melo, J. U., da Silva Martins, C., Cunha, A. M., & Vasconcelos, P. R. L. (2017). Anti-inflammatory effect of a fatty acid mixture with high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio on rats submitted to dental extraction. *Archives of oral biology*, *74*, 63-68.

Morgano, M. A., Teixeira Martins, M. C., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Yotsuyanagi, K., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Inorganic contaminants in bee pollen from southeastern Brazil. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(11), 6876-6883.

Nagai, T., Nagashima, T., Suzuki, N., & Inoue, R. (2005). Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *60*(1-2), 133-138.

Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(9), 11173-11187.

Odoux, J. F., Feuillet, D., Aupinel, P., Loublier, Y., Tasei, J. N., & Mateescu, C. (2012). Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies. *Apidologie*, *43*(5), 561-575.

Perfil Sintético. Território de Identidade Piemonte do Paraguaçu. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Governo da Bahia. Salvador, 2015. Disponível em: <http://www.sdr.ba.gov.br/arquivos/File/PerfilPiemontedoParaguacu.pdf> . Acesso em 15 dez. 2017.

Puig-Peña, Y., del-Risco-Ríos, C. A., Álvarez-Rivera, V. P., Leiva-Castillo, V., & García-Neninger, R. (2012). Comparación de la calidad microbiológica del

polen apícola fresco y después de un proceso de secado. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43(1).

Qian, W. L., Khan, Z., Watson, D. G., & Fearnley, J. (2008). Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1), 78-83.

Ranieri, A., Benelli, G., Castagna, A., Sgherri, C., Signorini, F., Bientinesi, M., & Canale, A. (2017). Freeze-drying duration influences the amino acid and rutin content in honeybee-collected chestnut pollen. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Rebelo, K. S., Ferreira, A. G., & Carvalho-Zilse, G. A. (2016). Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural*, 46(5), 927-932.

Sagona, S., Pozzo, L., Peiretti, P. G., Biondi, C., Giusti, M., Gabriele, M., ... & Felicioli, A. (2017). Palynological origin, chemical composition, lipid peroxidation and fatty acid profile of organic Tuscanian bee-pollen. *Journal of Apicultural Research*, 56(2), 136-143.

Salazar-González, C., & Díaz-Moreno, C. (2016). The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process. *Journal of Apicultural Research*, 55(2), 161-175.

Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., de Freitas, A. D. S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, 77, 82-91.

Silva, G. R., da Natividade, T. B., Camara, C. A., da Silva, E. M. S., dos Santos, F. D. A. R., & Silva, T. M. S. (2014). Identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra stingless bees (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sciences*, 5(11), 1015.

Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., & Gomes, R. A. R. (2010). Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água: Varela. São Paulo, 4 ed., 624.

Silva, R. D. N., Monteiro, V. N., Alcanfor, J. D., Assis, E. M., & Asquieri, E. R. (2003). Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. *Food Science and Technology*, 23(3), 337-341.

Taha, E. K. A., Al-Kahtani, S., & Taha, R. (2017). Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Tomás, A., Falcão, S. I., Russo-Almeida, P., & Vilas-Boas, M. (2017). Potentialities of beebread as a food supplement and source of nutraceuticals: Botanical origin, nutritional composition and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 219-230.

Team, R. C. (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>: (acesso em: 20 dez 2017).

Vilela, A., Sobreira, C., Abraão, A. S., Lemos, A. M., & Nunes, F. M. (2016). Texture quality of candied fruits as influenced by osmotic dehydration agents. *Journal of Texture Studies*, 47(3), 239-252.

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

Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(3), 708-718.

Zenebon, O.; Tiglea, N.S.P.P. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4th ed; Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, Brazil, 1020.

ARTIGO 3

EFEITO DO PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO EM CÁPSULA NA BIODISPONIBILIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PÓLEN DE *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 E *Trigonas spinipes* FABRICIUS, 1793³

³ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do Periódico Innovative Food Science & Emerging Technologies.

EFEITO DO PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO EM CÁPSULA NA BIODISPONIBILIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PÓLEN DE *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 E *Trigonas spinipes* FABRICIUS, 1793

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar as implicações do processamento e do armazenamento em cápsulas na composição e biodisponibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos e atividade antioxidante do pólen de *Apis mellifera* e *Trigonas spinipes*. As amostras de polens passaram por liofilização e secagem seguidas de encapsulamento. Posteriormente, foram avaliadas nos tempos zero, seis e 12 meses. Os ensaios de digestão *in vitro* revelaram liberação crescente dos fenóis e flavonoides totais assim como aumento da atividade antioxidante após cada fase da digestão para as amostras de polens das espécies avaliadas. Os resultados também evidenciaram que o uso das cápsulas pode ser uma alternativa à liberação controlada destes compostos no processo digestivo do pólen. Foi constatada diferença significativa entre os métodos empregados na conservação do pólen e a liberação de fenóis e flavonoides bem como na atividade antioxidante. O perfil cromatográfico revelou os seguintes compostos fenólicos: cloridzina, myrecitina, kaempferol-3-o-rutinoside, kaempferol 3-O-glucoside, quercetina e kaempferol, sendo este perfil semelhante para o pólen de *A. mellifera* e *T. spinipes*, variando apenas as concentrações dos respectivos compostos.

Palavras-chaves: Antioxidante, bioacessibilidade, liofilização, quercetina

**EFFECT OF PROCESSING AND STORAGE IN CAPSULE ON *IN VITRO*
BIOAVAILABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF POLLEN FROM *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 AND
Trigonas spinipes FABRICIUS, 1793**

ABSTRACT: This study evaluated the influence of processing and storage in capsules on composition and *in vitro* bioavailability of phenolic compounds and antioxidant activity of pollen of *Apis mellifera* and *Trigonas spinipes*. Pollen samples were freeze-dried, oven dried and encapsulated and evaluated at time zero, 6 and 12 months. *In vitro* digestion tests showed growing release of total phenols and flavonoids as well as increased antioxidant activity after each digestion phase for pollen samples of the species evaluated. The results also showed that the use of capsules could be an alternative to the controlled release of these compounds in the digestive process of pollen. There was significant difference between the conservation methods of pollen and the release of phenols and flavonoids as well as in the antioxidant activity. The chromatographic profile revealed the following phenolic compounds: chloridzine, myricetin, kaempferol-3-o-rutinoside, kaempferol 3-O-glucoside, quercetin and kaempferol, and this profile was similar for pollens of *A. mellifera* and *T. spinipes*, varying only concentrations of their compounds.

Key words: Antioxidant, bioaccessibility, freeze-drying, quercetin

INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos funcionais que podem contribuir na prevenção de doenças está aumentando em todo o mundo. Nesse contexto, o pólen de abelha representa uma alternativa viável porque é uma excelente fonte de ácidos graxos, particularmente os ômega 3 e 6 e outros compostos bioativos, tais como tocoferóis, vitaminas do complexo B, minerais e compostos fenólicos (Freire et al., 2012; Arruda et al., 2013; Carpes et al., 2013; Yang et al., 2013; Rzepecka-Stojko et al., 2015; Sattler et al., 2015; De-Melo et al., 2016).

Atualmente o Brasil é líder mundial em pesquisas com compostos bioativos oriundo do pólen apícola, seguido da China e da Espanha; dentre estas merecem destaques as pesquisas com compostos fenólicos, que ocupa a terceira posição em trabalhos publicados (Ares et al., 2018).

Os compostos fenólicos derivam do metabolismo secundário da maioria das plantas e são de ocorrência natural. No pólen de abelha, existem vários compostos fenólicos identificados como: ácidos *p*-hidroxibenzoico, *p*-curúico, vanílico, gálico e furílico, quercetina, isorhamnetina, galangina, crisina, miricetina e pinocembina (Serra Bonvehí et al., 2001; Leblanc et al., 2009).

O interesse por compostos fenólicos e outros metabolitos secundários está aumentando devido ao seu potencial papel protetor na saúde humana. Estudos indicam a relação dos compostos fenólicos com as propriedades farmacológicas como: atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antimutagênica, hepatoprotetora e antioxidante (Campos et al., 2008; Nogueira et al., 2012; Pascoal et al., 2014).

Em pesquisas realizadas com pólen de abelhas, há relatos que evidenciam que os métodos de processamento e o armazenamento influenciam tanto positivamente como negativamente a composição de alguns componentes e também a sua capacidade antioxidante (Arruda et al., 2013; Canale et al., 2016; Conte et al., 2017; Ranieri et al., 2017).

Visto que os compostos fenólicos são instáveis em matrizes de alimentos, sob várias condições de processamento e armazenamento, os estudos que consideram tais condições sobre estes compostos no pólen são limitados. Nesse contexto, para alcançar os máximos benefícios de um alimento, é fundamental compreender a composição nutricional e de bioativos, bem como os efeitos do processamento e armazenamento no comportamento

e biodisponibilidade desses componentes benéficos. Com base nestas premissas, este estudo foi elaborado com o objetivo de avaliar o efeito do processamento e do armazenamento em cápsulas na composição e biodisponibilidade *in vitro* de compostos fenólicos e atividade antioxidante do pólen de *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra

O pólen armazenado por *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (Arapuá) foi coletado no período de maio a agosto de 2016, no Território de Identidade Piemonte do Paraguaçu, macrorregião do Semiárido baiano, sob o domínio da caatinga, com características de clima semiárido e como principal bacia hidrográfica o rio Paraguaçu. A economia dessa região está pautada, na exploração dos recursos naturais, com extração mineral e, principalmente, na agropecuária (Perfil. 2015).

O pólen de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 foi coletado em junho de 2016, por apicultores do município de Canavieiras (15°41'S, 38°57'W), localizado no "Litoral Sul" microrregião econômica do estado da Bahia. Essa região caracteriza-se por amplas áreas de mangue, mas também tem grandes extensões de floresta, restinga e dunas, com ocorrências de espécies da família arecaceae (Dórea; Novais; Santos, 2010).

