

**Avaliação físico-química, nutricional e microbiológica de pólen  
apícola submetido a diferentes processos de conservação**

**Telma Sofia Rodrigues Orvalho**

2023



# **Avaliação físico-química, nutricional e microbiológica de pólen apícola submetido a diferentes processos de conservação**

**Telma Sofia Rodrigues Orvalho**

Trabalho de Dissertação

Trabalho de Dissertação realizado sob a orientação da Professora Doutora Maria Jorge Campos  
e coorientação da Professora Doutora Daniela Vaz e da Professora Doutora Vânia Ribeiro

2023



Título: Avaliação físico-química, nutricional e microbiológica de pólen apícola submetido a diferentes processos de conservação

© Telma Sofia Rodrigues Orvalho

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2023

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## DEDICATÓRIA

---

Dedico a ti, Cláudia.



## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço e dedico também este trabalho ao meu filho Afonso, pelo amor que me dá força. Apesar de pequenino, ensina-me tanto.

Ao Homero pelo apoio incondicional e, por tanto me aturar nas horas de desespero e não me deixar desistir. Obrigada por alinhares nas minhas aventuras, contigo ao meu lado, é mais fácil.

Ao Gui e à Alice, pelos momentos de partilha e humor ao longo deste caminho.

À minha família, pela força e motivação e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Agradeço à Professora Maria Jorge Campos, pela oportunidade de realizar esta dissertação, pela sua inteira disponibilidade na orientação e correção ao longo do trabalho, pelos ensinamentos e pelo incentivo.

Agradeço à Professora Daniela Vaz e à Professora Vânia Ribeiro pela forma que me receberam, pela disponibilidade em apoiar e orientar, pelos conhecimentos e sobretudo pelo incentivo.

Agradeço à TAGUSVALLEY pela oportunidade de realizar os ensaios no laboratório do INOV.LINEA e por todo apoio prestado ao longo do trabalho desenvolvido.

Agradeço ao CETEMARES e ao Laboratório de Química do IPEiria pela disponibilidade das instalações e às equipas MARE-IPEiria e de Química do IPEiria pelo apoio na realização dos ensaios.

Agradeço ao apoio na realização de espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ao Dr. Pedro Cruz da plataforma UC-NMR, Centro de Química da Universidade de Coimbra.<sup>1</sup>

Ao Marco. É um privilégio tê-lo como colega num caminho que já é longo. Agradeço toda a aprendizagem, o apoio e sobretudo a amizade.

À Patrícia, agradeço a preciosa ajuda, a paciência, e o incentivo para não desistir.

Aos restantes colegas do INOV.LINEA, Sara, Diogo e Enrique, pelo apoio e por contribuírem para a equipa maravilha.

Aos meus queridos amigos, os 7 Mag., por serem família, por estarem sempre presentes, pela amizade que não se esgota.

Aos colegas de Mestrado, pela partilha, pela amizade e pelo companheirismo. Tenho as melhores recordações.

---

<sup>1</sup> Financiada pelo programa FEDER/ERDF-COMPETE e FCT via fundos RECI/QEQ-QFI/0168/2012, CENTRO-07-CT62-FEDER-002012, UID/QUI/00313/2019 e Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN).



## RESUMO

---

O pólen apícola é considerado uma fonte importante de compostos nutricionais e bioativos e conhecido pelas suas propriedades terapêuticas. Um dos aspetos importantes na sua comercialização é a qualidade microbiológica, que pode afetar a composição físico-química, nutricional e propriedades bioativas. A aplicação de vários métodos de conservação podem ser cruciais para a preservação da qualidade e das características de interesse. Antes da sua comercialização, o pólen apícola é submetido a um processo de desidratação com o objetivo de reduzir os teores de humidade para valores considerados seguros, de forma a impedir alterações negativas e que ponham em causa a segurança dos consumidores. O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a influência da aplicação de diferentes métodos de conservação secagem convencional, liofilização e congelação, na composição química e nutricional, e nas propriedades microbiológicas e bioativas do pólen apícola. Foi verificado que a congelação foi um método eficaz na manutenção da qualidade microbiológica do pólen apícola, ao longo do armazenamento. As técnicas de desidratação, como a liofilização e desidratação, foram eficazes na redução da carga microbiana de microrganismos indicadores de qualidade sanitária e segurança alimentar.

Na composição nutricional não foi verificada a influência dos processos de desidratação aplicados em relação à congelação, observando-se a manutenção do conteúdo da maioria dos parâmetros nutricionais. Neste estudo, constatou-se que os processos de secagem foram mais eficazes na manutenção das propriedades bioativas do produto quando comparado com o pólen congelado. A liofilização e a secagem convencional preservaram, ao fim de 1 ano, a maior parte do conteúdo fenólico das amostras quando comparado com amostras de pólen comercial recém comercializado no mercado.

**Palavras-chave:** Pólen apícola; Processos de Conservação; Avaliação Físico-química; Avaliação Microbiológica; Avaliação microbiológica; Atividade antioxidante



## ABSTRACT

---

Bee pollen is an important source of nutritional and bioactive compounds, and a natural product well known for its therapeutic properties. An important aspect for bee-pollen commercialization is microbiological quality, which can directly affect the physical-chemical, nutritional composition and bioactive properties of this highly valuable product. The application of different conservation methods can be crucial for the preservation of bee-pollen quality and general characteristics of interest. Before being marketed, bee pollen is submitted to a dehydration process with the aim of reducing moisture content to regulatory-safe values, in order to prevent negative changes that can jeopardize product quality and consumers safety. The present work had as a general objective to evaluate the influence of different conservation methods, namely, conventional drying, lyophilization and freezing in bee-pollen chemical and nutritional composition, as well as in its microbiological safety and ability to preserve bioactive compounds. It was verified that freezing, as a method, effectively maintained the microbiological quality of bee pollen during storage. Dehydration techniques, such as lyophilization and conventional dehydration, were effective in reducing microbial load of sanitary quality and food safety indicator microorganisms. The dehydration processes applied did not influence nutritional composition, in relation to freezing, having been observed that nutritional parameters maintained most of their content. In this study, it was found that drying processes were more effective in maintaining product bioactive properties when compared to frozen pollen. Lyophilization and conventional drying dehydration samples preserved, after 1 year in storage, most of its phenolic content, when compared to commercial bee pollen samples recently placed in the market.

**Keywords:** Bee pollen; Conservation processes; Physical-chemical evaluation; Microbiological assessment; Microbiological evaluation; Antioxidant activity



## ÍNDICE GERAL

---

AGRADECIMENTOS .....	VII
RESUMO .....	IX
ABSTRACT .....	XI
ÍNDICE GERAL .....	XIII
LISTA DE FIGURAS .....	XV
LISTA DE TABELAS .....	XVII
LISTA DE SIGLAS.....	XVIII
1. Enquadramento e Objetivos do Trabalho.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	4
2.1 Pólen Apícola.....	4
2.1.1 Composição Química do Pólen Apícola .....	6
2.1.2 Composição Bioativa do Pólen Apícola.....	8
2.2 Parâmetros de Qualidade no Pólen Apícola.....	9
2.2.1 Parâmetros Microbiológicos .....	9
2.2.2 Parâmetros Físico-Químicos .....	12
2.3 Metodologias de Conservação .....	13
2.4 Normas de Segurança Alimentar.....	15
2.5 Aplicações do Pólen Apícola em Alimentos .....	16
3. Material e Métodos .....	18
3.1 Preparação de Amostras .....	18
3.2 Desenho Experimental .....	19
3.3 Avaliação da Qualidade Microbiológica .....	21
3.3.1 Preparação das Amostras e Meios de Cultura.....	21
3.3.2 Contagem de Microrganismos Totais a 30°C.....	21
3.3.3 Contagem de Bolores e Leveduras.....	22
3.3.4 Contagem de Coliformes Totais .....	22
3.3.5 Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva.....	22
3.3.6 Contagem de Clostrídios Sulfito-Redutores .....	22
3.4 Caracterização Físico-Química.....	23
3.4.1 Humidade .....	23
3.4.2 pH .....	23
3.4.3 Atividade Água .....	23

3.4.4 Cor .....	24
3.5 Composição Nutricional .....	25
3.6 Avaliação das Propriedades Bioativas - Atividade e Capacidade Antioxidante.....	25
3.6.1 Preparação dos Extratos Etanólicos (EE) e Extratos Cetónicos (EC) .....	26
3.6.2 Avaliação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	27
3.6.2.1 Quantificação de CFT - Método Espectrofotométrico de <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	27
3.6.2.2 Método Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H) .....	28
3.6.3 Determinação da Capacidade Antioxidante.....	28
3.6.3.1 Método de Redução do Radical ABTS .....	28
3.6.3.2 Método DPPH.....	30
3.7 Análise Estatística .....	31
4. Resultados e Discussão .....	32
4.1 Avaliação da Qualidade Microbiológica .....	32
4.2 Caracterização Físico-Química.....	33
4.3 Composição Nutricional .....	36
4.4 Avaliação das Propriedades Bioativas – Atividade e Capacidade Antioxidante.....	40
4.4.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	40
4.4.2 Capacidade Antioxidante .....	43
5. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	45
6. Referências Bibliográficas .....	47
7. Anexos .....	56

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Pólen Apícola Fresco .....	4
<b>Figura 2.</b> Armadilha caça-pólenes à entrada da colmeia e o pormenor do orifício para a recolha do pólen apícola (fonte: <a href="https://keepingbee.org/honey-bee-pollen/">https://keepingbee.org/honey-bee-pollen/</a> ). .....	5
<b>Figura 3.</b> Processo produtivo do pólen apícola (adaptado de Campos et al. (2021))......	5
<b>Figura 4.</b> Localização da recolha do pólen apícola (fonte: google maps). .....	18
<b>Figura 5.</b> Esquema de preparação de amostras de pólen apícola. ....	18
<b>Figura 6.</b> Amostra de pólen apícola submetidas a diferentes processos de conservação, a) congelação, b) liofilização e c) secagem por ar quente). .....	19
<b>Figura 7.</b> Desenho experimental.....	20
<b>Figura 8.</b> Preparação dos meios de cultura e diluentes.....	21
<b>Figura 9.</b> Determinação do pH das amostras de pólen apícola .....	23
<b>Figura 10.</b> Determinação da atividade da água. ....	24
<b>Figura 11.</b> Determinação da cor das amostras de pólen apícola.....	24
<b>Figura 12.</b> Representação do Espaço de Cor CIELab (Fonte: Konica Minolta). .....	24
<b>Figura 13.</b> Esquema representativo das metodologias utilizadas na avaliação da atividade e capacidade antioxidante para as diferentes amostras de pólen apícola estudadas. ....	26
<b>Figura 14.</b> Extratos cetónicos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco (a); Extratos etanólicos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco (b). .....	27
<b>Figura 15.</b> Espectros 1D 1H RMN de extratos de pólen apícola. A figura representa a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6,0 a 8,0 ppm) para extratos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco, em etanol-d <sub>6</sub> 70% (v/v). [a] Pólen Congelado; b) Pólen Liofilizado; c) Pólen Seco; d) Pólen Seco Comercial em fim de prazo de validade (controlo) e e) Pólen Seco Comercial recém comercializado (controlo)] .....	42
<b>Figura 16.</b> Espectros 1D 1H RMN de extratos de pólen apícola. A figura representa a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6,0 a 8,0 ppm) para extratos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco, acetona-d <sub>6</sub> 70% (v/v).[a] Pólen Congelado; b) Pólen Liofilizado; c) Pólen Seco; c) Pólen Seco Comercial em fim de prazo de validade (controlo) e e) Pólen Seco Comercial recém comercializado (controlo)] .....	42
<b>Figura 17.</b> Retas de calibração do ácido gálico para a quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, usando como solvente o etanol a 70% (v/v). .....	56
<b>Figura 18.</b> Retas de calibração do ácido gálico para a quantificação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, usando como solvente a acetona a 70% (v/v).....	56

<b>Figura 19.</b> Reta de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através pelo método ABTS das amostras de Pólen estudados, como solvente o atanol a 70% (v/v). ....	57
<b>Figura 20.</b> Reta de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através pelo método ABTS das amostras de Pólen estudados, com solvente acetona a 70% (v/v). .....	57
<b>Figura 21.</b> Reta de calibração do Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, utilizando como solvente o etanol a 70% (v/v). .....	58
<b>Figura 22.</b> Reta de calibração do Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, utilizando como solvente a acetona a 70% (v/v). .....	58

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Composição nutricional do pólen apícola seco.....	6
<b>Tabela 2.</b> Composição em vitaminas do pólen apícola seco.....	7
<b>Tabela 3.</b> Critérios de qualidade microbiológica para produtos alimentares para consumo de acordo com valores guia e de referência.....	10
<b>Tabela 4.</b> Nomenclatura atribuída a cada amostra analisada de pólen apícola.....	19
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros de análise e metodologias aplicadas pelo laboratório externo para a determinação da composição nutricional das várias amostras de pólen.....	25
<b>Tabela 6.</b> Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos nas amostras de pólen congelado, pólen liofilizado e seco, após um ano de armazenamento (n=3). .....	32
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros físico-químicos das amostras de pólen congelado e amostras de pólen desidratados (liofilizado e seco), após um ano de armazenamento. (Diferentes símbolos na mesma coluna indicam diferenças significativas ((p<0,05), pelo teste de Tukey; Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ((p<0,05), pelo teste de Tukey) (t <sub>0</sub> : 0 dias; t <sub>1</sub> : 360 dias).....	34
<b>Tabela 8.</b> Determinação do parâmetro cor. Médias e respectivos desvios-padrão (n=10) dos parâmetros de cor (L*, a* e b*) e ΔE. (Diferentes símbolos na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05), pelo teste de Tukey; Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05), pelo teste de Tukey) (t <sub>0</sub> : 0 dias; t <sub>1</sub> : 360 dias).....	36
<b>Tabela 9.</b> Valores obtidos, em peso seco, para a composição nutricional de amostras de pólen apícola submetidas a diferentes processos de conservação (congelamento, liofilização e secagem convencional).....	37
<b>Tabela 10.</b> Valores obtidos para a composição em vitaminas de amostras de pólen apícola, em peso seco, submetidas a diferentes processos de conservação (congelamento, liofilização e secagem convencional), após 1 ano de armazenamento.....	39
<b>Tabela 11.</b> Teores de compostos fenólicos total pelo método espectrofotométrico de <i>Folin-Ciocalteu</i> . Médias e respectivos desvios-padrão (n=3), dos CFT (g GAE/100g) presentes em extratos de amostras de pólen apícola (pólen congelado, pólen liofilizado e pólen seco, em extratos etanólicos e cetónicos), em peso seco. ....	41
<b>Tabela 12.</b> Médias e respectivos desvios-padrão (n=3), da capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de extratos etanólicos e cetónicos de pólen apícola submetido a diferentes métodos de processamento (congelamento, liofilização e secagem), em peso seco.....	43

## LISTA DE SIGLAS

---

<b>AA</b>	Atividade Antioxidante
<b>a<sub>w</sub></b>	Atividade da água
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>Abs</b>	Absorvância
<b>BPHF</b>	Boas Práticas de Higiene e Fabrico
<b>C</b>	Concentração
<b>CE</b>	Concentração de Extrato
<b>CFT</b>	Compostos Fenólicos Totais
<b>DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1 picrilhidrazil
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>EE</b>	Extratos Etanólicos
<b>EC</b>	Extratos Cetónicos
<b>g</b>	grama
<b>GPP</b>	Gabinete de Planeamento Políticas e Administração Geral
<b>GAE</b>	Equivalentes em ácido gálico ( <i>Gallic Acid Equivalent</i> s)
<b>HACCP</b>	Análise de Perigos e Controlo de Pontos Crítico ( <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High Performance liquid chromatography</i> )
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
<b>ISO</b>	Organização Internacional de Normalização ( <i>International Organization for Standardization</i> )
<b>Kcal</b>	Quilocaloria
<b>K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub></b>	Persulfato de potássio
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligramma
<b>n</b>	Número de unidades que constituem a amostra
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sódio
<b>NP</b>	Norma Portuguesa
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NMR</b>	Ressonância magnética nuclear ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>PC</b>	Pólen congelado
<b>PF</b>	Pólen liofilizado

<b>pH</b>	Potencial hidrogeniónico
<b>PS</b>	Pólen Seco
<b>PSC</b>	Pólen Seco Comercial
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tempo
<b>Trolox</b>	ácido 6 hidroxí-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico ( <i>6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid</i> )
<b>TEAC</b>	Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox ( <i>Trolox Equivalent antioxidant capacity</i> )
<b>UE</b>	União Europeia
<b>ufc</b>	unidades formadoras de colónias
<b>Vit</b>	Vitamina
<b>(v/v)</b>	Volume de soluto / volume de solução
<b>%</b>	Percentagem
<b>µg</b>	Micrograma
<b>°C</b>	Graus Celcius

## 1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS DO TRABALHO

---

Em Portugal, a apicultura é considerada uma atividade chave do setor agropecuário, não só pelo contributo económico direto ligado à produção de mel, mas pelo contributo indireto das abelhas, através da polinização, na sustentabilidade dos ecossistemas, na preservação da biodiversidade e no equilíbrio ecológico. O valor económico da atividade deriva maioritariamente da produção de mel, mas existem outros produtos apícolas possíveis de serem explorados, como o pólen apícola, a geleia real, o própolis ou a cera de abelha. São produtos com grande potencial que ao serem explorados podem contribuir para a rentabilização da atividade, mas escassos no mercado português pela falta de conhecimento dos processos produtivos por parte dos apicultores. Apesar de se verificar, nos últimos anos, um aumento efetivo da atividade apícola e do número de apicultores, existe ainda uma reduzida taxa de profissionalização no setor a nível nacional (Anjos et al., 2019 a; Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP), 2019).