Todo o material coletado foi acondicionado em recipientes, previamente esterilizados e colocados em caixa térmica com gelo para o transporte ao laboratório, onde foi homogeneizado e congelado em freezer a - 18°C. Cada amostra foi dividida em três subamostras: a) foi congelada a -80 °C e depois desidratada em um liofilizador a vácuo (Terroni-Enterprise II- Brasil) durante 24h; b) seca em uma estufa de secagem com circulação de ar forçada (tecnal-Brasil) a 42 °C durante 48-52 h (De-Melo et al., 2016); c) foi usada recém-coletada ou fresca.

Após a secagem e a liofilização do pólen, a encapsulação do produto foi realizada em farmácia de manipulação do município de Cruz das Almas, Bahia. Para tanto, foram utilizados dois tipos de cápsulas: Cápsula de gelatina, composta por gelatina a 100% e dióxido de titânio a 2,90% (Informações do

fabricante); e DRCaps, composta por hypromellose a 100% e gelatina a 5%, ambas com capacidade de 400 mg (DRCAPS, 2018).

Após a encapsulação, o pólen de *A. mellifera* e o pólen de *T. spinipes* (pão de abelha), juntamente com a sub-amostra *in natura*, foram embalados em potes de polietileno com tampas de rosca. O armazenamento foi feito em estufa com umidade a 60% e temperatura de 25 °C. Para avaliar a estabilidade foram efetuadas análises no tempo zero e 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento.

As análises foram realizadas no Núcleo de Estudos dos Insetos INSECTA do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas-BA. Parte do experimento foi conduzida no Laboratório de Microbiologia da Escola Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal em parceria com a Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Química, Vila Real, Portugal.

Reagentes:

Metanol, clorofórmio (CHCl_3), carbonato de sódio (Na_2CO_3), monooleato de sorbitano (Tween 40), Cloreto de ferro(III) hexahidratado, gentamicina foram obtidos Merck (Darmstadt, Alemanha). Trolox, ácido gálico, quercetina-, ácido linoleico (LA), β -caroteno, reagente de Folin-Ciocalteu, cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). Água de alta pureza (18 MX cm) foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Barnstrad, MA, EUA).

Nas análises por HPLC utilizou-se metanol e ácido fórmico de qualidade HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os padrões de referência dos compostos fenólicos adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) utilizados neste estudo foram os ácidos fenólicos, nomeadamente o ácido gálico (GA, $\geq 99\%$), ácido protocatequico (99,63%), ácido vanílico ($\geq 97\%$), ácido siringíco ($\geq 98\%$), ácido β -resorcílico ($\geq 97\%$), ácido 4-hidroxibenzóico ($\geq 99\%$), 4-hidroxibenzaldeído (98%), ácido ferúlico ($\geq 99\%$), ácido sinápico ($\geq 99\%$), ácido cinâmico ($\geq 99\%$), ácido cafeico ($\geq 98\%$), ácido *p*-cumarico ($\geq 98\%$), ácido clorogênico ($> 95\%$), ácido 4-hidroxifenilacético (98%); os flavonóides (+) -

catequina ($\geq 98\%$), naringina ($\geq 95\%$), naringenina (98%), rutina ($\geq 94\%$), quercetina (95%), kaempferol ($\geq 98\%$), miricetina ($\geq 96\%$), pinocembrina (95%), quercetina-3-O-glucopiranosídeo ($\geq 99\%$), kaempferol-3-O-rutinosídeo ($\geq 98\%$), kaempferol-3-O-glucósídeo ($\geq 95\%$); tilirosídeo ($\geq 98\%$); as chalcones: floridzina desidratada (99%) e floretina ($\geq 98,5\%$); e o resveratrol ($\geq 99\%$). As soluções de stock individuais dos polifenóis acima mencionados foram preparadas em metanol com concentrações variando de 1 a 5 g/L e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todas as enzimas (α -amilase, pepsina, pancreatina, e sais biliares) utilizadas para a digestão *in vitro* foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Obtenção de Extrato Hidroetanólico de Pólen

Para a obtenção do extrato hidroetanólico de pólen, amostras contendo 10 g de pólen de abelhas foram submetidas a extração com 50 mL de solução de etanol 700 g L^{-1} , após agitação em placa por 45 minutos em temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados através de filtro de papel qualitativo e os sobrenadantes evaporados em evaporador rotativo (IKA-RV-USA). Os extratos secos foram armazenados em refrigeração até o momento das análises (Flório Almeida et al., 2017).

Ensaio de branqueamento de β -caroteno

Para o ensaio de branqueamento de β -caroteno utilizou-se a técnica descrita por Marco (1968) com modificações para uso de microplacas por Lorenzo et al. (2015). Resumidamente, 4 mg de β -caroteno, 0,5 mL de ácido linoleico e 4 g de Tween-40 foram dissolvidos em 20 mL de clorofórmio, a solução mãe distribuída em alíquotas de 1 mL e o clorofórmio evaporado em evaporador rotativo (IKA® RV-USA) a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. A solução mãe foi ressuspensa em 25 mL de água mili-Q a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a medição da capacidade antioxidante, 50 μL de amostra foi adicionada juntamente com 250 μL de reagente em microplaca de 96 poços. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras de absorbância (470 nm) feitas em leitor de microplacas Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA) foram conduzidas até que o β -caroteno fosse descolorido (cerca de 2 h). A atividade antioxidante (AA) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$AA = (RD_{\text{Controle}} - RD_{\text{Amostra}}) / RD_{\text{Controle}} * 100$$

$RD_{\text{Controle}} [= \ln (a / b) / 120]$ o controle é a porcentagem de branqueamento do β -caroteno sem a presença do antioxidante. Onde: \ln é o logaritmo natural; a = absorvância no tempo 0; b = absorvância depois de 120 minutos. $RD_{\text{Amostra}} [= \ln (a / b) / 120]$ a porcentagem de branqueamento do β -caroteno com a presença do antioxidante (amostra).

Determinação de DPPH

A atividade antioxidante foi determinada em microplaca de 96 poços, de acordo com Bobo-García et al. (2015). Para tanto, 20 μL da amostra diluída foram adicionados a 180 μL de solução de DPPH (150 $\mu\text{M L}^{-1}$) em metanol-água (80:20, v / v) e agitada durante 60 segundos numa microplaca de 96 poços. Depois de 40min, no escuro, e, a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 515 nm no leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O Trolox foi utilizado como padrão a 50-500 $\mu\text{M L}^{-1}$ para gerar a curva de calibração.

Determinação do Poder de redução do ferro (FRAP)

O potencial antioxidante total dos extratos foi determinado utilizando a capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) descrita por Tachakittirungrod et al. (2007) e LeBlanc et al. (2009). O reagente FRAP recém preparado: 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPZ) 10 mM em HCl 40 mM, solução de FeCl_3 20 mM e tampão acetato de sódio e ácido acético 0,3 M a pH 3,6 foram juntados (1: 1: 10) partes por volume, respectivamente. Os extratos foram dissolvidos em etanol a uma concentração de 10 mg mL^{-1} uma alíquota de 20 μL do extrato de pólen foi misturado com 180 μL de solução FRAP. A absorção da mistura reacional foi medida a 590nm utilizando o leitor de microplacas. As soluções etanoicas de concentração (50-500mM) de trolox foi utilizada para construção de uma curva de calibração.

Determinação de fenóis totais

Os polifenóis totais foram determinados pelo método Folin-Ciocalteu Singleton et al. (1999), baseado na microplaca de 96 poços descrito por

Bobo-García et al. (2015). Alíquota de 20 µL do extrato de hidroetanoico de pólen foi misturada com 100 µL de Folin-Ciocalteu diluído 1: 4 e agitados durante 60s numa microplaca de 96 poços. A mistura foi deixada em repouso durante 240 s e depois adicionou-se 75 µL de solução de carbonato de sódio (100 g L⁻¹) seguida de agitada contínua por 1 minuto. Após 2 h à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 750 nm utilizando o leitor de microplacas. Foram utilizadas diluições de ácido gálico (10-200 g.L⁻¹) para construção de uma curva padrão.

Determinação de flavonoides totais

A análise foi feita segundo a metodologia proposta por Herald et al. (2012), adicionou-se 100 µL de água destilada, seguido por 10 µL NaNO₂ (50 g L⁻¹) e 25 µL de extrato da amostra ou solução padrão. Após 5 minutos foi adicionado 15 µL de AlCl₃ (100 g L⁻¹) à mistura, posteriormente, após 6 minutos foram adicionados 50 µL de NaOH a (40 g L⁻¹) e 50 µL de água destilada. A placa foi agitada durante 30 segundo no leitor de microplacas antes da medição da absorbância a 515 nm. A quercetina (5-100 g.L⁻¹) foi usada para construção da curva padrão.

Análise de compostos fenólicos por HPLC-PDA

A identificação e quantificação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método anteriormente descrito por Moreira et al. (2017). Os extratos de pólen (20 µL) foram injetados em um sistema de HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20AD, um degaseificador DGU-20AS, um forno de coluna VPN CTO-10AS, um Multímetro automático SIL-20A HT e um detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A (PDA). A separação dos compostos fenólicos foi efetuada utilizando uma coluna *Phenomenex* Gemini C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) a 25 °C e os cromatogramas foram registrados a 280, 320 e 360 nm, dependendo do comprimento de onda máximo do composto fenólico. A fase móvel composta por metanol (solvente A) e água (solvente B) ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Os compostos fenólicos foram analisados utilizando uma eluição em modo gradiente a 1,0 mL/min com o seguinte programa: 0-13 min: 20-26.5%A; 13-18 min: 26.5% A; 18-25 min: 26.5-30% A; 25-50 min: 30-45%A; 50-60 min: 45-50%A; 60-70 min: 50-55% A; 70-90 min: 55-70% A; 90-100 min: 70-

100% A, seguido de 100% A por 5 min e de volta a 20% A em 10 min e 5 min de condicionamento antes da próxima injeção. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada comparando os espectros de absorção de UV e o tempo de retenção de cada composto com os de padrões puros injetados nas mesmas condições. Para a quantificação dos compostos fenólicos foram preparadas diferentes concentrações de cada padrão a partir da solução mãe respectiva e os resultados foram expressos em miligramas de composto por litro (mg L^{-1}).