A exigência dos consumidores atuais por um estilo de vida mais saudável permitiu um maior consumo de alimentos naturais, pouco processados, nutricionalmente ricos e com propriedades bioativas. O pólen apícola é um dos produtos que se inclui neste leque de características, não só por ser considerado um alimento natural, completo, rico nutricionalmente e equilibrado, mas também pelas suas propriedades de interesse, como a atividade antimicrobiana ou anti-inflamatória (Anjos et al., 2019 a; Diadaras et al., 2020). A atividade antibacteriana do pólen apícola foi comprovada após isolamento de vários flavonoides, em que se verificou atividade antibiótica contra microrganismos patogénicos (Campos et al., 2010). As propriedades anti-inflamatórias estão associadas à presença de polifenóis na composição do pólen apícola, que podem exercer efeitos benéficos em várias células responsáveis pela defesa do hospedeiro contra patogénicos invasores e em processos inflamatórios. Diversos estudos têm evidenciado ainda o efeito positivo do pólen apícola ao nível das funções digestivas e intestinais, no controlo dos diabetes ou o efeito benéfico contra doença aterosclerose (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016).

Este produto tem vindo a ganhar relevância entre os vários tipos de indústria, nomeadamente, alimentar, cosmética e terapêutica. E em muitos países é aplicado em apiterapia ou medicina alternativa (Vegh, 2021). Como fonte alimentar pode ser utilizado de forma independente ou conjugado com outros alimentos, e utilizado ainda como suplemento alimentar (Anjos et al., 2017).

Do ponto de vista da comercialização do pólen apícola, as técnicas utilizadas e as condições de processamento (colheita, limpeza, secagem, embalagem e armazenamento), são fatores importantes para obter um produto final de qualidade. Um processamento inadequado pode originar a perda nutricional de produto alimentar, e aumentar a suscetibilidade de desenvolvimento de microrganismos (Anjos et al., 2017).

Para garantir a qualidade do produto final e a segurança do consumidor, o pólen apícola é normalmente sujeito a um processo de secagem com o objetivo de diminuir o teor de humidade e aumentar o seu tempo de vida útil. A desidratação por secagem com ar quente, devido à aplicação de temperaturas elevadas, está associada à perda do valor nutricional dos produtos alimentares, e no pólen apícola pode levar à alteração significativa da composição química, qualidade sensorial e propriedades bioativas (Estevinho et al., 2019). Por isso, a aplicação de processos alternativos a este tipo de desidratação, como por exemplo a liofilização, ou processos de conservação como a congelação, podem ser uma opção interessante no que respeita à conservação do produto e à manutenção dos compostos de interesse (Thakur & Nanda, 2020; Vegh, 2021).

Na União Europeia, a produção e comercialização do pólen apícola está abrangida pela regulamentação aplicada à atividade apícola e comercialização do mel.

Embora alguns Estados-Membros possuam critérios de qualidade legislados e específicos para o pólen apícola, como é o caso da Bulgária e da Polónia (Campos et al., 2008), existe uma lacuna na regulamentação no que diz respeito aos parâmetros de qualidade e limites de cumprimento legal que possam ajudar os apicultores num controlo efetivo que permita obter produtos de qualidade e seguros. Assim, o estudo da composição química do pólen apícola comercial, aliado aos estudos das melhores técnicas de conservação e armazenamento, e a forma como a sua aplicação prática influencia a estabilidade dos produtos, podem vir a auxiliar a uniformização de valores de referência de qualidade e padronizar as técnicas de produção.

De acordo com o enquadramento, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a influência da aplicação de diferentes métodos de conservação, secagem convencional, liofilização e congelação, na composição química e nutricional, nas propriedades microbiológicas e bioativas do pólen apícola. Os resultados obtidos permitirão um melhor conhecimento das técnicas de conservação a aplicar na produção de pólen apícola, que podem vir a contribuir para uma maior qualidade do produto comercializado.

Definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- i) Avaliação da qualidade microbiológica através da contagem e pesquisa de microrganismos indicadores de qualidade comercial (microrganismos a 30°C ou mesófilos aeróbios e bolores e leveduras), de microrganismos de qualidade sanitária (coliformes totais e Estafilococos) e

microrganismos de segurança (clostrídios sulfito-redutores), de amostras de pólen apícola submetidas a processos de conservação diferentes (congelamento, liofilização e secagem convencional);

- ii) Avaliação da composição química e nutricional de amostras (teor de umidade, atividade da água ( $a_w$ ), pH, cor, composição nutricional e vitaminas), para cada um dos três processos de conservação;
- iii) Avaliação da atividade antioxidante de pólen apícola, para cada um dos três processos de conservação, com dois solventes de extração diferentes (acetona e etanol) por dois métodos diferentes:
  - a) Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt);
  - b) Determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl);
- iv) Avaliação dos compostos fenólicos, para cada um dos três processos de conservação, com dois solventes de extração diferentes (acetona e etanol) por dois métodos diferentes:
  - a) Avaliação do conteúdo de fenólicos total pelo método de *Folin-Ciocalteu*;
  - b) Identificação da presença de grupos aromáticos pelo método de espectroscopia de ressonância magnética (RMN  $^1H$ ).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Pólen Apícola

O Pólen apícola é a principal e importante fonte alimentar das abelhas, fornecendo uma ampla gama de nutrientes essenciais para a sua sobrevivência (Campos et al., 2016; Margaoan et al., 2021). Resulta de uma mistura de pólen de flores, recolhido e transportado pelas abelhas do género *Apis mellifera*, formado por grânulos de cerca de 1,4 mm a 4 mm de tamanho, por aglutinação através de pequenas quantidades de néctar e secreções salivares das abelhas (figura 1) (De-Melo et al., 2016; Kosmosinka-Vassev, et al., 2015).



**Figura 1.** Pólen Apícola Fresco

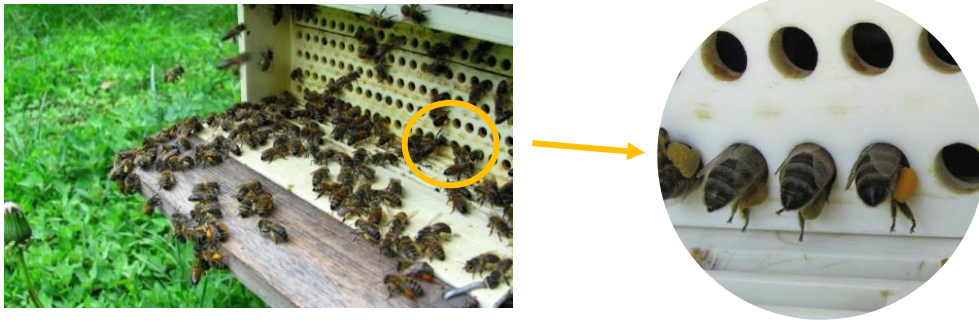
Dependendo da espécie vegetal de origem, o grão de pólen pode variar na sua cor (amarelo brilhante ao preto), tamanho e peso, e pode apresentar diferentes formas, arredondada, cilíndrica, em forma de sino triangular ou espinhosa (Kosmosinska-Vassev et al., 2015).

Embora de composição variável, certos componentes estão sempre presentes no pólen apícola, como por exemplo, proteínas, hidratos de carbono, aminoácidos essenciais, ácidos gordos, açúcares livres. Podem ainda estar presentes vestígios de minerais, ácidos fenólicos, flavonoides e vitaminas (Anjos et al., 2019 a; Campos et al., 2016).

A sua composição mineral inclui o cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre e potássio.

O pólen apícola é recolhido através de armadilhas colocadas estrategicamente à entrada das colmeias, designados caça-pólenes (figura 2).

As armadilhas são constituídas por placas com pequenos orifícios e colocadas à entrada das colmeias. As abelhas ao entrarem nas colmeias são obrigadas a atravessar os orifícios provocando a libertação dos grãos de pólen transportados nas suas patas. O pólen cai para um recipiente (gaveta) e é recolhido posteriormente pelo apicultor (Anjos et al., 2017; Margaoan et al., 2021; Straumite et al., 2022).



**Figura 2.** Armadilha caça-pólenes à entrada da colmeia e o pormenor do orifício para a recolha do pólen apícola (fonte: <https://keepingbee.org/honey-bee-pollen/>).

No processo produtivo de pólen apícola estão incluídas várias etapas, nomeadamente, a recolha, higienização, desidratação, embalagem e armazenamento (Figura 3).



**Figura 3.** Processo produtivo do pólen apícola (adaptado de Campos et al. (2021)).

O pólen apícola deve ser recolhido diariamente e armazenado a temperaturas entre os  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 48h. Para além do controlo do desenvolvimento microbiano, a congelação permite a destruição de ácaros, ovos e insetos. Após a congelação o produto deve ser submetido a um processo de desidratação, com uma temperatura entre os  $40^{\circ}\text{C}$  e os  $42^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas, de forma a baixar o teor de humidade para valores compreendidos entre os 4% e os 6%. O produto final deve ser acondicionado em embalagem adequada e armazenado ao abrigo da luz, num local fresco e seco (Campos et al., 2008; Campos et al., 2021).

### 2.1.1 Composição Química do Pólen Apícola

A composição química do pólen apícola é muito variável, influenciada por diversos fatores, nomeadamente, condições climáticas, origem botânica das espécies de plantas disponíveis e técnicas de produção aplicadas (métodos de colheita, processamento, armazenamento) (Corvucci et al., 2015; De-Melo et al., 2018; Estevinho et al., 2019; Margaoan et al., 2021).

O pólen apícola é considerado um produto rico nutricionalmente, regulador de certas funções bioquímicas e que fortalece os sistemas fisiológicos e imunológicos do organismo (Kostic et al., 2020).

Na tabela 1 está representada a composição nutricional do pólen apícola seco de acordo com vários autores.

**Tabela 1.** Composição nutricional do pólen apícola seco.

NUTRIENTE	MIN-MÁX	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Valor energético (Kcal/100g)	381,70	Anjos et al. (2017)
Hidratos de carbono (g/100g)	13,00-55,00	Campos et al. (2008)
Humidade (g/100g)	20,00-30,00	Campos et al. (2008)
Proteína (g/100g)	10,00-40,00	Campos et al. (2008)
Cinzas (g/100g)	2,00-6,00	Campos et al. (2008)
Lípidos (g/100g)	1,00-13,00	Campos et al. (2008)
Ácidos Gordos Saturados (g/100g)	0,91-1,92	Estevinho et al. (2019)
Ácidos Gordos Polinsaturados (g/100g)	1,67-3,29	Estevinho et al. (2019)
Ácidos Gordos monoinsaturados (g/100g)	0,44-1,31	Estevinho et al. (2019)
Açúcares Redutores (g/100g)	33,3-47,20	Nogueira et al. (2012)

As proporções bem equilibradas de macronutrientes (proteína, lípidos e hidratos de carbono), que compõem o pólen apícola, torna-o um bom complemento para a dieta diária. O pólen apícola tem um baixo valor calórico, cerca de 381,70 kcal/100g (tabela 1), (Anjos et al., 2017).

Os hidratos de carbono são os principais constituintes do pólen apícola e o seu teor pode variar de 13 a 55% (Campos et al., 2008; Li et al., 2018). Desempenham inúmeras funções essenciais, tais como, fornecimento de energia, intervenção no metabolismo normal das gorduras, manutenção da integridade funcional do tecido nervoso, precursores de ácidos nucleicos, entre outras. Incluem os monossacarídeos (glucose, frutose e galactose), polissacarídeos (celulose, hemicelulose), dissacarídeos (maltose, sacarose e lactose), oligossacarídeos, fibras solúveis e não solúveis (Ares et al, 2018; Bernal et al., 2011; Khalifa et al., 2020). No pólen apícola os açúcares redutores são predominantes em relação aos açúcares não redutores. Os açúcares redutores mais abundantes presentes neste produto são a glucose e a frutose (Salazar-González & Díaz-Moreno, 2016).

As proteínas são macromoléculas complexas, constituídas essencialmente por aminoácidos e fazem parte dos compostos bioativos presentes no pólen apícola com diversas propriedades

importantes (antibacterianas, antioxidantes, imunoestimulantes, antitrombóticas e anti-inflamatórias) com benefícios para a saúde humana (Ares et al., 2018). As proteínas são o segundo maior componente do pólen apícola e pode estar presente entre 10% a 40% (tabela 1), sendo que um décimo do teor total está disponível como aminoácidos livres. É um dos poucos alimentos que pode conter os vinte e dois aminoácidos, e quase todos essenciais (lisina, triptofano, histidina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, ácido glutâmico, arginina, cistina, treonina valina), cuja composição também é afetada pela origem botânica e condições de processamento (Anjos et al., 2017; Campos et al., 2008; Thakur & Nanda, 2020).

Os lípidos são biomoléculas orgânicas, insolúveis em água que podem ser extraídos das células por solventes não polares. Atuam como agentes protetores da parede celular, como depósitos de reserva intracelular de combustível metabólico e como componentes estruturais das membranas. Na dieta alimentar fornecem energia e ácidos gordos essenciais, são veículos de vitaminas A e D. Os lípidos são o terceiro componente mais abundante no pólen apícola podendo variar entre 1% a 13% (tabela 1). Incluem ácidos gordos saturados (ácido palmítico) ácidos gordos polinsaturados (ácido linoleico) e os ácidos gordos monoinsaturados (oleico) e ainda os ácidos gordos essenciais como os ácido  $\gamma$ -linolénico e  $\alpha$ -linolénico. Os lípidos também abrangem os antioxidantes tipo 2, cujos compostos impedem ou diminuem a formação de radicais livres, e os mais utilizados são os agentes quelantes de metais (Anjos et al., 2017; Ares et al., 2018; Campos et al., 2008; Mayda et al., 2020; Thakur & Nanda, 2020).

Na tabela 2 está representada a composição em vitaminas do pólen apícola seco de acordo com Campos et al. (2008).

**Tabela 2.** Composição em vitaminas do pólen apícola seco.

VITAMINAS	MIN – MÁX	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Vitamina C (ácido ascórbico) (mg/100g)	7,00-56,00	Campos et al. (2008)
Vitamina E (Tocoferol) (mg/100g)	4,00-32,00	Campos et al. (2008)
Vitamina B1 (Tiamina) (mg/100g)	0,60-1,30	Campos et al. (2008)
Vitamina B2 (Riboflavina) (mg/100g)	0,60-2,00	Campos et al. (2008)
Vitamina B <sub>3</sub> (Niacina) (mg/100g)	4,00-11,00	Campos et al. (2008)
Vitamina B5 (Ácido pantoténico) (mg/100g)	0,50-2,00	Campos et al. (2008)
Vitamina B6 (Piridoxina) (mg/100g)	0,20-0,70	Campos et al. (2008)
Vitamina B9 (Ácido fólico) ( $\mu$ g/100g)	300,00-1000,00	Campos et al. (2008)

As vitaminas compreendem um grupo diverso de compostos orgânicos com diversas funções, tais como assegurar o crescimento e diferenciação celular, atividade antioxidante e algumas são precursores de cofatores enzimáticos (Ares et al., 2018; De Arruda et al., 2013 a). As vitaminas são classificadas quanto à sua solubilidade. As vitaminas lipossolúveis são um grupo de substâncias químicas com uma estrutura diversa, solúveis em solventes orgânicos e

compreendem as vitaminas A ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e retinol), vitaminas D, vitamina E (tocoferol) e vitamina K (De Arruda et al., 2013 a; De Arruda et al., 2013 b). As vitaminas hidrossolúveis desempenham um papel importante na produção de energia celular, estão envolvidas no metabolismo dos lípidos, hidratos de carbono e proteínas (De Arruda et al., 2013 a), e incluem as vitaminas do complexo B (B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina), B7 (biotina), B9 (ácido fólico) e B12 (cianocobalamina) e vitamina C (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016; Komosinska-Vassev et al., 2015; Kostic et al., 2020; Kroyer & Hegedus, 2001).

Como as vitaminas não são sintetizadas no organismo ou sintetizadas em quantidades inadequadas, estes nutrientes devem ser obtidos através da alimentação. O conteúdo vitamínico no pólen apícola pode ser uma fonte importante no aporte diário destes nutrientes (De Arruda et al., 2013 b).

### **2.1.2 Composição Bioativa do Pólen Apícola**

As propriedades terapêuticas do pólen apícola são atribuídas à presença de compostos fenólicos, principalmente ao alto teor de flavonoides (quercetina e glicosídeos de canferol) caracterizados pelo elevado potencial antioxidante e antibacteriano e com propriedades antiinflamatórias e antialérgicas (De-Melo et al., 2016; Liolios, et al., 2022).

Devido à grande variedade de metabolitos primários e secundários o pólen apícola possui propriedades e bioatividades importantes (antioxidantes, anticarcinogénicas, antibacterianas, antifúngicas, hepatoprotetoras, anti-ateroscleróticas, hipolipidémicas e desintoxicantes, anti-diabéticas) (Anjos et al., 2019 a; Belinda-Aldemita et al., 2019; Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016; Didaras et al., 2020; Jannesar et al., 2017; Kocot et al., 2018; Komosinska-Vassev et al., 2015; Kurek-Gorecka et al., 2020; Morgaoan et al., 2019).