Biodisponibilidade (Digestão *in vitro*)

A digestão gastrointestinal *in vitro* das amostras consistiu de um procedimento em três etapas, simulando a digestão na boca (digestão oral), estômago (digestão gástrica) e intestino delgado (digestão duodenal) (Yesiltas et al., 2014). O procedimento de preparo de cada solução está descrito na tabela 1.

Tabela 1- Preparação de soluções estoques de fluídos simulado de digestão

Reagentes (Soluções estoque)	SSF (mL)	SGF (mL)	SIF (mL)
KCl (0,5)	7,55	3,45	3,4
KH ₂ PO ₄ (0,5 M)	1,85	0,45	0,4
NaHCO ₃ (1 M)	3,4	6,25	21,25
NaCl (2 M)	-	5,9	4,8
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ (0,15 M)	0,25	0,2	0,55
NH ₄ (CO ₃) ₂ (0,5 M)	0,03	0,25	-
HCl (6 M)	0,045	0,65	0,7

Quantidade de solução estoque adicionada para preparo de 250mL de fluído simulado de digestão. SSF: Fluído simulado salivar; SGF: Fluído gástrico simulado; SIF- Fluído intestinal (duodenal) simulado

A digestão foi iniciada pela introdução de 5 mL de fluído simulado salivar (SSF) contendo 7,5 mg de alfa-amilase e 25 μL de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$ 0,3 M e 1 g de amostra de pólen de abelha com e sem cápsulas. A mistura (pH 7) foi agitada suavemente durante 2 min a 37° C. A seguir, 5 mL de fluído gástrico simulado (SGF), 20 mg de pepsina e 2,5 μL de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$ foram adicionados à fase oral, o pH ajustado para 3 com HCl (6 M), e a mistura incubada a 37 °C em

banho-maria com agitação (80 rpm) por 2h. Após as etapas orais e gástricas, um volume de 2 mL da solução com amostra foi retirado para análise posterior. Para simular a digestão intestinal, 10 mL de fluido intestinal (duodenal) simulado (SIF) com 37,5 mg de pancreatina e 40 mg de sais biliares foi então adicionado a fase gástrica, o pH ajustado para 7 com NaOH (1 M), e a mistura incubada nas condições anterior, durante 2 h a uma velocidade de 80 rpm. Finalmente, as misturas dos simulado gastrointestinal foram recuperadas e congeladas a -24 °C até a análise. As amostras foram centrifugadas e filtradas antes de cada análise (Ydjedd et al., 2017).

Análises estatísticas e delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (7X3), para o ensaio de digestão *in vitro*, contendo sete tratamentos (métodos de conservação do pólen) e três fases da digestão (oral, gástrica e duodenal) com 3 repetições. Para avaliar o efeito dos métodos de conservação no tempo de armazenamento, foi utilizado o esquema fatorial 3X3 fator 1 com 3 níveis (métodos de conservação: liofilizado, seco e *in natura*). O fator 2, compostos por 3 níveis (Tempo de armazenamento 0, 6 e 12 meses), com três repetições. Foi feito um terceiro delineamento 7x2 para avaliar todos os tratamentos aos 6 e 12 meses de armazenamento. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e a diferença entre os tratamentos avaliada pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey ou Scott-Knott ($p < 0,05$), levando em consideração as pressuposições dos testes. Todas as análises foram realizadas empregando-se o software R versão 3.0.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biodisponibilidade (digestão *in vitro*)

Fenóis e flavonoides totais

Na Tabela 5. São apresentados os resultados obtidos para o teor de fenóis e flavonoides totais para as amostras de pólen de *A. mellifera* e *T.*

spinipes, submetidos a diferentes métodos de conservação, após a simulação das digestões oral, gástrica e duodenal.

Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para fenóis totais e flavonoides totais entre os tratamentos nas três fases da digestão simulada, que foi significativamente diferente entre si ($p < 0,05$). As amostras encapsuladas (liofilizado em capsula de gelatina, liofilizado em DRcaps e seco) não diferiram entre si na fase oral com valores entre (0,11 a 0,15 mg GAE.g) para *A. mellifera* e (0,12 a 0,16 mg GAE.g) para *T. spinipes*, sendo os menores valores encontrados para a digestão simulada *in vitro*. No entanto, não foi detectado flavonoides totais para este grupo de amostra. A amostra Liof-Dr foi a que obteve menor valor de fenóis e flavonoides totais na fase gástrica da digestão do pólen para ambas as espécies.

O tipo de cápsula usada para o armazenamento do pólen influenciou na liberação dos compostos fenólico. A Drcaps é uma cápsula que ajuda a proteger as substâncias que são sensíveis ao ácido do estômago, visando a liberação a longo prazo e proteção da degradação estomacal (Drcaps, 2018). Considerando que os fenóis são instáveis em várias condições, como para presença de enzimas oxidativas, em condições de alta temperatura, pH, umidade, presença de luz e oxigênio (Fang & Bhandari, 2011), o uso destas cápsulas pode ser uma alternativa interessante para proteção destes compostos.

Os maiores valores de fenóis totais foram encontrados na fase duodenal da digestão 10,92 mg.GAE.g⁻¹ para a amostra *in natura* de *A. mellifera* e 9,60 mg.GAE.g⁻¹ na Seco-GI de *T. spinipes*. Todas as amostras apresentaram resultados crescentes à medida que evoluiu a digestão simulada, com valores menores na fase oral e maiores na duodenal. Resultados oposto a estes foram apresentados por Ozkan et al. (2017) e Yesiltas et al. (2014) que relataram decréscimo dos fenóis e flavonoides totais após as etapas da digestão de extratos de pólen apícola da Turquia, Argentina e Espanha. Segundo Tarko, Duda-Chodak & Zajac (2013), estima-se que 48% dos polifenóis são digeridos no intestino delgado e 42% no intestino grosso e apenas 10% não são digeridos, permanecendo intactos dentro da matriz de alimentos.

Durante as três fases da digestão simulada, o padrão de liberação de flavonoides totais foi semelhante aos dos fenóis totais para as duas espécies.

Os resultados também mostraram que diferentes métodos de conservação podem causar uma liberação diferente dos compostos fenólicos.

Atividade antioxidante

Os resultados obtidos com a atividade antioxidante estão mostrados na Tabela 5. A comparação dos diferentes métodos de conservação do pólen de *A. mellifera* e *T. spinipes* durante a digestão simulada *in vitro* mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,05$) revelando diferenças entre os métodos de conservação.

Os resultados do teste FRAP demonstraram uma maior atividade antioxidante ($p < 0,05$) nas amostras digeridas na etapa duodenal, exceto para as amostras (liofilizadas e *in natura*) de *A. mellifera* e (Liofilizadas, seco e *in natura*) de *T. spinipes*, ou seja, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) na fase gástrica e duodenal. Para todas as amostras, os valores mais baixos ($p > 0,05$) foram obtidos após a fase oral. Após a fase gástrica, os melhores resultados ($p < 0,05$) foram obtidos para as amostras não encapsuladas, ou seja, as amostras em cápsulas mostraram os valores mais baixos ($p < 0,05$) para a atividade antioxidante. Para a fase intestinal, os melhores resultados foram obtidos para as amostras encapsuladas para *T. spinipes* e secas e *in natura* para *A. mellifera*.

Foi observado uma constância na atividade antioxidante nas amostras (liofilizada, seca e *in natura*) pelo método do FRAP para as duas espécies. Isso se deve ao fato da reação do FRAP ocorrer em pH ácido, e como essas amostras não tinha proteção, toda reação ocorreu na fase gástrica.

Em relação ao DPPH, a atividade antioxidante registrada foi ligeiramente diferente ($p < 0,05$) dos resultados da atividade antioxidante através do poder redutor do ferro (FRAP). Os resultados deste estudo (Tabela 5) mostraram que o pólen digerido na fase oral apresentaram valores de DPPH menores ($p < 0,05$) do que o pólen nas fases gástrica e duodenal para as amostras de polens de ambas as espécies. Os maiores valores de atividade antioxidante após a fase gástrica foram aqueles das amostras secas e *in natura* para *A. mellifera* e das amostras Seco-GI e *in natura* de *T. spinipes*.

Sabe-se que a neutralização dos radicais é dependente do pH. Assim, com o aumento do pH, a capacidade de neutralização também aumenta devido

à desprotonação da hidroxila no anel aromático dos compostos fenólicos, o que facilita a doação de hidrogênio e / ou elétrons (Tagliacruzchi et al., 2012).

Embora os ensaios *in vitro* não forneçam uma estimativa precisa das atividades biológicas *in vivo*, esses ensaios são importantes para rastreios preliminar dessa atividade em produtos naturais.

Armazenamento

Fenóis e Flavonoides totais

Os resultados obtidos para o teor de fenóis e flavonoides totais para os pólenes de *A. mellifera* e *T. spinipes* estão expostos nas Tabelas 1 a 4. A comparação dos diferentes métodos de conservação do pólen durante o armazenamento foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) revelando diferenças entre os métodos de conservação durante o armazenamento.