Os antioxidantes naturais presentes no pólen apícola são capazes de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas que poderiam conduzir ao desenvolvimento de *stress* oxidativo (Belina-Aldemita et al., 2020). As reações de oxidação produzem radicais livres, que iniciam reações em cadeia e causam danos na membrana celular, proteínas e/ou DNA, induzindo inflamações que estão associados a várias doenças degenerativas (Campos et al., 2010; Schieber & Chandel, 2014). Em geral, os compostos antioxidantes possuem uma função fenólica, com a capacidade de eliminar esses radicais livres (Campos et al., 2010). Assim, o efeito antioxidante do pólen de abelha é atribuído tanto à atividade de enzimas antioxidantes, bem como à presença de metabolitos vegetais secundários, como compostos fenólicos, carotenóides, vitamina C, vitamina E e glutatona (Margaoan et al., 2019).

Compostos fenólicos estão entre os antioxidantes mais estudados devido aos seus efeitos biológicos e propriedades terapêuticas, ou seja, o seu efeito quelante de metais e captadores de radicais livres ou como moduladores de atividade enzimática e protetores das vias de transdução (Valko et al., 2007). Assim, dado o seu valor medicinal e nutricional, este produto apícola é considerado um alimento e um suplemento dietético valioso (Kostic et al., 2020).

O pólen de abelha é rico em polifenóis, principalmente ácidos fenólicos, e flavonoides, como ácido cafeico, catequinas, canferol, quercetina e isorhamnetina (Kocot et al., 2018; Jannesar et al., 2017). Os compostos fenólicos podem apresentar um anel aromático simples, de baixo peso molecular, ou grandes e complexos taninos e polifenóis derivados. De acordo com o número e a disposição dos seus átomos de carbono, são classificados como flavonoides (flavonóis, flavonas, antocianinas, flavanonas, isoflavonas, entre outros) e os não flavonoides, tais como, os ácidos fenólicos, hidroxicinamatos, estilbenos, entre outros. Os flavonoides são o grupo mais comum de compostos polifenólicos na dieta humana e possuem várias atividades farmacológicas. De composição variável devido a vários fatores, o pólen apícola é composto por uma ampla gama de compostos fenólicos, como a rutina, quercetina, ácido vanílico e ácido protocatecuico (Ares et al., 2018).

## **2.2 Parâmetros de Qualidade no Pólen Apícola**

### **2.2.1 Parâmetros Microbiológicos**

Considerando que a segurança microbiológica é um dos principais critérios de qualidade dos produtos alimentares, para garantir uma utilização segura no consumo de pólen apícola, são essenciais controlos permanentes de segurança e de qualidade microbiológica do produto. A avaliação do crescimento de microrganismos é um bom indicador de segurança e garantia do cumprimento das boas práticas de higiene e de fabrico durante todo o processo produtivo, desde a recolha até ao armazenamento do produto (De-Melo et al., 2016).

A contaminação do pólen apícola por microrganismos depende não só da sua composição química e nutricional, mas também com fatores relacionados com a contaminação do produto na colmeia ou durante o processo produtivo. São várias as atividades que podem estar associadas à contaminação, tais como manipulação humana, *habitat* natural, condições sanitárias do local de produção, método de desidratação, métodos de conservação, o embalamento e o armazenamento. O grau de contaminação vai depender do nível de higiene e das precauções tomadas pelo apicultor, em todas as etapas do processo produtivo, desde a colheita do apícola até ao armazenamento (Beev et al., 2018; De-Melo et al., 2015; Liolios et al., 2022; Nogueira et al., 2012).

Tendo em conta que o pólen apícola fresco tem um elevado teor de humidade, os microrganismos como bactérias e leveduras, encontram condições adequadas ao seu crescimento, resultando na degradação da qualidade do produto (Liolios et al., 2022).

Atualmente, não existem padrões e limites de qualidade legislados na União Europeia, mas alguns países como o Brasil, a Bulgária, a Polónia, a Argentina ou a Suíça estabeleceram padrões oficiais de qualidade microbiológica do pólen apícola comercial (Campos et al., 2008; Liolios et al., 2022).

Na ausência de critérios microbiológicos específicos, o produtor deve obedecer aos padrões gerais de higiene dos géneros alimentícios, ou consultar documentação de referência como regulamentação da União Europeia ou documentos de referência nacional (Liolios et al., 2022).

Na tabela 3 estão apresentados critérios de qualidade microbiológica de acordo com linhas de orientação para a avaliação da qualidade microbiológica dos produtos prontos para consumo e critérios de referência para o pólen apícola comercial desidratado (Campos et al., 2008; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), 2019).

**Tabela 3.** Critérios de qualidade microbiológica para produtos alimentares para consumo de acordo com valores guia e de referência.

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS	CRITÉRIO DE QUALIDADE	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Salmonella</i> sp	Ausente/25g	INSA, (2019)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente/25g	Campos et al. (2008)
<i>Entobacteriaceae</i>	<10 <sup>2</sup> ufc/g	INSA (2019)
<i>Escherichia coli</i>	<10 ufc/g	Campos et al. (2008)
Microrganismos a 30°C	<10 <sup>3</sup> ufc/g	INSA, (2019)
Bolores e leveduras	<10 <sup>3</sup> ufc/g	INSA, (2019)

Os microrganismos responsáveis pela deterioração dos alimentos e de interesse sanitário diferem da fonte e das características bioquímicas. A proliferação microbiana depende das características do alimento, e o seu desenvolvimento é influenciado por parâmetros intrínsecos como o pH,  $a_w$  ou nutrientes, ou extrínsecos como é o caso da temperatura e humidade. Para a prevenção ou o retardamento dos processos de deterioração, com origem microbiana, devem ser minimizados o contacto entre microrganismos e o alimento, eliminar total ou parcialmente a microflora presente através da aplicação de métodos de conservação e diminuir a velocidade de proliferação através do ajuste das condições de armazenamento (Sinell, 1980).

A nível industrial os operadores são os responsáveis pela colocação de géneros alimentícios seguros no mercado (Regulamento (CE) nº 852/2004). A segurança alimentar é garantida pela aplicação de metodologias preventivas pela aplicação de procedimentos baseados na Análise de Perigos e Controlo de Pontos Crítico (HACCP) e aplicação das Boas Práticas de Higiene e Fabrico (BPHF) (Regulamento (CE) nº 852/2004; INSA, 2019). O controlo microbiológico é uma das

ferramentas importantes aplicadas nos controlos de qualidade e segurança alimentar permitindo avaliar quer os produtos do ponto de vista microbiológico, a adequação dos prazos estipulados para o seu consumo ou determinar o prazo de validade, como avaliar o cumprimento das BPHF, determinar uma via de contaminação do processo produtivo ou avaliar os processos de conservação (INSA, 2019; Mossel et al, 1995).

Neste trabalho generalizou-se a quantificação de determinados grupos de microrganismos, que quando presentes e em determinadas concentrações, podem fornecer informações úteis sobre a qualidade geral do alimento (Sinell, 1980).

Os microrganismos totais a 30°C ou aeróbios mesófilos são indicadores de qualidade que podem contribuir diretamente para uma avaliação da segurança dos alimentos prontos a consumir. Fornecem informações úteis sobre a adequação das BPHF e sobre a qualidade geral do alimento. São ainda utilizados na determinação do tempo de vida útil. São um grupo de organismos de baixa resistência ao calor e por isso, a sua presença após um tratamento térmico pode significar a inadequação do processo ou a ocorrência de contaminação após o processamento (Centre for Food Safety (CFS), 2014; Sinell, 1980). A sua avaliação é realizada por um método de contagem, por técnica de incorporação, de microrganismos capazes de crescer e formar colónias em meio sólido depois de incubação aeróbia a 30°C (ISO 4833-1:2003, 2003). Inclui todas as células vegetativas, esporos e bactérias, leveduras e bolores (New South Wales Food Authority, (NSWFA), 2009).

A contagem de bactérias sulfito-redutoras é utilizada como indicador de higiene em alimentos. São bactérias anaeróbias, gram-positivas e capazes de formar esporos por isso resistentes a processamento térmico (Sinell, 1980).

Os bolores e leveduras são agentes importantes de alteração sobretudo de alimentos com baixo teor de  $a_w$ , alimentos ácidos, açucarados ou fermentados (INSA, 2019). São organismos aeróbios mesófilos. Os bolores são aeróbios estritos enquanto que as leveduras são aeróbios facultativos. Têm a capacidade de se desenvolverem em condições adversas, tais como, baixas temperaturas, baixo pH e baixa atividade da água (Tournas et al., 2001). Estão presentes no meio ambiente, e podem facilmente propagar-se no alimento por contacto com equipamentos ou superfícies contaminadas, exposição ao ar ou contaminação cruzada durante o processo produtivo (INSA, 2019). A contagem de bolores e leveduras é um método de contagem por técnica de espalhamento (NP 3277-1:1987, 1987). Para valores de leveduras acima de  $10^6$  ufc/g pode ocorrer alterações de sabor e níveis compreendidos entre  $10^6$  a  $10^7$  ufc/g estão geralmente associados à deterioração do alimento devido à produção de ácido (INSA, 2019). Certos bolores, como os toxigénicos, são produtores de micotoxinas responsáveis pelas intoxicações alimentares com implicações adversas à saúde humana (Sinell, 1980; Beev et al., 2018).

Os coliformes são importantes bactérias patogênicas que podem causar doenças graves em humanos por contaminação fecal. São indicadores de qualidade sanitária e a sua presença está associada ao não cumprimento das BPHF. São ainda indicadores da presença de outros microrganismos importantes, como a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, também causadora de problemas de saúde (Beev et al., 2018; INSA, 2019).

### 2.2.2 Parâmetros Físico-Químicos

A atividade da água ( $a_w$ ), a humidade e o pH são parâmetros importantes na segurança e qualidade do pólen apícola (Beev et al., 2018).

O teor de humidade é considerado um dos principais indicadores de qualidade que afeta o tempo de prateleira do pólen apícola e aliado a elevados valores de  $a_w$ , proporcionam uma matriz favorável ao desenvolvimento de microrganismos. A transferência de humidade do ambiente para o pólen apícola pode promover o crescimento microbiano e a deterioração da qualidade do produto. Por isso, elevados teores de humidade promovem o crescimento de microrganismos, e baixos teores inibem o seu crescimento (Straumite et al., 2022). Segundo Campos et al. (2008), o teor de humidade para o pólen fresco pode variar entre os 20% e os 30%, e para o pólen desidratado recomenda valores compreendidos entre os 6% e os 8%.

A  $a_w$  mede a água disponível no alimento. Teores elevados de  $a_w$  facilitam o desenvolvimento de bolores e leveduras, responsáveis pela atividade enzimática, principal fonte da toxicidade do pólen apícola que coloca em risco o consumidor (Beev et al., 2018; Thakur e Nanda, 2020). De acordo com a bibliografia os valores de  $a_w$  do pólen apícola fresco podem variar entre 0,57 a 0,97 (Anjos et al., 2019 a; Pascoal et al., 2022) e para o pólen desidratado de 0,26 a 0,34 (Pascoal et al., 2022).

O pH é outro indicador de qualidade do pólen apícola. A maior parte dos microrganismos prefere valores de pH neutro, no entanto as leveduras desenvolvem-se entre pH de 4,0 a 4,5 e os fungos podem crescer entre 2,0 a 8,0 com preferência pelo pH ácido. Alimentos com acidez baixa prevalecem as bactérias, em alimentos ácidos são predominantes as leveduras, fungos e bactérias esporogénicas, e em alimentos com acidez muito elevada desenvolvem-se os bolores e leveduras (Beev et al., 2018; Straunite et al., 2022). Segundo Anjos et al. (2019 a) valores baixos de pH e  $a_w$  no pólen apícola desidratado, inibem o crescimento de microrganismos, diminuindo assim a possibilidade de surgirem problemas associados à qualidade do pólen apícola. Segundo a literatura os valores de pH do pólen desidratado podem variar entre 4,3 a 5,2 (Féas et al., 2012; Keskin & Ozkok, 2020).

A cor também é considerada um parâmetro de qualidade do pólen apícola. A cor relaciona-se com os pigmentos vegetais presentes em diferentes concentrações no pólen, como os

carotenoides e antocianinas (Sattler et al., 2015). O pólen apícola contém uma grande variedade de tonalidades, que varia entre o amarelo a preto, dependendo da origem vegetal. As condições de processamento podem influenciar a cor, em particular os parâmetros  $L^*$  que indica a luminosidade entre o branco ( $L^*$  igual a 100) até ao preto ( $L^*$  igual a 0) e  $b^*$  que indica a cor na região do amarelo ( $+b^*$ ) até ao azul ( $-b^*$ ). O  $a^*$  indica a cor na região do vermelho ( $+a^*$ ) até verde ( $-a^*$ ) (Thakur & Nanda, 2020).

### 2.3 Metodologias de Conservação

Como já foi referido a composição química do pólen apícola é muito variável e depende de vários fatores externos, mas também pode ser influenciada pelos métodos de conservação aplicados, principalmente se envolverem calor, ou pelo período de armazenamento (Dias et al., 2016).

O pólen apícola pode ser consumido fresco, mas devido ao seu elevado teor de humidade é considerado um produto perecível. Por isso, é comum após a sua recolha ser sujeito a um processo de desidratação com o objetivo de aumentar a sua estabilidade físico-química para evitar o desenvolvimento microbiano e assim garantir a segurança do produto a longo prazo (Anjos et al., 2019 a; Campos et al., 2008; De-Melo et al., 2016; Dias et al., 2016).

Os métodos clássicos de secagem utilizados no pólen apícola não são padronizados e têm em comum a exposição do produto a um fluxo de ar quente, durante um certo período, com a finalidade de reduzir o teor de humidade (Dias et al., 2016). Este método de secagem, denominado secagem convencional, é o método mais utilizado na indústria alimentar e é realizado normalmente numa estufa ou forno com ventilação. Apesar das suas vantagens (prático e de baixo custo), a secagem de ar quente pode levar à produção de compostos de *Maillard* e potencialmente afetar de forma negativa as características nutricionais e organoléticas, o teor de compostos bioativos de interesse como por exemplo os polifenóis, flavonoides, vitaminas e lípidos (Anjos et al., 2019 a; Keskin e Ozkok, 2020; Liolios et al., 2022; Zuluaga-Domínguez et al., 2018). No entanto, Zuluaga-Domínguez et al. (2018) defende que esta desidratação aplicada ao pólen apícola, é um dos processos físicos importantes e necessários, uma vez que, a sua ação modifica a estrutura externa do grão, a exina, que é extremamente rígida e limita a capacidade de absorção de nutrientes no trato digestivo humano. Se por um lado a temperatura de secagem deve permitir a biodisponibilidade de nutrientes para o consumidor e reduzir o teor de humidade para evitar a deterioração do produto, por outro não deve alterar compostos e propriedades de interesse sensíveis à temperatura. Para colmatar este problema relacionado com a temperatura, têm vindo a ser propostos novos métodos de desidratação, com aplicação de temperaturas baixas para reduzir o teor de humidade. A avaliação do efeito do tempo e temperatura de desidratação nas propriedades físico-químicas,

morfológicas e organolélicas são importantes para obter pólen apícola com características de elevada qualidade (Isik et al.,2018). Por isso, a liofilização é considerada um processo de desidratação alternativo, eficiente e com menos impacto negativo na alteração da composição nutricional, química e bioativa dos produtos alimentares e com a vantagem de manter as propriedades sensoriais semelhantes ao produto fresco (Dias et al., 2016; Keskin e ozkok, 2020). A desidratação é realizada pela remoção da água pelo processo de sublimação, ou seja, a água é convertida do estado sólido (congelamento) diretamente para gás, sob condições de vácuo e a temperaturas negativas. No entanto, tem a desvantagem de não ser uma opção economicamente viável para os apicultores, principalmente para os pequenos e médios produtores (De-Melo et al., 2016; Zuluaga-Domínguez et al., 2018).

Melo et al. (2016) comparou a aplicação da secagem convencional com a liofilização na qualidade físico-química, biológica e microbiológica de pólen desidratado. No geral observou que o pólen submetido ao processo de liofilização apresentou maiores teores de proteínas, lípidos, vitaminas (vit E) e compostos fenólicos. A liofilização teve também influência positiva no parâmetro da cor. Por sua vez, observou uma influência negativa na aplicação da secagem convencional nas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas do pólen apícola.

Dias et al. (2016), avaliou a influência de vários métodos de desidratação na composição química e bioativa do pólen apícola e chegou à conclusão de que, a liofilização preservou melhor as propriedades químicas e bioativas (compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante) comparado com a secagem por ar quente.

Alternativamente, a congelamento pode ser utilizada para preservar as propriedades nutricionais e organolélicas do pólen apícola. Aplicando as boas práticas de higiene e temperaturas adequadas de armazenamento, o pólen apícola, pode manter-se armazenado em congelamento até 6 meses sem perder as suas características (Anjos et al., 2019 a; Campos et al., 2021).

Anjos et al. (2019 a) avaliou o efeito de diferentes métodos de conservação no pólen apícola (congelamento vs secagem), na composição nutricional e na qualidade microbiológica. Este estudo demonstrou que o método de conservação influenciou a composição nutricional, nomeadamente a concentração de açúcares redutores, o teor de compostos fenólicos totais, de flavonoides, de lípidos e de proteínas. O pólen congelado preservou mais as propriedades nutricionais em relação ao pólen seco. No entanto, devido à maior contaminação microbiológica verificada de bolores e leveduras para o pólen apícola congelado o autor sugere que a opção mais segura ao nível da segurança alimentar seria o pólen seco.