O maior teor de fenóis totais em amostras sem encapsulação foi observado para a amostra *in natura* (20,92 mg GAE g⁻¹) aos 12 meses de armazenamento e o menor valor (5,32 mg GAE g⁻¹) foi para amostra liofilizada também aos 12 meses. O conteúdo de flavonoides totais nas amostras (Liof, seca e *in natura*) de *A. mellifera* apresentou comportamento semelhante ao de fenóis totais. As amostras (Liof-GI, Liof-Dr, Seco-GI e Seco-Dr) encapsuladas desse pólen demonstraram um maior valor de fenóis e flavonoides totais aos seis meses de armazenamento, observando-se uma queda significativa no conteúdo de fenóis totais aos doze meses de armazenamento.

Quanto ao pólen de *T. spinipes*, foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos de conservação e tempo de armazenamentos para o pólen de *T. spinipes* (Tabelas 2 e 4). A amostra liofilizada não diferiu da amostra *in natura* para o conteúdo de fenóis totais. Entretanto, as demais amostras diferiram entre si no armazenamento. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o teor de flavonoides totais, considerando as amostras encapsuladas, tanto para o pólen seco como para o liofilizado.

Analisando pólen apícola seco, *in natura* e liofilizado, Cinkmanis, Dimins & Mikelsone (2017) observaram comportamento semelhante no conteúdo de fenóis e flavonoides totais em relação ao processamento do pólen. Em estudo com pólen seco e liofilizado, Dias et al. (2017) encontraram valores semelhantes aos encontrados neste estudo para flavonoides totais.

De acordo com os dados apresentados nas tabelas 1 e 2, houve diferença significativa entre o armazenamento para as variáveis fenóis e flavonoides totais. No entanto, não foi observado mudanças impactantes na composição destas substâncias.

Atividade antioxidante

Neste estudo, as propriedades antioxidantes foram analisadas por meio de ensaios químicos: atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor FRAP e bioquímico baseado na inibição da peroxidação lipídica no sistema β -caroteno linoleato.

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas de conservação empregadas no pólen de *A. mellifera* para todos os métodos de avaliação de atividade antioxidante (Figuras 1 e 3). Quanto ao tempo de armazenamento a amostra seca não apresentou diferença significativa entre os tempos 0 e 6 meses de avaliação para o método DPPH. As amostras (liof, liof-GI e Liof-Dr) apresentaram aumento significativo da atividade antioxidante durante o armazenamento, enquanto as demais amostras tiveram uma ligeira queda de atividade antioxidante para o método DPPH. O pólen de *T. spinipes* apresentou comportamento semelhante ao pólen de *A. mellifera* na variação da atividade antioxidante pelo método DPPH. Os ensaios com resultados positivos quanto a capacidade antioxidante para o método de DPPH sugerem que as amostras são eliminadoras de radicais livres.

A atividade antioxidante pelo método FRAP nas amostras liofilizada, seca e *in natura* teve um aumento aos seis meses de armazenamento, voltando a decrescer aos 12 meses de avaliação. As amostras encapsuladas tiveram maior média no sexto mês, decrescendo aos 12 meses de armazenamento, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos aos seis meses de armazenamento. A maior atividade antioxidante para o pólen de *A. mellifera*, foi observada na amostra *in natura* em todos os tempos de avaliação.

Nos métodos DPPH e FRAP foi observado uma maior atividade antioxidante nas amostras secas e *in natura* nos pólenes das duas espécies. De acordo com Lin et al. (2016) os produtos oriundos da reação de *Maillard* (escurecimento não enzimático) aumentam com a temperatura, gerando novas substâncias que podem contribuir para melhorar a atividade antioxidante.

Essas amostras apresentaram coloração mais escuras no decorrer do armazenamento.

No ensaio de inibição da peroxidação lipídica ocorreu decréscimo da inibição com o tempo de armazenamento para todas as técnicas de conservação do pólen de *A. mellifera*. O pólen de *T. spinipes* apresentou maior poder de inibição da peroxidação, sendo observado uma queda acentuada até o sexto mês de armazenamento seguida de estabilidade.

Diferentes antioxidantes respondem de forma distinta em vários métodos de medição que envolve condições de reações e mecanismos de ação específicos. Portanto, os resultados das determinações da atividade antioxidante são dependentes da metodologia utilizada. Assim, O uso de diferentes métodos analíticos com variações em seus iniciadores e metas de oxidação é importante para entender a capacidade biológica de um antioxidante e obter dados precisos (Aličić et al., 2014).

Composto Fenólicos

Os seguintes compostos fenólicos foram quantificados e identificados no pólen de *T. spinipes*: ácido gálico, ácido protocatequico, catequina, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido vanílico, rutina, myrecitina, kaempferol-3-o-rutinoside, quercetina, kaempferol.

No pólen de *A. mellifera* foram quantificados um menor número de compostos fenólicos são eles: catequina, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido vanílico, rutina mirecitina, kaempferol-3-o-rutinoside, quercetina, kaempferol.

Nas tabelas (3 e 4) estão apresentados os compostos que foram comuns a todas as amostras em todos os tempos de avaliações. Estes compostos fenólicos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as técnicas de conservação aplicadas ao pólen de *A. mellifera* e *T. spinipes*.

A composição em compostos fenólicos como ácido gálico, mirecetina, quercetina kaempferol, e kaempferol -3-o-rutinoside foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) para os métodos de conservação e tempo de armazenamento para o pólen de *A. mellifera*. Os compostos mais abundantes no pólen foram o Kaempferol 3.O.rutinoside para as amostras (Liof, Liof-GI e Liof-Dr) e a quercetina para as amostras (Seco-GI e seco). Segundo Sun et al. (2017) a quercetina é um flavonoide que exhibe altas atividades antioxidantes.

Entre os compostos quantificados para *T. spinipes* estão a Cloridzina, myrecitina, kaempferol-3-o-rutinoside, kaempferol 3,O,glucoside Quercetina e kaempferol. As maiores quantificações foram para os compostos kaempferol 3.O.rutinoside e myrecitina respectivamente, para a amostras seca-Dr caps. O Kaempferol possui propriedades espasmolíticas, anti-inflamatórias, antialérgicas, antioxidantes e antifúngicas (Palacz-Wrobel et al., 2017).

Os compostos fenólicos encontrados nesta investigação assemelham-se àqueles encontrados em outros estudos realizados no Brasil por Silva et al. (2009); Freire et al. (2012), Carpes et al. (2013) e Florio Almeida et al. (2017).

Tabela 1- Conteúdo de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante e composição fenólica de amostras de pólen de *Apis mellifera* liofilizado, seco e *in natura* durante o armazenamento.

Variáveis	Tempo (meses)	Liof.	Seco	<i>In natura</i>
FENOIS (mg GAE g ⁻¹)	0	9,59bC	13,83aB	20,44aA
	6	11,87aA	11,54bA	11,15bA
	12	5,32cC	14,83aB	20,92aA
Flavonoides (mg QE g ⁻¹)	0	3,82aA	3,49bB	3,53cAB
	6	3,31bC	3,78aB	5,71aA
	12	2,95cC	3,41abB	5,00bA
DPPH (μmol TE g ⁻¹)	0	10,87aB	11,21bB	15,41bA
	6	5,62bC	12,30bB	35,08aB
	12	10,02aC	24,22aB	33,79aA
FRAP (mmol TE g ⁻¹)	0	30,09aB	29,91cB	39,05cA
	6	33,48aC	43,53bB	79,61aA
	12	31,39aC	49,43aB	63,823bA
β-caroteno (%)	0	91,85aA	87,87aA	91,27aA
	6	73,77bA	62,71bC	67,73bB
	12	50,41cA	42,23cB	51,97cA

Médias com diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre os tempos. Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, GI: capsula de gelatina.

Tabela 2- Conteúdo de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante e composição fenólica de amostras de pólen de *Trigona spinipes* liofilizado, seco e *in natura* durante armazenamento.

Variáveis	Tempo (meses)	Liofilizado	Seco	<i>In natura</i>
Fenóis (mg GAE g ⁻¹)	0	12,71aB	14,05aA	14,17aA
	6	11,15cB	11,81cA	11,12cB
	12	12,09bB	12,98bA	12,17bB
Flavonoides (mg QE g ⁻¹)	0	4,62	4,72	4,82
	6	4,30	4,61	4,46
	12	4,59	4,56	4,64
DPPH (μM TE g ⁻¹)	0	17,68bB	28,72A	26,35bA
	6	29,70aAB	27,65B	31,73aA
	12	31,46aA	27,18B	28,56abB
FRAP (mM TE g ⁻¹)	0	40,01bB	50,20bA	47,25bA
	6	61,33a	62,63a	61,67a
	12	60,78aA	53,01bB	62,18aA
β-caroteno (%)	0	96,40a	95,62a	96,70a
	6	61,41bB	88,19bA	87,83bA
	12	61,31bB	75,43cA	74,43cA

Médias com diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias com diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre os tempos. Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, GI: capsula de gelatina.

Tabela-3 Teores de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante e quantificação de compostos fenólicos em pólen de *A. mellifera* aos 6 e 12 meses de armazenamento.