Os consumidores na Grécia preferem consumir o pólen apícola fresco devido às suas características sensoriais e valor nutricional. O facto de o pólen apresentar um substrato ideal

para o crescimento microbiano, devido ao seu teor elevado de humidade, limita a opção de consumo deste produto em fresco, e neste caso pode ser utilizado o processo de conservação mais eficaz e com menor impacto na composição química e nutricional que é a congelação. A congelação a -20°C, ou a temperaturas inferiores, inibem o crescimento microbiano devido às baixas temperaturas e à ausência de água no estado líquido (Liolios et al., 2022).

## **2.4 Normas de Segurança Alimentar**

A atividade apícola é praticada em todos os Estados Membros e é normalmente caracterizada pela diversidade das condições de produção. Embora exista legislação que regule o setor apícola na União Europeia, existe uma lacuna na regulamentação específica para a comercialização do pólen apícola. Como o pólen apícola é um produto natural e com uma composição química muito variável, é difícil a sua padronização (Anjos et al., 2017; Campos et al., 2008).

Países como a Polónia, Bulgária, Suíça e Brasil, propõem um conjunto de requisitos mínimos para a apresentação e comercialização do pólen apícola, sendo que em alguns deles estes requisitos de qualidade são regulamentados (Campos et al., 2008).

O desejável é que estas regras sejam uniformizadas e aplicadas a todos os países para garantir, de forma transversal, a qualidade e segurança alimentar na comercialização do pólen apícola (Kieliszek et al., 2018; Kostic et al., 2020).

Neste sentido, a Organização Internacional de Padronização, através de um subcomité técnico de produtos apícolas, criou a norma ISO/TC 34/SC 19, com o objetivo de padronizar todos os processos associados aos produtos apícolas, para melhorar e garantir a qualidade dos produtos. Atualmente está a ser elaborada a ISO/WD 24382, que irá incluir todas as especificações relacionadas com o pólen de abelha com o objetivo de estabelecer limites máximos aceitáveis de contaminantes e de humidade, assim como o estabelecimento de boas práticas de fabrico, armazenagem e processos de secagem (Anjos et al., 2022; ISO/TC 34/SC 19:2017 (2017); Vegh, 2021)

Apesar de voluntária, a padronização permitirá, num futuro próximo, regular a comercialização garantindo não só o estabelecimento de parâmetros de qualidade no processo produtivo, mas também no produto acabado, dando maior confiança aos consumidores (Anjos et al., 2022).

Para colmatar a falta de informação, vários autores como Campos et al. (2008), têm vindo a propor nos seus trabalhos critérios de qualidade para o pólen apícola, metodologias padronizadas e otimizadas do processo produtivo e de métodos analíticos de parâmetros de qualidade (Campos et al., 2008; Campos et al., 2021). A nível nacional existem vários projetos e manuais técnicos desenvolvidos por várias organizações e entidades, de consulta pública e com

carácter orientador e sensibilizador direccionados para os apicultores, que abordam temas como boas práticas de fabrico, de segurança e saúde no trabalho, parâmetros de qualidade e valores de referência (GPP, 2019).

Segundo Campos et al. (2008), as principais fontes de contaminação do pólen apícola, e as que são mais difíceis de controlar, são os metais pesados e pesticidas provenientes do ambiente e das práticas agrícolas. Relativamente às fontes de contaminação secundária, são consideradas as mesmas que para outros géneros alimentícios, que surgem pelo incumprimento das medidas preventivas nos sistemas de gestão e segurança alimentar, como Boas Práticas Agrícolas (BPA) e as Boas Práticas de Higiene e de Fabrico (BPHF) e considera a segurança microbiológica um dos principais requisitos de qualidade.

## **2.5 Aplicações do Pólen Apícola em Alimentos**

O crescente interesse do consumidor na procura de uma alimentação mais saudável, incluindo na sua dieta produtos naturais, ecológicos e com propriedades benéficas para a sua saúde, tem influenciado a comunidade científica e indústria alimentar a estudar a incorporação de alimentos com interesse nutricional e bioativos (Camacho-Bernal et al., 2021).

O pólen apícola tem a vantagem de poder ser consumido diretamente, por ser considerado um produto funcional, rico nutricionalmente e com propriedades benéficas para a saúde, mas pode ser uma alternativa de aplicação no desenvolvimento de novos produtos alimentares com o objetivo de melhorar a qualidade do produto e a componente nutricional (Adaskeviciute et al., 2019; Camacho-Bernal et al., 2021). Um dos exemplos de aplicação do pólen apícola na alimentação foi desenvolvido por Anjos et al. (2019 b), que estudou adição do pólen apícola, como antioxidante natural, no processo produtivo de um enchido designado morcela. Os resultados mostraram influência positiva na prevenção da oxidação lipídica do produto final. O autor concluiu que o uso do pólen apícola na produção de morcela melhorou a qualidade e aceitabilidade sem alterar o seu sabor característico deste tipo de enchido. Ao avaliar o tempo de prateleira do produto concluiu que o pólen apícola pode ser uma alternativa natural, aplicado como antioxidante prevenção da oxidação lipídica do produto final.

Outro exemplo é o estudo realizado por Brochard et al. (2021), em que aplicou o pólen apícola no enriquecimento de massas alimentícias, junto com farinha de castanha e avaliou as propriedades físico-químicas dos novos produtos desenvolvidos. Concluiu que, a incorporação de pólen em pó em massas alimentícias tem influência positiva nas características que definem uma massa alimentícia de alta qualidade (firmeza, elasticidade e tempo ótimo de cozimento). Ainda verificou efeitos positivos na intensificação da cor do produto final, tanto em massas secas como em massas frescas.

Heldt et al. (2019), avaliou a capacidade do extrato de pólen de abelha, como antioxidante natural, aplicado na produção do hambúrguer de bovino, durante o processo produtivo e armazenamento em congelação. Verificou que os hambúrgueres que continham extrato de pólen apícola inibiram a oxidação lipídica do produto, aumentando o tempo de vida útil.

Conte et al. (2018), estudou a adição de diferentes concentrações de pólen na produção de pão sem glúten e avaliou as propriedades físico-químicas, tecnológicas e sensoriais dos produtos desenvolvidos. Observou que a adição do pólen não alterou as propriedades reológicas e melhorou as características tecnológicas, sensoriais e a aceitabilidade do produto.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

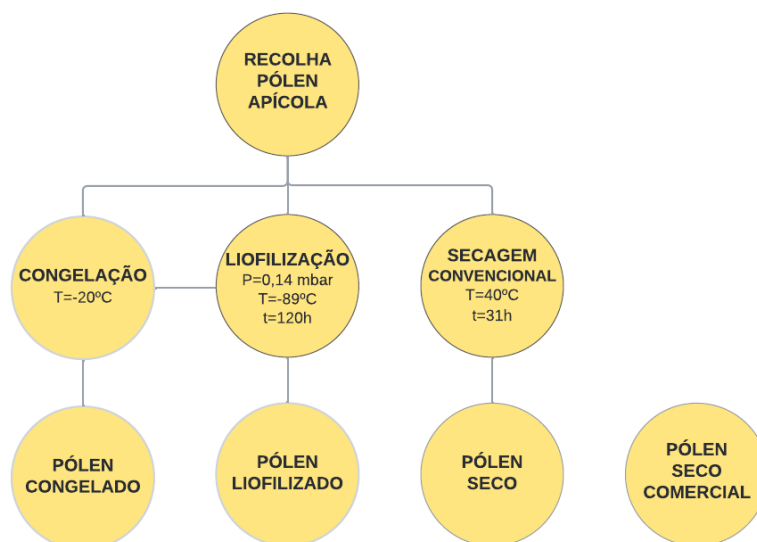
#### 3.1 Preparação de Amostras

O pólen apícola foi colhido fresco de colmeias localizadas na Freguesia de A-dos-Francos, pertencente ao concelho de Caldas da Rainha (39°19'27"N 9°1'10"W) (Figura 4), durante o mês de outubro de 2019, tendo sido mantida à temperatura de refrigeração durante o seu transporte até ao laboratório.



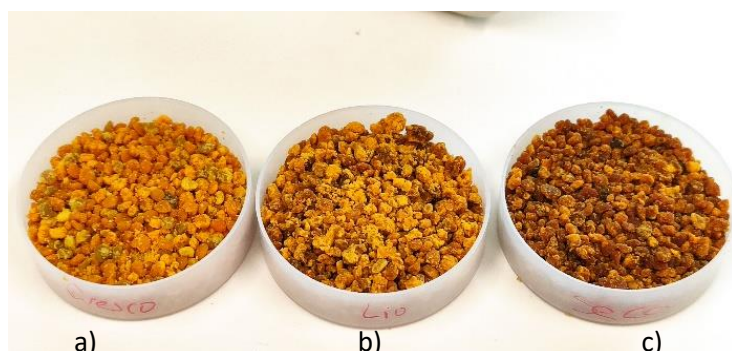
**Figura 4.** Localização da recolha do pólen apícola (fonte: google maps).

As amostras em laboratório foram submetidas a três diferentes técnicas de conservação, tais como, congelação a -20°C (ACE/400 SP APO), liofilização a 0,140 mbar e -89°C, durante 120 horas (Labconco, Freezezone 6 Plus) e secagem de ar quente (Klarstein, Master Jerky 300), em secador protótipo com fluxo de ar forçado, sem controlo de humidade durante 32 horas a 40°C, conforme descrito na figura 5.



**Figura 5.** Esquema de preparação de amostras de pólen apícola.

As amostras desidratadas (figura 6) foram embaladas a vácuo (Henkelmann, Marlin 42) e armazenadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 1 ano. As amostras congeladas (figura 6) permaneceram a -20 °C durante 1 ano.



**Figura 6.** Amostra de pólen apícola submetidas a diferentes processos de conservação, a) congelação, b) liofilização e c) secagem por ar quente).

Durante o presente trabalho foi utilizada a nomenclatura representada na tabela 4 para as diferentes amostras analisadas de pólen apícola.

**Tabela 4.** Nomenclatura atribuída a cada amostra analisada de pólen apícola.

AMOSTRA	NOMENCLATURA
Pólen congelado	PC
Pólen liofilizado	PL
Pólen seco	PS
Pólen seco comercial (controlo)	PSC

### 3.2 Desenho Experimental

No presente estudo foram realizados ensaios para a caracterização físico-química e composição nutricional, avaliação de parâmetros microbiológicos e avaliação das propriedades bioativas de amostras de pólen apícola submetidas a vários processos de conservação e armazenadas por um período de um ano. O pólen apícola comercial foi utilizado como controlo na avaliação das propriedades bioativas. O desenho da parte experimental está representado na figura 7.



Figura 7. Desenho experimental.

### 3.3 Avaliação da Qualidade Microbiológica

Foram avaliados microrganismos indicadores da qualidade comercial das várias amostras de pólen apícola (pólen congelado, pólen liofilizado e pólen seco), nomeadamente microrganismos a 30°C (aeróbios mesófilos) e bolores e leveduras. Foram também avaliados microrganismos de qualidade sanitária (coliformes totais e estafilococos coagulase positiva) e microrganismos indicadores de segurança (clostrídios sulfito-redutores). Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicado.

#### 3.3.1 Preparação das Amostras e Meios de Cultura

A preparação das amostras foi realizada de acordo com a Norma Portuguesa NP 1829:1982 (1982). Todos os diluentes e meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes e esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 minutos (figura 8).

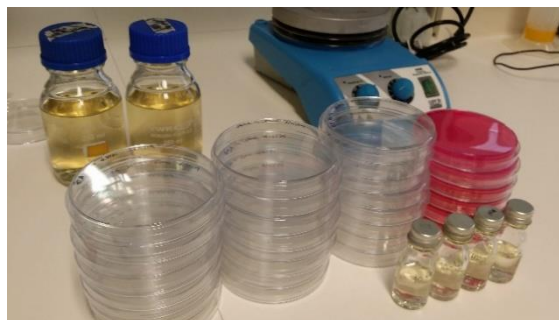


Figura 8. Preparação dos meios de cultura e diluentes.

#### 3.3.2 Contagem de Microrganismos Totais a 30°C

A contagem de microrganismos totais a 30°C, ou contagem de aeróbios mesófilos, foi realizada de acordo com a norma EN ISO 4833-1:2013 (2013).

Resumidamente, foram realizadas diluições decimais até à diluição  $10^{-5}$  tendo sido plaqueado, por incorporação 1ml de cada diluição em meio Plate Count Agar (VWR). As placas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 72 horas. A contagem das colónias foi realizada através da Equação 1 e os resultados expressos por UFC/g de pólen.

$$n = \frac{\sum c}{(1n_2 + 0.1n_1)d} \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

$n$  – Soma das colónias em todas as placas contadas.

$n_1$  – Número de placas contadas da primeira diluição.

$n_2$  - Número de placas contadas da segunda diluição.

$d$  – Diluição a partir da qual foram obtidas as primeiras contagens.

### **3.3.3 Contagem de Bolores e Leveduras**

A contagem de bolores e leveduras foi realizada de acordo com as normas NP 3277-1:1987 (1987).

Foram transferidos 1 ml de cada diluição decimal, até  $10^{-5}$ , para placas de Petri contendo meio de cultura *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (VWR), utilizando como técnica a sementeira por espalhamento. As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 120 horas. A contagem das colónias foi realizada através da Equação 1 e os resultados expressos por UFC/g de pólen.

### **3.3.4 Contagem de Coliformes Totais**

A contagem de coliformes totais foi realizada de acordo com a norma ISO 9308-1:2014 (2014). Foram transferidos 1 ml de cada diluição decimal, até  $10^{-5}$ , para placas de Petri contendo meio de cultura *Chromocult*® Coliforme Agar (MERCK), utilizando como técnica a sementeira por incorporação com dupla camada de meio de cultura. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. A contagem das colónias foi realizada através da Equação 1 e os resultados expressos por UFC/g.

### **3.3.5 Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva**

A contagem de estafilococos coagulase positiva foi realizada com base na norma ISO 6888-2:1999 (1999) /Adm 1: (2003), com adaptações (Mauriello et al., 2017; De-Melo et al., 2015). Foram transferidos 1 ml de cada diluição decimal, até à diluição até  $10^{-5}$ , para placas de Petri contendo meio de cultura *Baird Parker* agar base (VWR) com suplemento de gema de ovo, utilizando como técnica a sementeira por incorporação. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas a 48 horas. A contagem das colónias foi realizada através da Equação 1 e os resultados expressos por UFC/g.

### **3.3.6 Contagem de Clostrídios Sulfito-Redutores**

A Contagem de clostrídios de sulfito-redutores foi realizada de acordo com a norma ISO 15213:2003 (2003).

Foram transferidos 1 ml de cada diluição, até  $10^{-5}$ , para placas de Petri contendo meio de cultura *Reinforced Clostridial Medium* (VWR), utilizando como técnica a sementeira por incorporação com dupla camada de meio de cultura. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas a 48 horas. A presença de colónias negras nas placas são correspondem um resultado positivo para clostrídios sulfito redutores. A contagem das colónias foi realizada através da Equação 1 e os resultados expressos por UFC/g.

### 3.4 Caracterização Físico-Química

As amostras de pólen congelado, pólen liofilizado e pólen seco foram submetidas à caracterização química através da determinação do teor de humidade, determinação de pH e determinação da atividade da água ( $a_w$ ). Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicado.

#### 3.4.1 Humidade

A determinação do teor de humidade foi realizada segundo o método descrito pela AOAC (1995). O método consiste na secagem de aproximadamente 2 g de amostras em estufa (Binder), à temperatura de 105°C durante 24 horas, com ar forçado sem controlo de temperatura. O teor de humidade foi calculado e expresso em (%) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de Humidade (\%)} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

$P_1$  – Massa tara do recipiente (g)

$P_2$  – Massa do recipiente com a amostra (g)

$P_3$  – Massa da amostra após a secagem (g) (tara do recipiente + peso da amostra após a secagem)

#### 3.4.2 pH

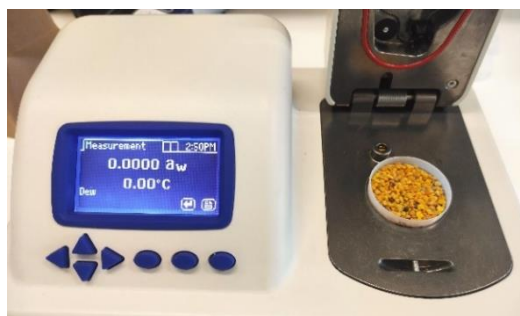
A determinação do pH realizou-se por método potenciométrico de acordo com Anjos et al. (2019 a). Foram realizadas soluções aquosas das várias amostras de pólen (10 g de amostra em 75 ml de água destilada) e analisadas através de um potenciómetro (Crimson C931) (figura 9).



Figura 9. Determinação do pH das amostras de pólen apícola

#### 3.4.3 Atividade Água

A atividade da água ( $a_w$ ) foi determinada através de um medidor (Aqua Lab 4TE) (Zenebon et al., 2008) (figura 10).



**Figura 10.** Determinação da atividade da água.

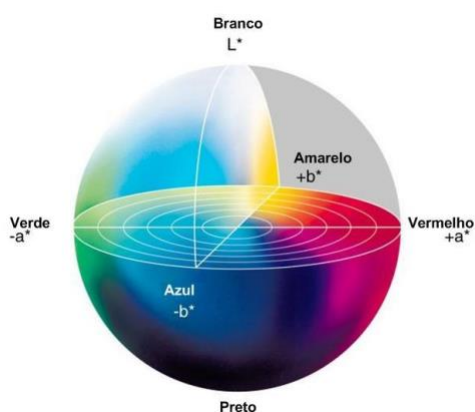
### 3.4.4 Cor

A cor das amostras de pólen foi determinada de acordo com a escala CieLab, recorrendo-se a um colorímetro (Konica Minolta, CR-400) (figura 11), segundo o sistema de cor proposto pela *Comission Internationale L'Eclairage* (CIE).



**Figura 11.** Determinação da cor das amostras de pólen apícola.

Este sistema de cores baseia-se numa representação cartesiana sequencial ou contínua de 3 eixos ortogonais:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , conforme ilustra a figura 12.



**Figura 12.** Representação do Espaço de Cor CieLab (Fonte: Konica Minolta).

O  $a^*$  indica a cor na região do vermelho ( $+a^*$ ) até verde ( $-a^*$ ). O  $b^*$  indica a cor na região do amarelo ( $+b^*$ ) até ao azul ( $-b^*$ ). O  $L^*$  indica a luminosidade varia entre o branco ( $L^*$  igual a 100) até ao preto ( $L^*$  igual a 0). O equipamento foi calibrado usando uma placa branca refletora padrão (Mahy et al., 1994; Thakur & Nanda, 2020). Foram realizadas dez leituras de cada amostra de pólen apícola.

### 3.5 Composição Nutricional

De forma a caracterizar as propriedades nutricionais das diferentes amostras de pólen apícola foram realizadas análises químicas aos seus nutrientes por um laboratório externo certificado. Os métodos utilizados pelo laboratório externo na determinação dos vários parâmetros estão referidos da tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros de análise e metodologias aplicadas pelo laboratório externo para a determinação da composição nutricional das várias amostras de pólen.

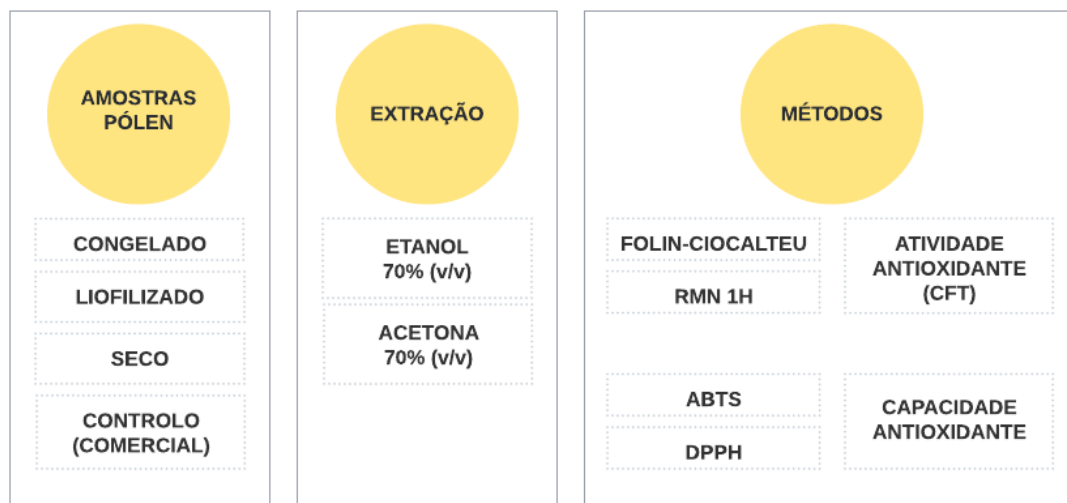
ENSAIOS	MÉTODO	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Valor energético	Cálculo	Reg. (EU) n.º 1169/2011 (2011)
Hidratos de carbono		Reg. (EU) n.º 1169/2011 (2011)
Açúcares totais	Gravimetria	Bogdanov et al. (1997)
Humidade	Gravimetria	AOAC, (2005)
Proteína Bruta (N*6.25)	Dumas	AOAC 984.13
Cinzas	Gravimetria	AOAC 968.08
Lípidos	Hidrólise e Soxhlet	AOAC 920.39
Ácidos gordos saturados	Cromatografia Gasosa	AOAC 996.06
Ácidos gordos polinsaturados		
Ácidos gordos monoinsaturados		
Sal	Absorção Atómica	AOAC, (2005)
Sódio		
Açúcares redutores	Volumetria	Campos et al. (2021)
Vitamina C (ácido ascórbico)	HPLC	AOAC 967.21
Vitamina E (soma de isómeros)	HPLC	AOAC 2012.10
Alfa-tocoferol		
Beta-gamma tocoferol		
Delta-tocoferol		
Vitamina B	HPLC	AOAC 953.17
Vitamina B1 (Tiamina)		
Vitamina B2 (Riboflavina)		
Vitamina B3 (Niacina)		
Vitamina B5 (Ácido pantoténico)		
Vitamina B6 (Piridoxina)		
Vitamina B9 (Ácido fólico)		

### 3.6 Avaliação das Propriedades Bioativas - Atividade e Capacidade Antioxidante

O estudo da atividade antioxidante foi realizado através da avaliação do conteúdo fenólico total (CFT), estimado espectrofotometricamente pelo método de *Folin-Ciocalteu* e por espectrofotometria de ressonância magnética (RMN 1H), enquanto a capacidade antioxidante foi determinada pelo método ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) e pelo método DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ambos os métodos medem as atividades de eliminação dos radicais livres (figura 13).

As extrações de compostos nas diferentes amostras de pólen apícola foram realizadas com dois solventes diferentes, o etanol e a acetona, na razão de 1:10 (1 g de pólen em 10 ml de solvente), (figura 13).

Os resultados obtidos foram comparados com amostra de pólen comercial desidratado, submetidas ao mesmo procedimento.

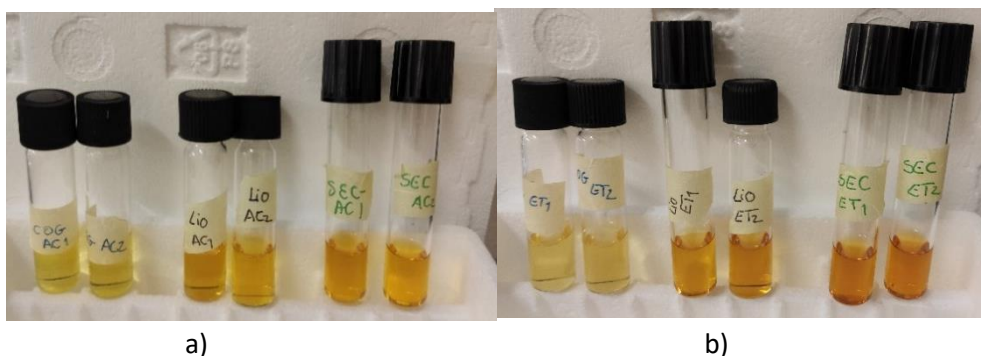


**Figura 13.** Esquema representativo das metodologias utilizadas na avaliação da atividade e capacidade antioxidante para as diferentes amostras de pólen apícola estudadas.

### 3.6.1 Preparação dos Extratos Etanólicos (EE) e Extratos Cetónicos (EC)

A preparação dos extratos etanólicos (EE), (etanol:água, 70:30 (v/v)) e extratos cetónico (EC) (acetona:água, 70:30 (v/v)), das diferentes amostras de pólen apícola, foi realizada de acordo com a metodologia de Ribeiro et al. (2014), com algumas adaptações.

Preparou-se 1 g de amostra (Mettler Toledo – modelo AE200-S), triturada por pressão manual mecânica com recurso a um almofariz com pilão e diluída em 10 ml de solvente num frasco de vidro graduado. A solução foi submetida a agitação magnética durante 1 hora a 9000 rpm (agitador magnético J.P. Selecta), protegida da luz e à temperatura ambiente. Os extratos foram centrifugados a 3000 rpm, a 20°C durante 5 minutos (Heraeus Labofuge 200). Os sobrenadantes foram recolhidos e filtrados com papel de filtro 90 mm de diâmetro (Xinxing 202 Moderate). Os extratos obtidos foram diluídos nos respetivos solventes, e mantidos ao abrigo da luz, até serem realizados os ensaios para a determinação da atividade e capacidade antioxidante (Follin-Ciocalteu, ABTS e DPPH) (figura 14).



**Figura 14.** Extratos cetônicos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco (a); Extratos etanólicos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco (b).

Para os ensaios de RMN foram usados solventes deuterados na preparação dos extratos etanólicos e cetônicos.

Na determinação da atividade e capacidade antioxidante foram preparados extratos etanólicos e cetônicos de amostras de pólen seco comercial usadas como controlo para comparação de resultados. Foram realizados triplicados de todas as amostras de pólen.

### 3.6.2 Avaliação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

#### 3.6.2.1 Quantificação de CFT - Método Espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*

Os compostos fenólicos dos extratos de pólen apícola em etanol a 70% (v/v) e em acetona a 70% (v/v), foram quantificados pelo método de *Folin-Ciocalteu* descrito por Singleton & Rossi (1965) com adaptações de Brito et al. (2021). O método baseia-se na reação dos compostos fenólicos com o reagente *Folin-Ciocalteu* para produzir fosfomolibdato e fosfotungstato, complexos de cor azul, detetados espectrofotometricamente a 750 nm.

Várias alíquotas dos extratos de pólen apícola e soluções padrão de ácido gálico nas respetivas concentrações, 0,03; 0,05; 0,10; 0,25; e 0,50 mg/L, foram misturados com o reagente *Folin-Ciocalteu*. Foram adicionados às soluções carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (70,0 g/L) e água ultrapura Milli-Q, e após homogeneização procedeu-se a uma incubação de 60 minutos, a 20°C, no escuro. As amostras de controlo foram preparadas com os solventes etanol a 70% (v/v) e acetona a 70% (v/v) diluídos no reagente *Folin-Ciocalteu*.

A curva de calibração foi obtida através do padrão ácido gálico. A quantificação dos polifenóis totais (QTP) foram expressos em grama de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra de pólen (g GAE/100g). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

A quantificação dos polifenóis totais para os extratos etanólicos de pólen foi calculada através da Equação 4, resultante da equação da reta de calibração ( $y=2,4995x-0,0209$ ) (Figura 17 do anexo A), tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

$$QTP = \left[ \frac{\frac{Abs-0,0209}{2,4995}}{CE \times 10} \right] \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde,

QTP – Quantificação de polifenóis totais

Abs – absorvância de cada amostra a 750 nm

CE – Concentração de extrato

A quantificação dos polifenóis totais para os extratos cetônicos de pólen foi calculada através da Equação 5, resultante da equação da reta de calibração ( $y=2,925x-0,0035$ ) (Figura 18 do anexo A), tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

$$QTP = \left[ \frac{\frac{Abs-0,0035}{2,925}}{CE \times 10} \right] \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde,

QTP – Quantificação de polifenóis totais

Abs – absorvância de cada amostra a 750 nm

CE – Concentração de extrato

### 3.6.2.2 Método Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H)

O ensaio de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi adaptado de Cristophoridou & Dias (2009).

As soluções de RMN foram preparadas em solventes deuterados de etanol-d6 70% (v/v) e acetona-d6 70% (v/v). Os espectros 1D 1H RMN foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 400, operando a 400,13 MHz, a 25°C, utilizando uma sequência de impulso com gradientes zgpr. A aquisição de dados 1D foi realizada com 16K pontos complexos, com um total de 512 scans, uma janela espectral de 6402 Hz e um tempo de relaxação de 2 segundos.

Os dados finais foram processados e analisados com um Topspin v4.0 (Bruker) e MestReNova 9.1 (Mestrelab). Os desvios químicos foram apresentados em ppm.

### 3.6.3 Determinação da Capacidade Antioxidante

#### 3.6.3.1 Método de Redução do Radical ABTS

O método ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylben zothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante das amostras de pólen apícola. O procedimento utilizado baseou-se no método descrito por Re et al. (1999), com algumas adaptações, e tem

como base a avaliação da capacidade que uma amostra tem de inibir o radical ABTS●+ em comparação com um antioxidante padrão o Trolox. O ABTS●+ é um radical livre sintético de coloração verde-azulada, e a capacidade antioxidante da amostra depende da sua capacidade de reduzir ou eliminar o radical. Quanto maior a descoloração verificada, maior será a atividade existente na amostra (Floegel et al., 2011); Re et al., 1999).

Iniciou-se o procedimento com a preparação da solução concentrada de ABTS. Em ambiente escuro foi preparada uma solução de ABTS (7 mM) com solução de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) (2,45 mM). As duas soluções foram adicionadas num mesmo tubo de vidro, deixando-o em repouso durante 16 horas à temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente, foi realizada a filtração de aproximadamente 2 ml da solução ABTS concentrado, através de seringa com filtro (0,22  $\mu$ m), à qual foi adicionada 200 ml de água ultrapura MilliQ, cujo objetivo da diluição foi obter uma solução com valores de absorvância de  $0,700 \pm 0,020$ , para um comprimento de onda de 734 nm. O método consistiu na adição de 1 ml da solução diluída de ABTS a 20  $\mu$ L de extrato na mesma cuvete descartável (Brand standard – PMMA semi-micro, Sigma - Aldrich). Em cada cuvete foi colocado Parafilm®, de forma a evitar contacto com o oxigénio, e agitaram-se manualmente. Após 6 minutos, tempo em que decorreu a reação, procedeu-se à leitura das soluções a 734 nm em espectrofotómetro (Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible). A amostra controlo foi submetida tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo apenas o extrato por água ultrapura MilliQ.

As retas de calibração para cada um dos solventes utilizados (Figuras 19 e 20 do anexo B), foram preparadas com o padrão Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic ácido) (0,03, 0,05, 0,010, 0,25 e 0,50 g/L). Foram utilizadas amostras de controlo diluídas na solução de ABTS de etanol a 70% (v/v) e acetona a 70% (v/v). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

Para calcular a atividade antioxidante (AA) dos extratos etanólicos e cetónicos foi calculado previamente a percentagem de inibição (PI), pela Equação 6.

$$PI = \frac{Abs\ r - Abs\ a \times 100}{Abs\ r} \quad \text{Equação 6}$$

Onde,

Abs r - Absorvância inicial da solução de ABTS.

Abs a – Absorvância da solução após 6 minutos.

A atividade antioxidante foi calculada para os extratos etanólicos através da Equação 7 e para os extratos cetónicos através da Equação 8.

$$AA = \left[ \frac{PI-3,4637}{\frac{317,33}{CE \times 10}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde,

AA – Atividade antioxidante

PI – Percentagem de inibição

CE – Concentração de extrato

$$AA = \left[ \frac{PI-6,5143}{\frac{114,24}{CE \times 10}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde,

AA – Atividade antioxidante

PI – Percentagem de inibição

CE – Concentração de extrato

Os resultados correspondentes à atividade antioxidante foram expressos em g de TEAC (Capacidade antioxidante equivalente Trolox) por 100 g de amostra, utilizando uma reta de calibração para o solvente etanol (Figura 19, anexo B), com a seguinte equação  $y=317,33x+3,4637$  e uma a reta de calibração para o solvente acetona (Figura 20, anexo B), com a seguinte equação  $y=114,24x+6,5143$ , tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

### 3.6.3.2 Método DPPH

O método da capacidade de redução do radical DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*), é um método espectrofotométrico baseado na redução do radical estável (DPPH), por um antioxidante, permitindo estimar a capacidade antioxidante da amostra. O radical apresenta uma forte cor púrpura que muda para amarelo após reação com compostos antioxidantes (Noipa et al., 2011). O ensaio foi realizado segundo o método descrito por Re et al. (1999), com adaptações (Ribeiro et al., 2014).

Foram preparadas duas soluções de 0,099 mM de DPPH em etanol a 70% (v/v) e em acetona a 70% (v/v), de forma a obter valores de absorvância na gama de  $0,500 \pm 0,040$ . Foram introduzidos 3,90 ml da solução de DPPH, diluída com 0,10 ml de cada extrato, em tubos de vidro rolhados. Os tubos foram agitados em vortex e colocados em repouso, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorvância foi medida a 515 nm (Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible) em cuvettes de vidro utilizando as amostras controlo. As diferentes amostras foram analisadas em triplicado.

Os resultados foram expressos em gramas TEAC por 100 g de amostra, e para o solvente etanol (70% v/v) a atividade antioxidante foi calculada através da Equação 8, resultante da equação da reta de calibração ( $y=416,23 x +8,4379$ ) (Figura 21 do anexo C), para o solvente acetona a 70% (v/v) a atividade antioxidante foi calculada através da Equação 9, resultante da equação da reta de calibração ( $y=134,7 x + 10,293$ ) (Figura 22 do anexo C), tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

$$AA = \left[ \frac{\text{Abs}-8,4379}{\frac{416,23}{\text{CE} \times 10}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde,

AA – Atividade antioxidante

Abs – absorvância de cada amostra a 515 nm

CE – Concentração de extrato

$$AA = \left[ \frac{\text{Abs}-10,293}{\frac{134,7}{\text{CE} \times 10}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Onde,

AA – Atividade antioxidante

Abs – absorvância de cada amostra a 515 nm

CE – Concentração de extrato

### 3.7 Análise Estatística

Os ensaios para a determinação da composição físico-química, (humidade,  $a_w$  e pH), foram realizados em triplicado, exceto e cor ( $n=10$ ). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, EUA).