Variáveis	Tempo (meses)	<i>Apis mellifera</i>						
		Liof-GI	Liof-Dr	Liof	Seco-GI	Seco-Dr	Seco	<i>In natura</i>
Fenóis (mg GAE g ⁻¹)	6	14,16b	10,32e	11,87c	25,46a	11,79c	11,54c	11,15d
	12	8,57e	5,83f	5,32g	10,68c	9,35d	14,83b	20,92a
Flavonoides (mg GAE g ⁻¹)	6	3,43c	3,35c	3,31c	3,79b	3,54c	3,78b	5,71a
	12	3,22c	2,91d	2,95d	3,16c	3,42b	3,49b	5,00a
DPPH (µM TE g ⁻¹)	6	10,87c	9,15d	5,62e	13,09b	9,46d	12,30b	35,08a
	12	16,32c	12,64d	10,02e	15,97c	12,12d	24,22b	33,79a
FRAP (mM TE g ⁻¹)	6	39,58d	39,71d	33,48e	46,82b	42,53c	43,53c	79,61a
	12	36,25d	31,49e	31,39e	41,97c	39,47c	49,43b	63,82a
Caroteno (%)	6	81,18a	82,43a	73,77b	73,86b	68,52c	62,71d	67,73c
	12	47,37a	35,98b	50,41a	52,97a	39,01b	42,23b	51,97a
Ácido gálico (mg Kg ⁻¹)	6	12,71c	13,02c	6,71d	26,99a	26,65a	26,10a	21,08b
	12	5,44d	0,00e	0,00a	24,32b	21,98c	22,85c	65,26a
Mirecetina (mg Kg ⁻¹)	6	24,34e	26,30a	25,16d	23,43f	25,41c	25,85b	19,34g
	12	25,64d	25,13e	27,33c	28,25b	23,82f	29,06a	22,80g
Quercetina (mg Kg ⁻¹)	6	65,09d	70,29c	62,46e	79,65a	31,93f	74,02b	22,24g
	12	62,09d	61,44d	73,89c	86,59a	59,52e	84,55b	26,13f
Kaempferol 3.O.rutinoside (mg Kg ⁻¹)	6	118,87c	129,88b	139,09a	104,18d	104,74d	107,93d	0,00e
	12	133,74b	122,16c	144,07a	112,39e	108,57f	115,93d	0,00g
Kaempferol (mg Kg ⁻¹)	6	8,46f	8,43f	14,71b	15,20a	9,17e	13,89c	11,51d
	12	11,49c	11,43c	9,73e	14,70a	11,198d	14,33b	9,61e

Médias com diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de (P < 0,05) entre os métodos de conservação do pólen. Houve diferença significativas pelo teste de Tukey (P < 0,05) entre os tempos. Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, GI: cápsula de gelatina.

Tabela-4 Tabela-3 Teores de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante e quantificação de compostos fenólicos em pólen de *T. spinipes* aos 6 e 12 meses de armazenamento.

Variáveis	Tempo (meses)	<i>Trigona spinipes</i>						
		Liof-GI	Liof-Dr	Liof	Seco-GI	Seco-Dr	Seco	<i>In natura</i>
Fenóis (mg GAE g ⁻¹)	6	11,79b	11,54b	11,15c	10,29d	12,17a	11,81b	11,12c
	12	11,68d	13,30a	12,09c	10,66e	10,09f	12,98b	12,17c
Flavonoides (mg QE g ⁻¹)	6	4,41c	4,59a	4,30d	4,27d	4,48b	4,61a	4,46b
	12	4,53b	4,92a	4,59b	4,33c	4,26c	4,56b	4,64b
DPPH (μM TE g ⁻¹)	6	26,28c	26,40c	29,70b	29,30b	33,32a	27,65c	31,73a
	12	27,32b	32,80a	31,46a	27,34b	26,28b	27,18b	28,56b
FRAP (mM TE g ⁻¹)	6	58,29	61,33	61,33	59,99	63,66	62,63	61,67
	12	57,01b	64,77a	60,78a	57,24b	54,13c	53,01c	62,18a
Caroteno (%)	6	67,24b	64,26c	61,41c	66,78b	70,65b	88,19a	87,83a
	12	77,24a	72,38a	61,31b	74,23a	64,29b	75,43a	74,43a
Cloridzina (mg Kg ⁻¹)	6	16,69c	16,86c	16,98c	18,20c	0,00a	18,60	13,25d
	12	21,60c	9,27f	18,10d	22,01b	23,74a	23,92a	16,85e
Myrecitina (mg Kg ⁻¹)	6	19,94a	19,11b	19,15b	18,96b	19,99a	19,72a	18,90b
	12	21,26d	21,98c	20,09e	23,28a	22,60b	20,12e	20,34e
kaempferol 3,O,glucoside (mg Kg ⁻¹)	6	19,87b	18,09c	18,05c	17,70d	20,22a	19,71b	17,45d
	12	18,20d	18,82c	15,66e	18,26d	19,60b	20,16a	15,47e
Kaempferol 3,O,rutinoside (mg Kg ⁻¹)	6	94,40c	90,58c	99,96b	99,79b	107,87a	105,18a	71,06d
	12	97,57b	97,90 b	80,66b	97,21b	100,14a	99,85b	44,68c
Naringenina (mg Kg ⁻¹)	6	13,34a	12,27b	11,62d	11,82c	12,28b	10,97e	11,55d
	12	12,11b	12,20b	10,33d	11,19c	12,46a	12,63a	12,29b
Quercetina (mg Kg ⁻¹)	6	13,16b	12,29d	12,35d	12,24d	13,47a	12,53d	12,83c
	12	14,83d	16,59a	11,13f	15,60c	16,60a	16,163b	14,42e
Kaempferol (mg Kg ⁻¹)	6	17,48a	18,11a	17,85a	17,51a	17,55a	15,806b	17,77a
	12	18,49a	17,98a	15,61b	17,63a	18,03a	17,82a	18,21a

Médias com diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre os métodos de conservação do pólen, Houve diferença significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre os tempos. Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, GI: capsula de gelatina.

Tabela-5 Biodisponibilidade de fenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de pólen de *A. mellifera* e de *T. spinipes*, após a digestão simulada *in vitro*.

	Digestão	Liof-GI	Liof-Dr	Liof	Seco-GI	Seco-Dr	Seco	<i>In natura</i>
Fenóis (mg GAE g ⁻¹)	Oral	0,13 ± 0,01cC	0,11 ± 0,00cC	1,67 ± 0,14cA	0,15 ± 0,00cC	0,15 ± 0,01cC	1,70 ± 0,04cA	0,95 ± 0,05cB
	Gástrico	4,66 ± 0,14bC	1,68 ± 0,02bE	4,58 ± 0,19bC	4,02 ± 0,03bD	3,95 ± 0,20bD	6,07 ± 0,04bB	6,64 ± 0,01bA
	Duodenal	9,07 ± 0,22aC	8,44 ± 0,09aD	8,00 ± 0,06aE	10,25 ± 0,18aB	10,06 ± 0,15aB	10,09 ± 0,08aB	10,92 ± 0,10aA
Flavonoides (mg GAE g ⁻¹)	Oral	0,01 ± 0,00cD	0,01 ± 0,00cD	0,73 ± 0,03cA	0,00 ± 0,00cD	0,00 ± 0,00cD	0,49 ± 0,01cB	0,19 ± 0,00cC
	Gástrico	1,55 ± 0,02bB	0,21 ± 0,00bG	1,28 ± 0,03bC	0,65 ± 0,00bD	0,49 ± 0,00bF	1,60 ± 0,00bA	0,60 ± 0,00bE
	Duodenal	2,05 ± 0,06aC	1,64 ± 0,10aD	3,51 ± 0,07aA	1,66 ± 0,05aD	1,96 ± 0,11aC	2,38 ± 0,01aB	3,06 ± 0,15aA
FRAP (mM TE g ⁻¹)	Oral	0,03 ± 0,01cC	0,02 ± 0,00cC	3,71 ± 0,16bA	0,04 ± 0,00aC	0,03 ± 0,00aC	3,97 ± 0,19aA	2,69 ± 0,05cB
	Gástrico	6,10 ± 0,03bE	4,39 ± 0,11bF	12,11 ± 0,09aC	10,22 ± 0,10bD	9,29 ± 0,18bD	15,19 ± 0,05bB	17,20 ± 0,21aA
	Duodenal	10,62 ± 0,17aE	11,66 ± 0,87aD	12,13 ± 0,18aD	12,41 ± 0,28cD	15,07 ± 0,50cC	18,60 ± 0,23cB	16,94 ± 0,19aA
DPPH (µM TE g ⁻¹)	Oral	0,15 ± 0,03cD	0,12 ± 0,02cD	0,99 ± 0,01cC	0,07 ± 0,01cD	0,14 ± 0,03cD	1,67 ± 0,12cB	1,87 ± 0,07cA
	Gástrico	4,42 ± 0,11bB	1,17 ± 0,02bE	4,26 ± 0,12bB	3,70 ± 0,10bC	2,72 ± 0,10bD	4,91 ± 0,04bA	5,05 ± 0,02bA
	Duodenal	10,83 ± 0,38aD	8,18 ± 0,08aE	6,68 ± 0,12aF	10,95 ± 0,59aD	12,14 ± 0,31aC	13,21 ± 0,35aB	15,76 ± 0,19aA
<i>Trigona spinipes</i>								
Fenóis (mg GAE g ⁻¹)	Oral	0,12 ± 0,00cC	0,12 ± 0,00cC	3,31 ± 0,19cA	0,16 ± 0,00cC	0,13 ± 0,00cC	3,44 ± 0,11cA	2,31 ± 0,04cB
	Gástrico	4,96 ± 0,18bB	1,67 ± 0,07bE	5,75 ± 0,12bA	4,46 ± 0,09bC	4,26 ± 0,25bC	5,53 ± 0,12bA	3,59 ± 0,27bD
	Duodenal	9,38 ± 0,19 aB	9,15 ± 0,42aB	8,81 ± 0,15aC	9,60 ± 0,12aA	7,80 ± 0,06aD	8,71 ± 0,05aC	9,10 ± 0,18aB
Flavonoides (mg GAE g ⁻¹)	Oral	0,01 ± 0,00cD	0,01 ± 0,00cD	1,65 ± 0,00bA	0,00 ± 0,00cD	0,00 ± 0,00cD	1,28 ± 0,44bB	0,91 ± 0,18cC
	Gástrico	1,97 ± 0,00bA	0,26 ± 0,00bG	1,52 ± 0,02cB	1,25 ± 0,03bC	0,76 ± 0,02bF	1,11 ± 0,01cD	1,02 ± 0,02bE
	Duodenal	3,02 ± 0,02aB	3,17 ± 0,00aA	2,85 ± 0,08aC	2,83 ± 0,02aC	3,11 ± 0,09aB	2,87 ± 0,02aC	3,22 ± 0,04aA
FRAP (mM TE g ⁻¹)	Oral	0,02 ± 0,00cC	0,02 ± 0,00cC	11,04 ± 0,35bA	0,04 ± 0,00bC	0,02 ± 0,00cC	9,29 ± 0,54bB	9,19 ± 0,26cB
	Gástrico	14,64 ± 0,38bC	8,36 ± 0,28bE	21,21 ± 0,67aA	11,84 ± 0,33bB	13,38 ± 0,34bD	20,51 ± 0,67aA	17,20 ± 0,21aB
	Duodenal	25,71 ± 0,18aA	23,36 ± 0,32aB	21,26 ± 0,01aD	25,39 ± 0,06aA	22,42 ± 0,59aC	21,18 ± 0,16aD	16,94 ± 0,19aE
DPPH	Oral	0,08 ± 0,00cC	0,03 ± 0,00cC	5,61 ± 0,16cA	0,03 ± 0,01cC	0,04 ± 0,00cC	5,80 ± 0,06cA	5,36 ± 0,06cB