Os ensaios para a avaliação das propriedades bioativas do pólen apícola, atividade e capacidade antioxidante, foram realizados em triplicado e os resultados foram apresentados com a média  $\pm$  desvio-padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo amostras de pólen apícola foram submetidas a diferentes técnicas de conservação, nomeadamente, congelação, desidratação por secagem convencional e desidratação por liofilização. Posteriormente foi avaliada a influência dos processos de conservação na qualidade microbiológica, na composição química e nutricional e na atividade e capacidade antioxidante após um ano de armazenamento das amostras.

### 4.1 Avaliação da Qualidade Microbiológica

Ao longo do processo produtivo o pólen apícola é exposto a possíveis contaminações microbiológicas, desde a recolha até ao embalamento. A origem destas contaminações deve-se a diversos fatores como por exemplo, ambientais ou ação humana, por contaminação das abelhas e condições de higiene nas várias etapas do processo produtivo, tais como, recolha, processamento, embalamento e armazenamento. As primeiras fases que antecedem a desidratação do pólen apícola são consideradas particularmente importantes para o estado de higiene do produto, por isso, de extrema importância a aplicação das BPHF (Liolios et al., 2022). Os operadores têm a responsabilidade de produzir e colocar no mercado produtos de qualidade e seguros para o consumidor. Desta forma, e para avaliar a segurança microbiológica do pólen apícola foram estudados os parâmetros microbiológicos indicadores gerais de qualidade, os indicadores de qualidade sanitária e os indicadores de segurança.

Na tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos para os parâmetros microbiológicos do pólen apícola sujeito a diferentes processos de conservação.

**Tabela 6.** Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos nas amostras de pólen congelado, pólen liofilizado e seco, após um ano de armazenamento (n=3).

PARÂMETRO	PÓLEN		
	CONGELADO	LIOFILIZADO	SECO
Contagem de microrganismos totais a 30°C (ufc/g)	4,40 x10 <sup>1</sup>	3,00x10 <sup>1</sup>	4,43x10 <sup>1</sup>
Contagem de bolores e leveduras (ufc/g)	3,20 x10 <sup>1</sup>	<10	< 10
Contagem de coliformes totais (ufc/g)	< 10	< 10	< 10
Contagem de estafilococos coagulase positiva (ufc/g)	< 10	< 10	< 10
Contagem de clostrídios sulfito-redutores (ufc/g)	< 10	< 10	< 10

Devido à falta de padrões oficiais legislados na UE, no que respeita à qualidade microbiológica para a colocação do pólen apícola no mercado, os resultados obtidos foram comparados com valores-guia de documentos de referência nacionais e com os resultados da avaliação microbiológica do pólen apícola de outros estudos.

De acordo com os resultados obtidos (tabela 6), foi observado a presença de microrganismos a 30°C nas amostras de pólen apícola congelado (4,40x10<sup>1</sup> ufc/g), liofilizado (3,00x10<sup>1</sup> ufc/g) e seco

( $4,43 \times 10^1$  ufc/g). Autores como Zuluaga-Dominguez et al. (2018), detetou níveis mais elevados no pólen fresco ( $3,00 \times 10^5$  ufc/g) e seco a  $40^\circ\text{C}$  ( $1,00 \times 10^4$  ufc/g), ou Anjos et al. (2019 a), que observou a variação de aeróbios mesófilos de  $1,09 \times 10^2$  a  $1,23 \times 10^3$  ufc/g, no pólen congelado, e  $2,87 \times 10^1$  a  $1,01 \times 10^3$  ufc/g, para amostras de pólen desidratado. Embora presentes em todas as amostras de pólen apícola estudadas, de acordo com o INSA, (2019), este parâmetro microbiológico encontra-se num nível de qualidade microbiológico considerado satisfatório ( $<10^3$  ufc/g), para alimentos colocados no mercado e prontos para consumo.

Foi ainda observado a influência dos processos de conservação por liofilização e secagem convencional na redução da carga microbiana de bolores e leveduras nas amostras de pólen liofilizado ( $<10^1$ ) e seco ( $<10^1$ ) em relação ao pólen congelado ( $3,20 \times 10^1$  ufc/g). A carga inicial de bolores e leveduras no pólen congelado está num nível de qualidade considerado satisfatório para este parâmetro ( $<10^3$  ufc/g para leveduras, e  $<5 \times 10^2$  para bolores) (INSA, 2019). De-Melo et al. (2016) ao avaliar a influência de diferentes métodos de desidratação na qualidade microbiológica do pólen apícola, observou contagens superiores de bolores e leveduras em amostras liofilizadas ( $1,6 \times 10^1$  a  $9,0 \times 10^2$  ufc/g) e em pólen seco ( $9,0 \times 10^1$  a  $2,4 \times 10^2$  ufc/g).

Relativamente às cargas microbianas dos parâmetros de qualidade sanitária (coliformes totais e estafilococos coagulase positiva) e os parâmetros de segurança (clostrídios sulfito redutores), não foram detetados nas amostras analisadas de pólen apícola. No estudo realizado por Barbara et al. (2015), na avaliação microbiológica de pólen desidratado foi verificada a ausência de coliformes fecais e clostrídios sulfito redutores. Já Coronel et al. (2004), detetou no seu estudo contaminação por coliformes totais em vinte e três amostras de pólen apícola desidratado, o que sugere a possibilidade de ocorrer contaminação microbiana associadas, principalmente, às etapas de processamento do pólen apícola.

Uma elevada carga microbiana, principalmente aeróbios mesófilos, pode indicar más práticas de higiene e fabrico no processo produtivo, ou aplicação inadequada de binómios de tempo e temperatura nos processos de desidratação, ou ainda um ineficaz armazenamento. (Anjos et al., 2019 a; Zuluaga-Dominguez et al., 2018; Kieliszek et al., 2018). Os resultados bastante satisfatórios de parâmetros indicadores gerais de qualidade comercial, indicadores de qualidade sanitária e de segurança, determinam a elevada qualidade microbiológica das diferentes amostras de pólen apícola avaliadas neste estudo.

#### **4.2 Caracterização Físico-Química**

Para avaliar as características físico-químicas do pólen apícola foram determinados parâmetros como o teor de humidade, atividade da água ( $a_w$ ), pH e cor, em dois momentos de análise, no

momento zero e após 360 dias de armazenamento. Neste trabalho, o controle destes parâmetros permitiu não só a avaliação na perspectiva da segurança alimentar, mas também do efeito dos vários processos de conservação na composição físico-química do pólen apícola (tabela 7).

**Tabela 7.** Parâmetros físico-químicos das amostras de pólen congelado e amostras de pólen desidratados (liofilizado e seco), após um ano de armazenamento. (Diferentes símbolos na mesma coluna indicam diferenças significativas (( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey; Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas (( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey) (t<sub>0</sub>: 0 dias; t<sub>1</sub>: 360 dias).

	HUMIDADE		A <sub>w</sub>		PH	
	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>
	MÉDIA (%) (D.P.)		MÉDIA (D.P.)		MÉDIA (D.P.)	
Pc	32,66±0,14 <sup>Bα</sup>	33,18±0,16 <sup>Aα</sup>	0,80±0,01 <sup>Aα</sup>	0,83±0,03 <sup>Aα</sup>	5,03±0,01 <sup>Aα</sup>	3,96±0,01 <sup>Bμ</sup>
Pl	9,96±0,18 <sup>BΩ</sup>	15,73±0,07 <sup>Aμ</sup>	0,15±0,06 <sup>BΩ</sup>	0,48±0,00 <sup>Aμ</sup>	5,05±0,01 <sup>Aα</sup>	4,14±0,01 <sup>Bα</sup>
Ps	12,52±0,10 <sup>Bμ</sup>	15,48±0,10 <sup>Aμ</sup>	0,27±0,00 <sup>Bμ</sup>	0,48±0,01 <sup>Aμ</sup>	5,00±0,04 <sup>Aα</sup>	4,12±0,01 <sup>Bα</sup>

O teor de humidade no pólen apícola, é um dos parâmetros mais relevantes para a conservação e qualidade do produto comercial do ponto de vista da segurança alimentar. Valores elevados de humidade estão associados à suscetibilidade de proliferação e contaminações de microrganismos responsáveis pela deterioração das características químicas, nutricionais, bioativas e responsáveis pela diminuição do tempo de vida útil do pólen apícola. Estes problemas associados à qualidade do produto podem pôr em risco o consumidor ou inviabilizar a comercialização do pólen apícola. O pólen apícola fresco pode fermentar à temperatura ambiente e por isso os métodos de conservação por desidratação são uma boa alternativa para diminuir o teor de humidade para níveis aceitáveis e de segurança, (Keskín & Ozkok, 2020; Straumite et al., 2022). Em relação aos teores de humidade avaliados neste estudo as diferentes amostras de pólen apícola apresentaram valores distintos consoante o processo de conservação aplicado. As diferenças significativas verificadas nos teores de humidade entre as amostras de pólen apícola congeladas e desidratadas, devem-se essencialmente ao processo de conservação aplicado ao pólen apícola (congelamento vs desidratação). Verificou-se que os processos de desidratação permitiram reduzir significativamente o teor de humidade do pólen liofilizado e seco em comparação com o pólen congelado. Mas foi a técnica da liofilização que permitiu reduzir de forma mais evidente e significativa o teor de humidade para 9,96±0,18 em relação à desidratação por secagem convencional (12,52±0,10).

Embora se tenha verificado influência dos processos de conservação por desidratação nos resultados de humidade do pólen apícola, os teores não estão de acordo com os critérios de qualidade recomendados por Campos et al. (2008), para pólen apícola seco (4% e 6%), nem estão conforme os critérios de qualidade legislados por países como o Brasil (4%), Bulgária (8%) e Suíça (6%) (Nogueira et al., 2012). E ao longo do armazenamento foi verificado o aumento

significativo dos teores de humidade para todas as amostras de pólen estudadas. Silva et al. (2019), no estudo da qualidade de pólen desidratado obteve também valores de humidade no pólen apícola liofilizado (11,01%), acima dos valores recomendados. O elevado teor de humidade observado nas amostras de pólen desidratado pode estar relacionado com vários fatores, nomeadamente a inadequação do tempo de processamento de desidratação, ou, por ser um produto higroscópico, a humidade inicial depender de circunstâncias associadas às condições climáticas ou à época do ano no momento da recolha (Barbara et al., 2015; Finola et al., 2007). Imediatamente após a congelação, o pólen apícola apresentou um teor de humidade de  $32,66 \pm 0,14\%$ . Os valores obtidos estão acima dos valores referenciados para o pólen apícola fresco após a sua recolha por autores como Campos et al. (2018) (20% a 30%), ou Keskin & Ozkok (2020), (19,54% a 21,70%).

Os microrganismos requerem um valor mínimo de  $a_w$  para se desenvolverem, valor variável de acordo com cada grupo de microrganismos. Os bolores e leveduras apresentam requisitos mais baixos de  $a_w$  em relação a bactérias. Enquanto os bolores e leveduras podem crescer em teores de  $a_w$  superiores a 0,61, as bactérias patogénicas normalmente desenvolvem-se a teores superiores a 0,85 (Anjos et al., 2019 a; Beev et al., 2018; Sagona, et al., 2017). No que diz respeito aos resultados de  $a_w$ , as diferenças verificadas entre o pólen congelado e os pólenes desidratados (liofilizado e seco), estão relacionadas com o processo de conservação (congelação vs desidratação). Ao longo do armazenamento foi observado um aumento significativo dos teores de  $a_w$  para o pólen liofilizado e seco, que variaram de  $0,15 \pm 0,06$  a  $0,48 \pm 0,00$ , e de  $0,27 \pm 0,00$  a  $0,48 \pm 0,01$ , respetivamente. No entanto, os valores permanecem baixos o suficiente para evitar o crescimento microbiano. Comparando as duas técnicas de desidratação, a técnica que teve mais influencia na redução da  $a_w$  foi a liofilização. Relativamente ao pólen congelado os valores de  $a_w$  variaram de  $0,80 \pm 0,01$  a  $0,83 \pm 0,03$  e encontram-se acima do valor mínimo para o crescimento de bolores e leveduras e bactérias patogénicas.

Em relação ao parâmetro pH, não foram verificadas diferenças significativas entre o pólen congelado e os pólenes desidratados, no momento zero. O que significa que os processos de conservação aplicados neste estudo não influenciaram os valores de pH das amostras de pólen apícola estudados. No entanto, foi verificada uma diminuição significativa do pH, em todas as amostras de pólen, ao longo do armazenamento. Os valores observados para as amostras de pólen desidratado, variaram de 4,13 a 5,04. Estes valores estão de acordo com os observados por Anjos et al. (2019 a), para pólen desidratado (3,99 a 5,37), e dentro dos limites legislados pelo Brasil, de 4,0 a 6,0 (Nogueira et al., 2012).

Os resultados relativamente ao parâmetro cor, estão representados na tabela 8.

**Tabela 8.** Determinação do parâmetro cor. Médias e respetivos desvios-padrão (n=10) dos parâmetros de cor (L\*, a\* e b\*) e ΔE. (Diferentes símbolos na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05), pelo teste de Tukey; Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05), pelo teste de Tukey) (t<sub>0</sub>: 0 dias; t<sub>1</sub>: 360 dias).

	COR					
	L*		a*		b*	
	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>
<b>Pc</b>	58,22±0,79 <sup>Aα</sup>	48,92±15,12 <sup>Aα</sup>	16,22±1,28 <sup>Aα</sup>	13,50±0,99 <sup>Bα</sup>	57,10±2,03 <sup>Aα</sup>	40,06±1,58 <sup>Bα</sup>
<b>Pl</b>	53,54±1,12 <sup>Aμ</sup>	52,49±1,35 <sup>Aα</sup>	14,09±0,89 <sup>Aμ</sup>	9,39±0,53 <sup>Bμ</sup>	56,69±1,93 <sup>Aα</sup>	41,92±3,97 <sup>Bα</sup>
<b>Ps</b>	50,55±2,26 <sup>AΩ</sup>	38,67±1,42 <sup>Bμ</sup>	14,76±0,61 <sup>Aμ</sup>	7,36±0,99 <sup>BΩ</sup>	39,26±1,83 <sup>Aμ</sup>	33,90±1,62 <sup>Bμ</sup>

Foi observado uma influência significativa na aplicação dos diferentes processos de conservação na luminosidade (L\*) das amostras estudadas. O valor mais baixo foi verificado para o pólen seco (50,55 ± 2,26), seguindo-se do pólen liofilizado (53,54 ± 1,12) e o valor mais elevado foi registado para o pólen congelado (58,22 ± 0,79), sugerindo que o processo que mais conserva a luminosidade do pólen apícola é a congelação. Após um ano de armazenamento o pólen seco teve uma redução significativa da luminosidade.

Os parâmetros de a\* nas amostras desidratadas foram significativamente superiores à amostra congelada, significando que as técnicas de desidratação tiveram influência significativa neste parâmetro. Ao longo do armazenamento foi observado o aumento significativo da cor verde (a\*) em todas as amostras de pólen.

Em relação ao parâmetro b\*, a amostra que mais preservou a cor amarela foi o pólen congelado (57,10 ± 2,03), observando-se diferenças significativas entre esta amostra e o pólen seco (39,26 ± 1,83). Apesar do pólen liofilizado obter um valor inferior de b\* em relação ao pólen congelado, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras. Após um ano de armazenamento observou-se um decréscimo significativo da cor amarela em todas as amostras de pólen. De-Melo et al. (2016), verificou que o teor de vitamina E está fortemente correlacionado ao parâmetro de cor b\* (cor amarela). Desta forma as amostras de pólen amarelo podem ser presumivelmente caracterizadas pela presença de α-tocoferol. Segundo o mesmo autor, valores menores de b\* e valores maiores de a\* em amostras de pólen desidratadas por calor podem estar relacionadas à degradação de alguns compostos devido à aplicação de temperaturas elevadas.

### 4.3 Composição Nutricional

A composição nutricional e de vitaminas do pólen apícola submetido aos diferentes processos de conservação (congelação, liofilização e secagem convencional) foram analisados em

laboratório externo e os resultados, expressos em peso seco, estão apresentados nas tabelas 9 e 10, respetivamente.

**Tabela 9.** Valores obtidos, em peso seco, para a composição nutricional de amostras de pólen apícola submetidas a diferentes processos de conservação (congelamento, liofilização e secagem convencional).

PARÂMETROS	PÓLEN APÍCOLA		
	CONGELADO	LIOFILIZADO	SECO
Valor energético (kJ /100g)	1855,91	1788,95	1800,68
Valor energético (kcal/100g)	439,48	424,31	426,80
Hidratos de carbono (g/100g)	68,44	63,43	64,75
Açúcares totais (g/100g)	38,62	41,77	38,74
Proteína Bruta (g/100g)	19,74	20,66	20,61
Cinza (g/100g)	2,16	6,19	5,18
Lípidos (g/100g)	9,65	9,72	9,46
Ac. Gordos saturados (g/100g)	3,17	2,87	2,70
Ac. Gordos polinsaturados (g/100g)	4,90	5,30	5,18
Ac. Gordos monoinsaturados (g/100g)	1,44	1,44	1,46
Sal (g/100g)	0,16	0,12	0,11
Sódio (g/100g)	0,06	0,05	0,05
Açúcares redutores (g/100g)	38,62	32,27	23,54

Não existindo legislação específica para este tipo de produto alimentar, os conteúdos nutricionais das diferentes amostras estudadas foram comparados com outros estudos ou valores de critérios de qualidade propostos por outros autores. De acordo com os resultados obtidos, não foi verificada a influência dos processos de desidratação aplicados na maioria dos parâmetros avaliados, em relação ao processo de congelamento. As amostras de pólen desidratado (liofilizadas e secas), mantiveram os teores de hidratos de carbono, proteínas, lípidos, açúcares totais, e ácidos gordos (saturados, polinsaturados e monoinsaturados), sal e sódio, em relação aos teores avaliados no pólen congelado.

De-Melo et al. (2016), avaliou o efeito da desidratação por liofilização e secagem convencional nos conteúdos lipídico e proteico de pólen apícola e obteve conteúdos superiores no pólen liofilizado em relação ao pólen seco, reconhecendo as vantagens na utilização da liofilização na preservação destes compostos. Neste estudo, apesar de se ter verificado a conservação dos nutrientes com a aplicação dos dois processos de desidratação distintos, não foi observada a vantagem da liofilização em relação à secagem convencional. Não foram observadas diferenças nos conteúdos destes nutrientes nas amostras de pólen liofilizado e seco.

Os teores de hidratos de carbono variaram de 68,44 g/100g para o pólen congelado aproximadamente em média 64,00 g/100g para as amostras desidratadas. Os resultados observados nas amostras desidratadas estão de acordo com observado para pólen desidratado no estudo realizado por Estevinho et al. (2012), cujos valores variaram de 60,82 a 70,76 g/100g. No entanto, estão acima dos valores referentes aos critérios de qualidade propostos por Campos et al. (2008), compreendidos entre 13,00 a 55,00 g/100g.

Neste estudo, os valores energéticos das diferentes amostras de pólen apícola variaram de aproximadamente 425,00 kcal/100g, para as amostras desidratadas, a 439,48 kcal/100g, para o pólen congelado. Os resultados dos valores energéticos verificados nas amostras desidratadas situam-se no intervalo reportados por Anjos et al. (2017), para o pólen apícola comercial.

A secagem com ar quente ou convencional é um dos processos de conservação mais utilizados na produção de pólen apícola para comercialização por ser um método eficaz não só na redução do teor de humidade, como na facilidade de controlar as condições de secagem. No entanto, devido à utilização de temperaturas elevadas podem ocorrer reações de Maillard, contribuindo com um efeito nefasto na composição proteica e lipídica do pólen apícola quando armazenado de forma inadequado. Como consequência pode ocorrer a deterioração do valor nutricional, perda de compostos voláteis, ou mesmo o aparecimento de odores indesejáveis após oxidação lipídica (Nogueira et al., 2012). Neste estudo, foi observada uma variação pouco significativa no conteúdo proteico, entre a amostra de pólen congelado e as amostras de pólen desidratado, de 19,74 g/100g a aproximadamente 20,00 g/100g, respetivamente, o que demonstra que os processos de conservação, nas condições aplicadas, permitiram manter as propriedades proteicas do produto, e que a sua conservação foi adequada durante 1 ano de armazenamento. Autores como Keskin & Ozkok, (2020), ou Anjos et al. (2019 a) também não observaram diferenças no conteúdo proteico entre amostras frescas e amostras desidratadas.

À semelhança do teor proteico, o teor lipídico não sofreu uma variação significativa entre as amostras de pólen apícola estudadas após um ano de armazenamento, observando-se um valor aproximado em média de 9 g/100g, para todas as amostras. De acordo com os critérios de qualidade propostos para o pólen comercial por Campos et al. (2018), os conteúdos proteicos e lipídicos das amostras desidratadas encontram-se dentro dos limites propostos (10,00 a 40,00 g/100g e 1,00 a 13,00 g/100g, respetivamente).

O conteúdo de cinzas num alimento indica a presença de matéria inorgânica na sua composição. A presença de impurezas minerais pode aumentar o teor de cinzas num alimento, e no caso do pólen apícola pode indicar uma inadequada limpeza, e por isso a sua análise pode ser considerada um importante indicador de qualidade (Nogueira et al., 2012). Neste estudo, as amostras de pólen liofilizado e seco obtiveram teores superiores às amostras de pólen congelado (6,19 g/100g, 5,18 g/100g e 2,16 g/100g, respetivamente). Os valores observados neste estudo para as amostras desidratadas, estão ligeiramente acima dos valores observados em estudos feitos por Féas et al. (2012) e Anjos et al. (2019 a) cujos valores variaram de 2,00 a 4,00 g/100g e de 1,68 a 2,57 g/100g, respetivamente, para pólen desidratado. De acordo com os critérios de qualidade proposto por Campos et al. (2008), os valores das amostras desidratadas estão dentro dos limites sugeridos pelo autor. Segundo Almeida-Muradian et al.

(2012), as cinzas podem variar de acordo com o ambiente, origem vegetal ou a capacidade de absorção do pólen apícola.

O teor açúcares redutores registaram valores de 23,54% para o pólen seco, 32,27% para o pólen liofilizado e 38,62% para o pólen congelado. O valor registado para o pólen liofilizado encontra-se de acordo com os valores registados por Nogueira et al. (2012), no estudo da composição nutricional de pólen apícola desidratado comercial.

Relativamente ao conteúdo em ácidos gordos (saturados, polinsaturados e monoinsaturados), não foi observado a influência dos processos de conservação aplicados às amostras de pólen apícola. Os valores de ácidos gordos saturado nas amostras desidratadas variaram de 2,70 a 2,87 g/100g. Estes valores estão acima dos observados para amostras de pólen desidratado por Estevinho et al. (2019) (0,91 a 1,92 g/100g). No que respeita ao conteúdo de ácidos gordos polinsaturados os valores observados para as amostras desidratadas variaram de 5,18 a 5,30 g/100g também são superiores aos resultados observados para o mesmo autor (Estevinho et al., 2019). Os valores obtidos para os ácidos gordos monoinsaturados nas amostras desidratadas (1,44 a 1,46 g/100g) também se encontram acima dos valores observados por Estevinho et al. (2019) (0,44 a 1,31 g/100g).

**Tabela 10.** Valores obtidos para a composição em vitaminas de amostras de pólen apícola, em peso seco, submetidas a diferentes processos de conservação (congelação, liofilização e secagem convencional), após 1 ano de armazenamento.

PARÂMETROS	PÓLEN APÍCOLA		
	CONGELADO	LIOFILIZADO	SECO
Vit C (ácido ascórbico) (mg/100g)	5,62	19,67	6,76
Vit E (Soma de isómeros) (mg/100g)	489,91	386,74	304,05
Vit E (Alfa-Tocoferol) (mg/100g)	389,05	165,75	247,75
Vit E (Beta + Gamma Tocoferol) (mg/100g)	86,46	33,15	45,05
Vit E (Delta+Tocoferol) (mg/100g)	14,41	11,05	11,26
Vit B1 (Tiamina) (mg/100g)	0,04	0,03	0,03
Vit B2 (Riboflavina) (mg/100g)	1,41	1,22	0,86
Vit B3 (Niacina) (mg/100g)	28,82	12,15	21,51
Vit B5 (Ácido pantoténico) (mg/100g)	0,36	0,32	0,23
Vit B6 (Piridoxina) (mg/100g)	0,19	0,13	0,15
Vit B9 (Ácido fólico) (µg/100g)	36,02	27,62	28,15
Vit B12 (Cianocobalamina) (µg/100g)	2,88	2,21	2,25

Certos compostos podem ser degradados na presença de temperaturas elevadas, principalmente as vitaminas hidrossolúveis. A vitamina C, como vitamina hidrossolúvel, é instável na presença de calor e no pólen apícola pode ser degradada na etapa da desidratação convencional, quando aplicadas elevadas temperaturas (Ares et al., 2018). Neste estudo e de acordo com os resultados obtidos (tabela 10), foi possível verificar a influência das técnicas de desidratação na composição do ácido ascórbico (vitamina C), no pólen estudado. As amostras

congeladas e desidratadas convencionalmente registaram valores inferiores (5,62 mg/100g e 6,76 mg/100g respetivamente), comparativamente ao pólen liofilizado (19,67 mg/100g permitindo desta forma sugerir que a liofilização preservou esta vitamina hidrossolúvel. Estes resultados estão de acordo com os teores de vitamina C observados em amostras de pólen comercial desidratado por Zhu et al. (2020), cujos valores variaram entre 1,75 mg/100g e 31,30 mg/100g.

Segundo Miquel et al. (2004), fatores como a luz, oxigénio e elevadas temperaturas são responsáveis pela degradação da vit E. De-Melo et al. (2016), obteve teores significativamente mais elevados de vitamina E no pólen liofilizado em comparação com o pólen seco. De acordo com os valores obtidos neste estudo, a técnica de desidratação que mais preservou o conteúdo em vitamina E também foi a liofilização (386,74 mg/100g), comparativamente à técnica da secagem convencional (304,05 mg/100g). E de entre os processos de conservação a congelação foi a que preservou a vitamina E no pólen apícola, corroborando os resultados da avaliação do parâmetro b\* (tabela 8), relativamente à cor amarela, na amostra de pólen congelado. O parâmetro b\* está fortemente correlacionado com o teor de vitamina E, pela presença de  $\alpha$ -tocoferol, e o pólen apícola que mais preservou a cor amarela foi o congelado.

Embora o aquecimento possa causar degradação das vitaminas do complexo B (De-Melo et al., 2016), nesta investigação não foi observado uma influência negativa na aplicação da desidratação por secagem convencional nos conteúdos de vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B9 e B12. Os conteúdos vitamínicos não sofreram alterações entre amostras processadas pelas diferentes técnicas de desidratação (tabela 10). Apesar de vários autores verificarem a vantagem da liofilização na conservação do conteúdo em vitaminas do complexo B no pólen apícola, neste estudo não foi evidente esta constatação. À exceção das vitaminas B2 e B9, os valores observados para as vitaminas do complexo B, estão abaixo dos critérios de qualidade de referência, de pólen apícola comercial, descritos por Campos et al. (2008), (0,60 a 1,30 mg/100g para a Vit B1, 4,00 a 11,00 mg/100g para a Vit B3, 0,50 a 2,00 mg/100g para a Vit B5 e 0,20 a 0,70 mg/100g para a Vit B6). Em relação ao conteúdo da vitamina B9, os valores obtidos são inferiores relativamente aos critérios de referência de qualidade de Campos et al. (2008) (300,0 a 1000,00  $\mu$ g/100g).

#### **4.4 Avaliação das Propriedades Bioativas – Atividade e Capacidade Antioxidante**

##### **4.4.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT)**

Diferentes métodos de extração foram utilizados, uma vez que os extratos aquosos, etanólicos e cetónicos, são conhecidos por apresentarem teores significativamente maiores de elementos

bioativos, quando comparados ao pólen apícola natural (Kroyer & Hegedus, 2001). Os resultados foram apresentados em função do produto final obtido e com as variações de humidade características do método de processamento utilizado e comparadas com amostras de pólen comercial (Komosinska-Vassev et al., 2015).

A avaliação dos compostos fenólicos totais foi realizada através de dois métodos, pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, e pelo método espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ).

Na contagem de compostos fenólicos totais pelo método *Folin-Ciocalteu*, os resultados foram expressos em gramas de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 gramas de amostra (g GAE/100g), em peso seco, conforme os resultados apresentados na tabela 11.

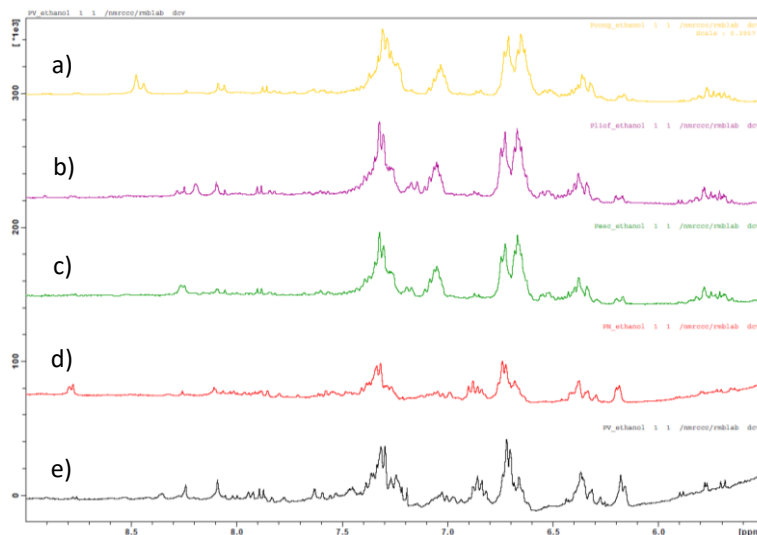
**Tabela 11.** Teores de compostos fenólicos total pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*. Médias e respetivos desvios-padrão (n=3), dos CFT (g GAE/100g) presentes em extratos de amostras de pólen apícola (pólen congelado, pólen liofilizado e pólen seco, em extratos etanólicos e cetónicos), em peso seco.

EXTRATO PÓLEN	CFT g GAE/100g (ETANOL 70%)	CFT g GAE/100g (ACETONA 70%)
Congelado	0,79 ± 0,18	0,63 ± 0,03
Liofilizado	0,91 ± 0,13	0,66 ± 0,03
Seco	0,84 ± 0,03	0,76 ± 0,02
Seco Comercial (controlo)	0,85 ± 0,18	0,85 ± 0,10

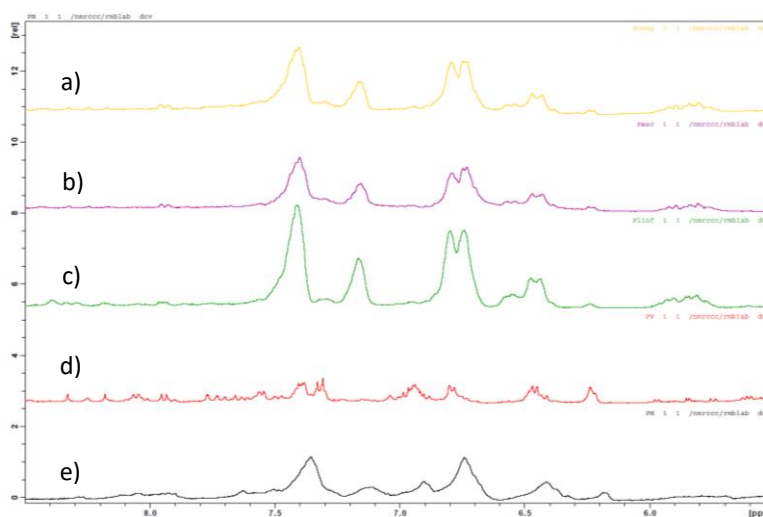
O conteúdo fenólico total variou entre  $0,63 \pm 0,03$  e  $0,85 \pm 0,18$  g GAE/100g e encontra-se dentro da faixa de valores verificados em estudos anteriores (Belina-Aldemita et al., 2020; Kocot et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2012), indicando a presença de compostos polifenólicos, como os ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos) e flavonoides (flavonas, flavonóis e flavanonas). Os extratos em etanol apresentam maior segurança alimentar e um menor impacto ambiental. Os extratos em etanol a 70% (v/v) apresentaram um conteúdo de compostos fenólicos superior em relação aos extratos em acetona a 70% (v/v). Os extratos etanólicos das amostras liofilizadas e secas preservaram a maior parte do seu conteúdo fenólico quando comparado com o extrato etanólico da amostra controlo (pólen seco comercial). As amostras congeladas apresentaram um menor conteúdo fenólico verificado quer nos extratos etanólicos como nos extratos cetólicos quando comparadas com os extratos do pólen seco comercial e com as amostras dos pólenes desidratados.

Os ensaios por espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram realizados com o objetivo de identificar os principais grupos de fenóis nas amostras. A análise das amostras de extratos de pólen apícola por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, permite proceder à identificação da presença de alguns grupos aromáticos, do tipo polifenol, em extratos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco, em acetona- $d_6$  70% (v/v), em etanol- $d_6$  70% (v/v). As figuras 15 e 16, apresentam em destaque a região de sinais associada a protões constituintes

de grupos aromáticos (6,0 e 8,0 ppm) do espectro 1D 1H NMR, de amostras de extrato de pólen apícola em etanol-d6 70% (v/v) e de amostras de extrato de pólen apícola em acetona-d6 70% (v/v), respetivamente.



**Figura 15.** Espectros 1D 1H RMN de extratos de pólen apícola. A figura representa a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6,0 a 8,0 ppm) para extratos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco, em etanol-d6 70% (v/v). [a) Pólen Congelado; b) Pólen Liofilizado; c) Pólen Seco; d) Pólen Seco Comercial em fim de prazo de validade (controlo) e e) Pólen Seco Comercial recém comercializado (controlo)]



**Figura 16.** Espectros 1D 1H RMN de extratos de pólen apícola. A figura representa a região do espectro associada aos sinais provenientes de grupos aromáticos (6,0 a 8,0 ppm) para extratos de pólen apícola congelado, liofilizado e seco, acetona-d6 70% (v/v). [a) Pólen Congelado; b) Pólen Liofilizado; c) Pólen Seco; c) Pólen Seco Comercial em fim de prazo de validade (controlo) e e) Pólen Seco Comercial recém comercializado (controlo)]

A região aromática (6,0 a 8,0 ppm) do espectro 1D 1H NMR do pólen de abelha em etanol-d6 70% (v/v) e acetona-d6 70% (v/v), detetou a presença de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e

hidroxicinamicos), principalmente nos extratos etanólicos das amostras liofilizadas e secas convencionalmente, corroborando os dados obtidos pelo ensaio de *Folin-Ciocalteu*.