($\mu\text{M TE g}^{-1}$)	Gástrico	$9,95 \pm 0,05\text{bB}$	$3,53 \pm 0,10\text{bF}$	$9,57 \pm 0,11\text{bC}$	$10,63 \pm 0,14\text{bA}$	$9,06 \pm 0,17\text{bD}$	$10,36 \pm 0,46\text{bA}$	$7,55 \pm 0,30\text{bE}$
	Duodenal	$15,25 \pm 0,06\text{aD}$	$15,83 \pm 0,56\text{aC}$	$16,39 \pm 0,18\text{aB}$	$17,88 \pm 0,0\text{aA}$	$15,03 \pm 0,46\text{aC}$	$15,58 \pm 0,08\text{aC}$	$17,64 \pm 0,14\text{aA}$

Os valores são expressos como média \pm desvio padrão, Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre os métodos de conservação do pólen, Diferentes letras minúsculas na mesma coluna mostram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre as fases digestivas de cada amostra. Liof.: liofilizado, DR: DRcaps, GI: capsula de gelatina.

CONCLUSÃO

As diferenças estatísticas observadas entre os métodos de conservação aplicados ao pólen, não implicaram em imparidades quantitativas e qualitativas que justificasse a escolha de um método.

O uso das cápsulas não influencia na qualidade do pólen, porém seu uso pode ser sugerido para liberação controlada de compostos de interesse, visando o aumento da sua biodisponibilidade.

O escurecimento não enzimático (reação de *Maillard*), decorrente do processo de secagem em estufa pode ter contribuído para o aumento da atividade antioxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aličić, D., Šubarić, D., Jašić, M., Pašalić, H., & Ačkar, Đ. (2014). Antioxidant properties of pollen. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 3(1), 6-12.

Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2018). extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 110-124.

Arruda, V. A. S., Pereira, A. A. S., Estevinho, L. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2013). Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. *Food and chemical toxicology*, 51, 143-148.

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204-209.

Campos, M. G., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and

standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154-161.

Carpes, S. T., De Alencar, S. M., Cabral, I. S. R., Oldoni, T. L. C., Mourao, G. B., Haminiuk, C. W. I., ... & Masson, M. L. (2013). Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *CyTA-Journal of Food*, 11(2), 150-161.

Canale, A., Benelli, G., Castagna, A., Sgherri, C., Poli, P., Serra, A., ... & Nicolella, C. (2016). Microwave-assisted drying for the conservation of honeybee pollen. *Materials*, 9(5), 363.

Conte, G., Benelli, G., Serra, A., Signorini, F., Bientinesi, M., Nicolella, C., ... & Canale, A. (2017). Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 55, 12-19.

Cinkmanis, I., Dimins, F., & Mikelsons, V. (2017), Influence of lyophilization and convective type drying on antioxidant properties, total phenols and flavonoids in pollens, In *11th Baltic Conference on Food Science and Technology" Food science and technology in a changing world" FOODBALT 2017, Jelgava, Latvia, 27-28 April 2017* (pp, 201-203), Latvia University of Agriculture,

Florio Almeida, J., dos Reis, A. S., Heldt, L. F. S., Pereira, D., Bianchin, M., de Moura, C., ... & Carpes, S. T. (2017). Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 299-305.

De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., Sattler, J. A. G., Souza, B. R., da Silva Freitas, A., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 808-815.

Dias, L. G., Tolentino, G., Pascoal, A., & Estevinho, L. M. (2016). Effect of processing conditions on the bioactive compounds and biological properties of bee pollen. *Journal of Apicultural Research*, 55(5), 357-365.

Dórea, M. D. C., Novais, J. S. D., & Santos, F. D. A. R. D. (2010). Botanical profile of bee pollen from the southern coastal region of Bahia, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 24(3), 862-867.

DRcaps® capsules overview brochure, https://s3.amazonaws.com/cpsl-web/kc/library/c1a-32029_DRCaps-A4_FIN.PDF (05 fev 2018),

Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3), 1139-1147.

Freire, K. R., Lins, A., Dórea, M. C., Santos, F. A., Camara, C. A., & Silva, T. (2012). Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Molecules*, 17(2), 1652-1664.

Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2326-2331.

LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., & Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food chemistry*, 115(4), 1299-1305.

Lin, J. T., Liu, S. C., Hu, C. C., Shyu, Y. S., Hsu, C. Y., & Yang, D. J. (2016). Effects of roasting temperature and duration on fatty acid composition, phenolic composition, Maillard reaction degree and antioxidant attribute of almond (*Prunus dulcis*) kernel. *Food chemistry*, 190, 520-528.

Lorenzo, J. M., Sineiro, J., Amado, I. R., & Franco, D. (2014). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat science*, 96(1), 526-534.

Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.

Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1096-1101.

Moreira, M. M., Barroso, M. F., Boeykens, A., Withouck, H., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2017). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 104, 210-220

Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11173-11187.

Ozkan, K., Sagcan, N., Ozulku, G., Sagdic, O., Toker, O. S., & Muz, M. N. (2017). Bioactive and bioaccessibility characteristics of honeybee pollens collected from different regions of Turkey, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-7,

Palacz-Wrobel, M., Borkowska, P., Paul-Samojedny, M., Kowalczyk, M., Fila-Danilow, A., Suchanek-Raif, R., & Kowalski, J. (2017). Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 1205-1212.

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 233-239.

Perfil Sintético. Território de Identidade Piemonte do Paraguaçu. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Governo da Bahia. Salvador, 2015. Disponível em: <http://www.sdr.ba.gov.br/arquivos/File/PerfilPiemontedoParaguacu.pdf> . Acesso em 15 dez. 2017.

Ranieri, A., Benelli, G., Castagna, A., Sgherri, C., Signorini, F., Bientinesi, M., & Canale, A. (2017). Freeze-drying duration influences the amino acid and rutin

content in honeybee-collected chestnut pollen. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Sobczak, A., Stojko, R., & Buszman, E. (2015). Polyphenol content and antioxidant activity of bee pollen extracts from Poland. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 482-490.

Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., de Freitas, A. D. S., Barth, O. M., ... & de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, 77, 82-91.

Serra Bonvehi, J., Soliva Torrentó, M., & Centelles Lorente, E. (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1848-1853.

Silva, T., Camara, C. A., Lins, A., Agra, M. D. F., Silva, E., Reis, I. T., & Freitas, B. M. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(2), 173-178.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299(1), 152-178.

Sun, L., Guo, Y., Zhang, Y., & Zhuang, Y. (2017). Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells, *Frontiers in pharmacology*, 8, 104, Apicultural Research, v, 54, n, 5, p, 482-490, 2015,

Tagliazucchi, D, Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A, (2010), In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols, *Food Chemistry*, 120(2), 599-606,

Tarko, T, Duda-Chodak, A., & Zajac, N, (2013), Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods, A review, *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(2),

Team, R. C. (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>: (acesso em: 20 dez 2017).

Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(3), 708-718.

Yesiltas, B., Capanoglu, E., Firatligil-Durmus, E., Sunay, A, E., Samanci, T., & Boyacioglu, D, (2014), Investigating the in-vitro bioaccessibility of propolis and pollen using a simulated gastrointestinal digestion System, *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 101-108

Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruezo, G., ... & Kati, D. E. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 827-835.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta investigação permitiu elucidar o perfil físico-químico e as propriedades biológicas dos polens de *Apis mellifera* e de *Trigona spinipes* submetidos ao processo de desidratação por liofilização e secagem em estufa e o efeito do armazenamento em cápsulas.

Estudo como este visa a caracterização de novos produtos como é o caso do pólen de *T. spinipes*, assim como avaliar técnicas de conservação que venham agregar valor ao pólen e afirmar a sua qualidade. Estudos mais detalhados da composição nutricional do pólen em diferentes condições de processamento e armazenamento são importantes.

O uso da cápsula pode ser uma alternativa para agregar valor à comercialização e uma forma de melhorar a biodisponibilidade de compostos de interesse por meio de liberação controlada ao longo da digestão.

A pesquisa de produtos oriundos da criação de abelhas permite comprovar a qualidade dos seus produtos e obter ferramentas para melhor explorar esta atividade, possibilitando sua expansão e geração de renda.

ANEXO

Média e desvio padrão do conteúdo de ácidos graxos (g/100g) no pólen de *Apis mellifera* e *trigona spinipes* liofilizado, seco e *in natura* armazenado por 360 dias

Especie	Tempo	Amostra	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1
<i>A. mellifera</i>	0	Liof	0,016±0,00	0,026±0,00	ND	0,060±0,00	0,267±0,01	0,126±0,01	30,411±0,13	0,381±0,00
<i>A. mellifera</i>	0	seco	0,021±0,00	0,032±0,00	ND	0,079±0,02	0,307±0,00	0,135±0,00	33,832±1,35	0,368±0,03
<i>A. mellifera</i>	0	<i>in natura</i>	0,029±0,00	0,401±0,04	ND	0,052±0,01	1,309±0,05	0,098±0,00	47,927±0,63	1,105±0,09
<i>A. mellifera</i>	6	Liof-GI	0,065±0,00	0,141±0,00	ND	0,141±0,00	0,417±0,01	0,147±0,00	32,892±0,17	0,409±0,00
<i>A. mellifera</i>	6	LioF-Dr	0,046±0,00	0,116±0,00	ND	0,130±0,01	0,377±0,00	0,163±0,00	32,635±0,15	0,385±0,00
<i>A. mellifera</i>	6	Liof	0,045±0,00	0,100±0,00	ND	0,111±0,00	0,300±0,00	0,143±0,01	31,046±0,08	0,392±0,02
<i>A. mellifera</i>	6	Seco-GI	0,059±0,00	0,109±0,00	ND	0,224±0,00	0,374±0,01	0,158±0,05	33,752±0,23	0,394±0,00
<i>A. mellifera</i>	6	secoDr	0,047±0,01	0,111±0,00	ND	0,166±0,00	0,332±0,00	0,144±0,01	33,037±0,08	0,380±0,01
<i>A. mellifera</i>	6	seco	0,042±0,00	0,109±0,01	ND	0,192±0,01	0,331±0,00	0,174±0,00	32,421±0,02	0,418±0,01
<i>A. mellifera</i>	6	fresco	ND	0,104±0,01	ND	ND	0,188±0,01	0,071±0,00	21,347±0,06	0,207±0,01
<i>A. mellifera</i>	12	Liof-GI	0,080±0,01	0,111±0,00	0,010±0,00	0,097±0,00	0,502±0,05	0,140±0,02	35,157±0,23	0,436±0,03
<i>A. mellifera</i>	12	LioF-Dr	0,088±0,00	0,122±0,00	0,013±0,00	0,149±0,00	0,503±0,02	0,204±0,00	35,800±0,01	0,500±0,00
<i>A. mellifera</i>	12	Liof	0,031±0,00	0,046±0,00	ND	0,094±0,00	0,356±0,01	0,164±0,00	32,356±0,55	0,386±0,00
<i>A. mellifera</i>	12	Seco-GI	0,072±0,01	0,099±0,00	0,019±0,00	0,220±0,02	0,469±0,00	0,175±0,01	35,647±0,41	0,441±0,03
<i>A. mellifera</i>	12	secoDr	0,083±0,01	0,108±0,01	0,020±0,00	0,188±0,02	0,426±0,02	0,177±0,01	35,677±0,10	0,384±0,00
<i>A. mellifera</i>	12	seco	0,061±0,00	0,077±0,01	0,014±0,00	0,170±0,03	0,427±0,01	0,175±0,00	34,740±0,24	0,394±0,00
<i>A. mellifera</i>	12	fresco	ND	0,215±0,08	ND	0,200±0,00	0,611±0,10	ND	28,070±0,77	ND
<i>T. spinipes</i>	0	Liof	ND	ND	0,021±0,00	0,099±0,02	0,246±0,01	0,115±0,01	29,079±0,10	0,811±0,00
<i>T. spinipes</i>	0	seco	ND	ND	0,019±0,00	0,052±0,00	0,221±0,00	0,087±0,00	29,436±0,33	0,710±0,00
<i>T. spinipes</i>	0	<i>in natura</i>	ND	ND	0,013±0,00	0,041±0,00	0,190±0,01	0,093±0,01	29,980±0,64	0,55±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	Liof-GI	ND	0,070±0,00	0,023±0,00	0,109±0,00	0,215±0,01	0,092±0,01	30,121±0,00	0,792±0,01
<i>T. spinipes</i>	6	LioF-Dr	ND	0,075±0,00	0,025±0,00	0,080±0,00	0,223±0,00	0,079±0,00	30,223±0,11	0,767±0,02
<i>T. spinipes</i>	6	Liof	ND	0,065±0,00	0,022±0,00	0,058±0,02	0,223±0,00	0,107±0,00	30,079±0,06	0,842±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	Seco-GI	ND	0,072±0,00	0,021±0,00	0,100±0,01	0,216±0,01	0,093±0,01	29,932±0,08	0,747±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	secoDr	ND	0,077±0,01	0,022±0,00	0,102±0,02	0,242±0,01	0,126±0,00	29,781±0,01	0,745±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	seco	ND	0,068±0,00	0,026±0,00	0,109±0,00	0,232±0,00	0,117±0,00	30,060±0,03	0,760±0,00

<i>T. spinipes</i>	6	fresco	ND	0,104±0,01	0,018±0,00	0,112±0,01	0,213±0,00	0,092±0,00	29,823±0,07	0,617±0,02
<i>T. spinipes</i>	12	Liof-GI	ND	0,022±0,00	0,042±0,00	0,079±0,00	0,317±0,00	0,144±0,01	31,661±0,64	0,812±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	LioF-Dr	ND	0,024±0,00	0,038±0,00	0,055±0,01	0,307±0,00	0,100±0,00	30,707±0,20	0,782±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	Liof	ND	0,036±0,01	0,052±0,01	0,083±0,01	0,333±0,00	0,140±0,00	30,501±0,46	0,932±0,01
<i>T. spinipes</i>	12	Seco-GI	ND	0,027±0,00	0,049±0,00	0,092±0,00	0,315±0,00	0,118±0,01	31,042±0,06	0,827±0,06
<i>T. spinipes</i>	12	secoDr	ND	0,024±0,00	0,048±0,00	0,106±0,00	0,317±0,00	0,121±0,00	30,846±0,04	0,861±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	seco	ND	0,022±0,00	0,034±0,00	0,083±0,00	0,324±0,01	0,104±0,00	30,808±0,28	0,856±0,01
<i>T. spinipes</i>	12	fresco	ND	0,02±0,00	0,038±0,00	0,089±0,00	0,289±0,01	0,100±0,00	30,517±0,10	0,740±0,02

<i>Especie</i>	Tempo	Amostra	C17:0	C18:0	C18:1n9c+t	C18:2n6c ω-6	C18:3n6	C18:3n3 ω-3	C20:0	C20:1CIS-11
<i>A. mellifera</i>	0	Liof	0,262±0,01	3,005±0,05	6,496±0,01	19,081±0,01	ND	33,164±0,01	1,538±0,02	0,445±0,03
<i>A. mellifera</i>	0	seco	0,320±0,02	3,439±0,01	4,847±2,09	18,531±0,80	ND	31,890±0,87	1,627±0,31	0,372±0,15
<i>A. mellifera</i>	0	<i>in natura</i>	1,520±0,09	2,969±0,01	1,963±0,05	20,606±0,00	ND	13,636±0,12	0,691±0,10	0,239±0,02
<i>A. mellifera</i>	6	Liof-GI	0,265±0,00	2,893±0,02	7,754±0,24	17,841±0,26	0,131±0,01	31,467±0,05	1,196±0,03	0,425±0,03
<i>A. mellifera</i>	6	LioF-Dr	0,276±0,00	3,086±0,00	7,587±0,09	18,216±0,01	0,106±0,01	31,264±0,06	1,303±0,02	0,472±0,01
<i>A. mellifera</i>	6	Liof	0,268±0,00	3,162±0,00	8,062±0,23	18,793±0,09	0,101±0,01	31,209±0,17	1,416±0,01	0,517±0,00
<i>A. mellifera</i>	6	Seco-GI	0,279±0,00	3,578±0,02	7,129±0,01	18,195±0,01	ND	29,437±0,07	1,658±0,02	0,438±0,00
<i>A. mellifera</i>	6	secoDr	0,281±0,00	3,468±0,02	7,166±0,04	18,577±0,00	ND	30,104±0,01	1,650±0,01	0,448±0,01
<i>A. mellifera</i>	6	seco	0,278±0,00	3,532±0,05	7,747±0,25	18,217±0,03	ND	29,602±0,34	1,749±0,00	0,483±0,00
<i>A. mellifera</i>	6	fresco	0,098±0,00	1,766±0,07	1,836±0,12	11,615±0,27	32,620±0,47	7,683±0,09	0,494±0,04	0,402±0,16
<i>A. mellifera</i>	12	Liof-GI	0,253±0,00	2,394±0,04	5,199±0,13	17,535±0,08	ND	33,692±0,12	0,988±0,04	0,282±0,01
<i>A. mellifera</i>	12	LioF-Dr	0,269±0,00	2,490±0,01	5,177±0,03	17,290±0,06	ND	32,464±0,13	1,145±0,02	0,376±0,03
<i>A. mellifera</i>	12	Liof	0,251±0,00	2,476±0,00	5,830±0,74	18,527±0,06	ND	34,182±0,02	1,304±0,01	0,416±0,01
<i>A. mellifera</i>	12	Seco-GI	0,255±0,00	2,956±0,00	5,469±0,13	17,481±0,37	ND	31,614±0,03	1,388±0,08	0,357±0,07
<i>A. mellifera</i>	12	secoDr	0,262±0,00	3,178±0,00	5,460±0,06	17,974±0,02	ND	30,829±0,03	1,392±0,02	0,298±0,01
<i>A. mellifera</i>	12	seco	0,260±0,00	2,997±0,00	5,659±0,12	18,246±0,12	ND	31,204±0,23	1,590±0,02	0,449±0,01
<i>A. mellifera</i>	12	fresco	ND	1,992±0,07	4,912±0,80	14,093±0,21	ND	8,861±0,20	0,685±0,04	0,507±0,12
<i>T. spinipes</i>	0	Liof	0,401±0,00	3,113±0,06	3,223±0,00	30,422±0,07	ND	27,662±0,03	1,263±0,05	0,183±0,04
<i>T. spinipes</i>	0	seco	0,376±0,01	2,893±0,09	2,656±0,04	31,129±0,01	ND	28,968±0,00	1,001±0,02	0,107±0,00

<i>T. spinipes</i>	0	<i>in natura</i>	0,391±0,00	2,723±0,12	1,849±0,10	33,021±0,08	ND	29,055±0,27	0,676±0,09	0,071±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	Liof-GI	0,337±0,03	2,835±0,02	3,319±0,04	31,449±0,02	ND	27,204±0,09	0,862±0,01	0,142±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	LioF-Dr	0,365±0,00	2,852±0,00	3,265±0,03	31,820±0,09	ND	27,328±0,12	0,819±0,02	0,115±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	Liof	0,372±0,00	2,995±0,02	3,510±0,02	31,054±0,10	ND	26,718±0,07	0,939±0,01	0,154±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	Seco-GI	0,359±0,01	2,747±0,01	3,019±0,03	31,807±0,15	ND	27,503±0,06	0,885±0,08	0,123±0,01
<i>T. spinipes</i>	6	secoDr	0,385±0,01	2,755±0,01	2,950±0,02	31,535±0,12	ND	27,469±0,01	0,972±0,02	0,139±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	seco	0,390±0,00	2,861±0,00	3,025±0,01	31,484±0,01	ND	27,224±0,04	0,866±0,00	0,137±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	fresco	0,348±0,01	2,340±0,02	2,253±0,08	33,562±0,36	ND	28,052±0,25	0,502±0,02	0,108±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	Liof-GI	0,356±0,00	2,292±0,13	2,578±0,16	30,536±0,33	ND	28,510±0,16	0,943±0,09	0,316±0,02
<i>T. spinipes</i>	12	LioF-Dr	0,322±0,00	2,333±0,04	2,610±0,00	31,029±0,02	ND	29,039±0,26	0,94±0,00	0,262±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	Liof	0,363±0,00	2,499±0,02	2,843±0,04	30,155±0,15	ND	28,595±0,37	1,028±0,03	0,289±0,03
<i>T. spinipes</i>	12	Seco-GI	0,362±0,02	2,367±0,06	2,557±0,02	31,118±0,09	ND	28,831±0,22	0,784±0,01	0,088±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	secoDr	0,363±0,00	2,433±0,00	2,541±0,01	31,339±0,04	ND	28,710±0,03	0,812±0,01	0,087±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	seco	0,370±0,00	2,513±0,04	2,700±0,06	30,763±0,16	ND	28,418±0,30	1,007±0,00	0,251±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	fresco	0,345±0,00	2,165±0,02	2,085±0,04	33,440±0,14	ND	28,606±0,25	0,619±0,00	ND

<i>Especie</i>	Tempo	Amostra	C20:2CIS-11,14	C20:3n3	C21:0	C22:0	C22:1n9	C22:2CIS13,16	C23:0	C24:0
<i>A. mellifera</i>	0	Liof	0,039±0,00	ND	0,064±0,00	3,269±0,04	0,078±0,00	0,044±0,00	0,1215±0,01	1,101±0,00
<i>A. mellifera</i>	0	seco	0,030±0,00	ND	0,097±0,01	2,998±0,46	0,525±0,00	0,051±0,00	0,131±0,02	1,268±0,21
<i>A. mellifera</i>	0	<i>in natura</i>	0,836±0,14	0,520±0,09	0,156±0,03	1,078±0,02	0,424±0,08	3,782±0,18	0,373±0,07	0,281±0,05
<i>A. mellifera</i>	6	Liof-GI	0,037±0,00	ND	ND	2,299±0,04	0,119±0,00	0,119±0,00	0,104±0,00	1,128±0,01
<i>A. mellifera</i>	6	LioF-Dr	0,047±0,00	ND	ND	2,380±0,00	0,113±0,01	0,069±0,00	0,107±0,00	1,112±0,01
<i>A. mellifera</i>	6	Liof	0,057±0,00	ND	ND	2,747±0,05	0,090±0,01	0,064±0,00	0,087±0,00	1,280±0,04
<i>A. mellifera</i>	6	Seco-GI	0,044±0,00	ND	0,069±0,00	2,592±0,03	0,118±0,00	0,113±0,02	0,130±0,00	1,139±0,13
<i>A. mellifera</i>	6	secoDr	0,031±0,00	ND	0,057±0,00	2,605±0,02	0,085±0,00	0,065±0,01	0,098±0,00	1,139±0,04
<i>A. mellifera</i>	6	seco	0,043±0,00	ND	0,070±0,00	2,963±0,00	0,083±0,00	0,088±0,00	0,130±0,01	1,317±0,00
<i>A. mellifera</i>	6	fresco	3,220±0,05	1,346±0,05	0,350±0,03	1,262±0,00	ND	14,982±0,20	ND	ND
<i>A. mellifera</i>	12	Liof-GI	ND	ND	0,139±0,01	2,093±0,06	ND	ND	ND	0,885±0,05
<i>A. mellifera</i>	12	LioF-Dr	ND	ND	0,269±0,00	2,146±0,02	ND	ND	ND	0,980±0,00

<i>A. mellifera</i>	12	Liof	ND	ND	0,179±0,00	2,411±0,01	ND	ND	ND	0,970±0,00
<i>A. mellifera</i>	12	Seco-Gl	ND	ND	0,146±0,01	2,232±0,01	ND	ND	ND	0,956±0,03
<i>A. mellifera</i>	12	secoDr	ND	ND	0,235±0,00	2,358±0,00	ND	ND	ND	0,957±0,00
<i>A. mellifera</i>	12	seco	ND	ND	0,195±0,01	2,527±0,00	ND	ND	ND	0,808±0,03
<i>A. mellifera</i>	12	fresco	6,951±0,51	1,941±0,09	0,663±0,00	1,154±0,15	ND	25,869±1,38	ND	0,809±0,01
<i>T. spinipes</i>	0	Liof	ND		0,323±0,02	1,961±0,44	ND	ND	ND	1,075±0,06
<i>T. spinipes</i>	0	seco	ND		0,262±0,00	1,259±0,07	ND	ND	ND	0,821±0,09
<i>T. spinipes</i>	0	<i>in natura</i>	ND		0,095±0,00	0,792±0,11	ND	ND	ND	0,453±0,05
<i>T. spinipes</i>	6	Liof-Gl	ND	0,248±0,00	ND	1,144±0,01	0,261±0,00	ND	ND	0,773±0,07
<i>T. spinipes</i>	6	LioF-Dr	ND	0,219±0,02	ND	0,842±0,03	0,301±0,00	ND	ND	0,595±0,02
<i>T. spinipes</i>	6	Liof	ND	0,276±0,01	ND	1,268±0,04	0,339±0,04	ND	ND	0,917±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	Seco-Gl	ND	0,223±0,01	ND	1,051±0,02	0,279±0,04	ND	ND	0,781±0,04
<i>T. spinipes</i>	6	secoDr	ND	0,261±0,02	ND	1,036±0,05	0,305±0,03	ND	ND	0,830±0,00
<i>T. spinipes</i>	6	seco	ND	0,242±0,00	ND	1,134±0,05	0,299±0,02	ND	ND	0,908±0,03
<i>T. spinipes</i>	6	fresco	ND	0,152±0,01	ND	0,563±0,02	0,602±0,02	ND	ND	0,503±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	Liof-Gl	ND	0,264±0,00	ND	0,566±0,04		ND	ND	0,559±0,07
<i>T. spinipes</i>	12	LioF-Dr	ND	0,232±0,00	ND	0,699±0,00	ND	ND	ND	0,516±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	Liof	ND	0,309±0,00	ND	0,682±0,00	ND	ND	0,162±0,00	0,725±0,05
<i>T. spinipes</i>	12	Seco-Gl	ND	0,232±0,00	ND	0,715±0,05	ND	ND	ND	0,471±0,06
<i>T. spinipes</i>	12	secoDr	ND	0,244±0,00	ND	0,747±0,00	ND	ND	ND	0,398±0,00
<i>T. spinipes</i>	12	seco	ND	0,303±0,02	ND	0,775±0,02	ND	ND	ND	0,664±0,02
<i>T. spinipes</i>	12	fresco	0,130±0,01	ND	0,440±0,04	ND	ND	ND	0,338±0,01	ND

C6:0-ácido caproico, C8:0- ácido caprilico, C10:0- ácido caprico, C12:0- ácido laúrico, C14:0- ácido merístico, C15:0- ácido pentadecanoico, C16:0- ácido palmítico, C16:1-ácido palmitoleico, C17:0- ácido heptadecanoico, C18:0-ácido esteárico, C18:1n9-ácido oleico, C18:2n6c, ácido linoleico, C18:3n6 ácido Gama-Linolenico, C18:3n3-ácido linolênico, C20:0-ácido araquídico, C20:1CIS-11-, ácido eicosenoato de cis-metilo, C20:2CIS-11,14- ácido eicosenoato de cis-metilo, C20:3n3- ácido eicosatrienóico, C21:0- ácido henicosanóico, C22:0- Acido docosanoico, C22:1n9-Acido 13-docosenoico, C22:2CIS13,16, Acido 13.16-docosadienoico, C23:0- ácido tricosanóico, C24:0- Acido tetracosanoico, ND-não detectado. Liof.:liofilizado, DR: DRcaps, Gl:capsula de gelatina.