#### 4.4.2 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante em extratos em etanol a 70% (v/v) e em acetona a 70% (v/v) do pólen apícola comercial e das amostras submetidas aos três procedimentos de conservação (congelação, liofilização e secagem convencional) foram avaliados através dos ensaios ABTS e DPPH. Diferentes ensaios *in vitro* podem ajudar a caracterizar melhor as propriedades ativas redutoras presentes nas amostras. Os resultados, expressos em peso seco, estão apresentados na tabela 12.

**Tabela 12.** Médias e respectivos desvios-padrão (n=3), da capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de extratos etanólicos e cetónicos de pólen apícola submetido a diferentes métodos de processamento (congelação, liofilização e secagem), em peso seco.

EXTRATO PÓLEN	g TEAC /100g (ETANOL 70%)		g TEAC/100g (ACETONA 70%)	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
Congelado	0,30 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,21 ± 0,18
Liofilizado	0,30 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,47 ± 0,02	0,28 ± 0,00
Seco	0,28 ± 0,00	0,21 ± 0,02	0,64 ± 0,08	0,32 ± 0,10
Seco Comercial (controlo)	0,69 ± 0,16	1,57 ± 0,07	1,88 ± 0,06	2,06 ± 0,07

A capacidade determinada pelo poder de redução do radical ABTS expresso em g TEAC/100g de amostra (capacidade antioxidante equivalente de trolox), variou entre 0,28 ± 0,00 e 0,30 ± 0,01 g TEAC/100g para os extratos em etanol 70% (v/v) e entre 0,34 ± 0,02 e 0,64 ± 0,08 g TEAC/100g para os extratos de acetona 70% (v/v). Da mesma forma, o ensaio de sequestro de radicais DPPH apresentou um perfil semelhante, com valores a variar entre 0,10 ± 0,01 g TEAC/100g e 0,21 ± 0,02 g TEAC/100g para os extratos em etanol 70% (v/v) e entre 0,21 ± 0,18 g TEAC/100g e 0,32 ± 0,10 g TEAC/100g para os extratos em acetona 70% (v/v).

Os resultados mostram que a acetona é mais eficiente que o etanol na extração de compostos antioxidantes do pólen apícola de acordo com os ensaios ABTS e DPPH. No entanto, mesmo que todas as amostras submetidas aos diferentes procedimentos de conservação tenham apresentado redução de antioxidantes, em relação ao pólen seco comercial (controlo), as amostras secas e liofilizadas apresentaram maiores teores de antioxidantes, quando comparadas às amostras congeladas, exceto nos extratos etanólicos das amostras desidratadas no ensaio ABTS.

Em relação às amostras controlo (pólen seco comercial), os extratos em etanol 70% (v/v) das amostras desidratadas apresentaram uma redução para aproximadamente 42% pelo método ABTS e uma redução para aproximadamente 13% pelo método DPPH.

Em relação às amostras congeladas, apresentaram uma redução para 43% pelo método ABTS, e uma redução ainda mais acentuada para 6%, pelo método DPPH.

Nos extratos em acetona 70% (v/v) de amostras secas e liofilizadas foi verificado uma redução para aproximadamente 30% pelo método ABTS e uma redução para aproximadamente 14% pelo método DPPH, em relação às amostras controle. As amostras congeladas apresentaram reduções para 18% e para 10%, pelos métodos ABTS e DPPH, respetivamente.

Assim, amostras submetidas a procedimentos de desidratação como a liofilização e a secagem convencional, preservam melhor e mantêm a capacidade antioxidante das amostras de pólen, dada a capacidade dos grãos de pólen secos resistirem à decomposição devido ao revestimento externo resistente composto por celulose e esporopolenina (Didaras et al., 2020; Salazar-González et al., 2018).

## 5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

---

Os produtos apícolas, como é o caso do pólen apícola, são conhecidos pelas suas propriedades terapêuticas. O pólen apícola é uma fonte de nutrientes e antioxidantes naturais devido à sua composição rica em compostos bioativos, como os flavonoides, ácidos fenólicos ou vitaminas, podendo ser usado como suplemento alimentar.

A concretização deste potencial de mercado, em particular no que se refere à sua apetência para a grande distribuição, depende da aplicação de diferentes técnicas de conservação e do seu efeito na manutenção da composição química, das propriedades nutricionais e bioativas e tempo de prateleira do produto tendo em conta a otimização da sua rentabilização e da satisfação das características de qualidade procuradas pelos potenciais clientes.

Os resultados das avaliações microbiológicas, após os processos e após um ano de armazenamento, mostram que os processos de conservação não tiveram influência na redução da carga microbiana de aeróbios mesófilos nas amostras, mas mantiveram um nível de qualidade microbiológico considerado satisfatório para alimentos colocados no mercado e prontos para consumo.

Já no parâmetro bolores e leveduras, houve um impacto dos processos de desidratação na redução da carga microbiana nas amostras de pólen liofilizado e seco.

A congelação também se revelou um processo eficaz na inibição do crescimento destes parâmetros, tendo-se verificado que, após um ano, as amostras mantinham níveis de qualidade comercial para o pólen apícola.

A ausência de crescimento de microrganismos indicadores de qualidade sanitária e de segurança alimentar nas várias amostras de pólen apícola, demonstra a adequação das boas práticas de higiene aplicadas na recolha, armazenamento do pólen apícola e durante o processamento do pólen ao longo da investigação.

Em relação à composição físico-química, todas as amostras processadas por liofilização, por secagem com ar quente e as congeladas apresentavam níveis de humidade superiores aos recomendados pela bibliografia, ainda que por uma diferença reduzida no caso das técnicas de secagem. Esta situação poderá dever-se a uma dependência entre o teor inicial de humidade do pólen apícola e as condições climatéricas na localização da colmeia ou na época da colheita que tendo motivado níveis iniciais de humidade superiores ao esperado resultaram na inadequação do tempo de desidratação aplicado.

Na composição nutricional, não foi verificada a influência dos processos de desidratação aplicados em relação à congelação, observando-se a manutenção do conteúdo da maioria dos

parâmetros nutricionais ao contrário do verificado por vários investigadores no que se refere à conservação por liofilização.

Neste estudo, a liofilização mostrou ser eficaz na conservação dos parâmetros da cor.

A liofilização e a secagem convencional conservaram, ao fim de 1 ano, a maior parte do conteúdo fenólico das amostras quando comparado com amostras de pólen apícola desidratado recém colocado no mercado.

No que se refere aos parâmetros de segurança alimentar, e se considerarmos apenas os resultados microbiológicos, podemos concluir que, mesmo ao fim de um ano, as amostras desidratadas, por se encontrarem em conformidade com os requisitos de qualidade e segurança alimentar, poderiam ser aptas para colocação no mercado e comercializadas. No entanto, o elevado teor de humidade verificado nas amostras de pólen desidratadas, significativamente superiores aos indicados como referência, pode representar um risco acrescido para o consumidor. Esta situação poderia ser contornada através da realização de um estudo da evolução da atividade microbiana a diversos níveis de humidade em amostras tratadas pelos diferentes processos ao longo do tempo, enquanto forma de determinação da variação do ciclo de vida deste produto em função do teor de humidade para cada processo.

Os resultados obtidos reforçam a ideia de que a não existência de regulamentação específica, a nível Europeu, nem regras transversais para produção do pólen apícola, pode contribuir para a comercialização de produtos com características não seguras. A uniformização de procedimentos de produção e normalização de critérios de qualidade dos produtos apícolas permitiria alargar a comercialização do pólen apícola a todos os Estados Membros e garantir a produção de produtos com características de qualidade elevada e seguros para o consumidor.

Os produtores deveriam ainda considerar o uso da conservação por desidratação, quer por liofilização, quer por secagem com ar quente (a temperaturas não superiores a 40°C), em vez da congelação, dadas as suas capacidades de conservação e manutenção das características bioativas e microbiológicas do pólen apícola. A secagem convencional tem a vantagem de ser um processo mais económico, enquanto a liofilização ainda não é uma opção economicamente viável para os apicultores, principalmente para os pequenos e médios produtores.

Enquanto perspetivas futuras e no contexto da definição de critérios de qualidade e referenciais normativos que possam contribuir para a produção de produtos à base de pólen apícola seguros e de elevada qualidade, permitir operações mais eficazes no controlo dos processos industriais e ainda permitir aumentar a rentabilidade da atividade apícola, seria relevante este trabalho incluir a obtenção de informação em áreas de investigação como a biodisponibilidade dos nutrientes, a capacidade antimicrobiana, a análise da microestrutura através de Microscopia Eletrónica de Varrimento ou a realização de análises sensoriais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Adaskeviciute, V., Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Barčauskaitė, K., & Maruška, A. (2019). Comparison of physicochemical properties of bee pollen with other bee products. *Biomolecules*, 9(12), 819. <https://doi.org/10.3390/biom9120819>
- Anjos, O., Campos, M. G., & Estevinho, L. M. (2017). Poderá o pólen ser considerado um superalimento? *Revista do Instituto Politécnico de Castelo Branco*, 7, 20-26.
- Anjos, O., Paula, V. B., Delgado, T., & Estevinho, L. M. (2019 a). Influence of the storage conditions on the quality of bee pollen. *Zemdirbyste-Agriculture*, vol. 106, No. 1, p. 87–94 DOI 10.13080/z-a.2019.106.012
- Anjos, O., Fernandes, R., Cardoso, S. M., Delgado, T., Farinha, N., Paula, V., Estevinho, L. & Carpes, S. T. (2019 b). Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in black pudding. *Lwt*, 111, 869-875. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.105>
- Anjos, O., Alpat, U., Campos, M. G., Margaoan, R., Damarli, E., Almeida, P. R., ... & Chhuneja, P. K. (2022). Advances in ISO standardization of bee pollen. In *47th APIMONDIA International Apicultural Congress*.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009>
- Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1995). Official methods of analysis (16th edition). *AOAC International*.
- Association of Official Analytical Chemists, AOAC (2005). Official methods of analysis of AOAC international (18th ed.). *AOAC International*.
- Bárbara, M. S., Machado, C. S., Sodr e, G. D. S., Dias, L. G., Estevinho, L. M., & De Carvalho, C. A. L. (2015). Microbiological assessment, nutritional characterization and phenolic compounds of bee pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. *Molecules*, 20(7), 12525-12544. <https://doi.org/10.3390/molecules200712525>
- Beev, G., Stratev, D., Vashin, I., Pavlov, D., & Dinkov, D. (2018). Quality assessment of bee pollen: A cross sectional survey in Bulgaria. *Journal of food quality and hazards control*, 5(1), 11-16. DOI: [10.29252/jfqhc.5.1.11](https://doi.org/10.29252/jfqhc.5.1.11)
- Belina-Aldemita, M. D., Fraberger, V., Schreiner, M., Domig, K. J., & D'Amico, S. (2020). Safety aspects of stingless bee pot-pollen from the Philippines. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 71(2), 87-100. <https://doi.org/10.2478/boku-2020-0009>

Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4), 758-774. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.033>

Bogdanov, S., Martin, P., & Lullmann, C. (1997). Harmonized methods of the European Honey Commission. Determination of sugars by HPLC. *Apidologie*, 28, 42–44.

Brito, C., Bertotti, T., Primitivo, M. J., Neves, M., Pires, C. L., Cruz, P. F., ... & Ribeiro, V. S. (2021). Corema album spp: Edible wild crowberries with a high content in minerals and organic acids. *Food Chemistry*, 345, 128732. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128732>

Brochard, M., Correia, P., Barroca, M. J., & Guiné, R. P. (2021). Development of a new pasta product by the incorporation of chestnut flour and bee pollen. *Applied Sciences*, 11(14), 6617. <https://doi.org/10.3390/app11146617>

Camacho-Bernal, G. I., Cruz-Cansino, N. D. S., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Zafra-Rojas, Q. Y., Castañeda-Ovando, A., & Suárez-Jacobo, Á. (2021). Addition of bee products in diverse food sources: Functional and physicochemical properties. *Applied Sciences*, 11(17), 8156. <https://doi.org/10.3390/app11178156>

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. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>

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. DOI 10.3896/IBRA.4.02.4.01

Campos, M.G., Olena, L., & Anjos, O. (2016). Chemical composition of bee pollen. In S.M. Cardoso & A.M.S. Silva (Eds.), *Chemistry, biology and potential applications of honeybee plant-derived products* (pp. 67–88). Sharjah: Bentham Science. DOI: 10.2174/9781681082370116010006

Campos, M. G., Anjos, O., Chica, M., Campoy, P., Nozkova, J., Almaraz-Abarca, N., ... & Carreck, N. L. (2021). Standard methods for pollen research. *Journal of Apicultural Research*, 60(4), 1-109. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1948240>

Centre for Food Safety, CFS. (2014). Microbiological Guidelines for Food (For ready-to-eat food in general and specific food items). In *Food and Environmental Hygiene Department, Hong Kong*.

Christophoridou, S., & Dais, P. (2009). Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 633(2), 283-292. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.048>

Conte, P., Del Caro, A., Balestra, F., Piga, A., & Fadda, C. (2018). Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach. *LWT*, *90*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.002>

Coronel, B. B., Grasso, D., Pereira, S. C., & Fernández, G. (2004). Caracterización bromatológica del polen apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, *15*(29), 145-181.

Corvucci, F., Nobili, L., Melucci, D., & Grillenzoni, F. V. (2015). The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis. *Food chemistry*, *169*, 297-304.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.122>

De Arruda, V. A. S., Pereira, A. A. S., de Freitas, A. S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2013 a). Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, *29*(2), 100-105.

De Arruda, V. A. S., Pereira, A. A. S., Estevinho, L. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2013 b). Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 143-148.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.019>

De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., & Almeida-Muradian, L. B. (2015). A diagnosis of the microbiological quality of dehydrated bee-pollen produced in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, *61*(5), 477-483. <https://doi.org/10.1111/lam.12480>

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.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014>

De-Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., de Freitas, A. D. S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2018). A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, *25*, 91-110. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.001>

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.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>

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.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1248109>

Didaras, N. A., Karatasou, K., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2020). Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives. *Antibiotics*, 9(11), 811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>

Estevinho, L. M., Feás, X., Seijas, J. A., & Vázquez-Tato, M. P. (2012). Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.034>

Estevinho, L. M., Dias, T., & Anjos, O. (2019). Influence of the storage conditions (frozen vs. dried) in health-related lipid indexes and antioxidants of bee pollen. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(2), 1800393. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800393>

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. <https://doi.org/10.3390/molecules17078359>

Finola, M. S., Lasagno, M. C., & Marioli, J. M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food chemistry*, 100(4), 1649-1653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.046>

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>

Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP), (2019) – Programa Apícola Nacional 2020 – 2022. *GPP (Ed.)*, Lisboa <https://www.gpp.pt/index.php/apoiios-de-mercado/programa-apicola-nacional-2020-2022>

Heldt, L. F. S., Pereira, D., Souza, B. R., Almeida-Muradian, L. B., & Carpes, S. T. (2019). Fortification of beef burger with the addition of bee pollen from *Apis mellifera* L. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 895-901. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i11.2025>

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), (2020). Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia. *INSA*. Lisboa. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>

International Organization for Standardization, ISO 6888-1:1999 (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) Part 1: Technique using Baird-Parker Agar medium. *International Standards Organization*: Switzerland.

International Organization for Standardization, ISO 15213:2003 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. *International Standards Organization*: Switzerland.

International Standards Organization, ISO 15213:2003 (2003). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff Horizontal Method for the Enumeration of Sulfite-Reducing Bacteria Growing under Anaerobic Conditions. *International Standards Organization*: Switzerland.

International Organization for Standardization, ISO 4833-1:2003 (2013). Microbiology of the food chain-Horizontal method for the enumeration of microorganisms--Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. *International Standards Organization*: Winterthur, Switzerland

International Organization for Standardization, ISO 9308-1:2014 (2014). Water quality-Determination and counting of Escherichia coli and coliform bacteria-Part 1: Membrane filtration method for low bacterial ground water. *International Standards Organization*: Switzerland.

International Organization for Standardization, ISO/TC 34/SC 19:2017, (2017). Bee products. *International Organization for Standardization*. [ISO - ISO/TC 34/SC 19 - Bee products](#)

Isik, A., Ozdemir, M., & Doymaz, I. (2018). Effect of hot air drying on quality characteristics and physicochemical properties of bee pollen. *Food science and technology*, 39, 224-231. <https://doi.org/10.1590/fst.02818>

Jannesar, M., Shoushtari, M. S., Majd, A., & Pourpak, Z. (2017). Bee pollen flavonoids as a therapeutic agent in allergic and immunological disorders. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 171-182.

Keskin, M., & Özkök, A. (2020). Effects of drying techniques on chemical composition and volatile constituents of bee pollen. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(4), 203-208. <https://doi.org/10.17221/79/2020-CJFS>

Khalifa, S. A., Elashal, M. H., Yosri, N., Du, M., Musharraf, S. G., Nahar, L., & Zou, X. (2021). Bee pollen: Current status and therapeutic potential. *Nutrients* 13: 1876. <https://doi.org/10.3390/nu13061876>

Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021>

Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., & Musik, I. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7074209>

- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Kostic, A. Ž., Milinčić, D. D., Barać, M. B., Ali Shariati, M., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2020). The application of pollen as a functional food and feed ingredient—the present and perspectives. *Biomolecules*, 10(1), 84. <https://doi.org/10.3390/biom10010084>
- Kroyer, G., & Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3), 171-174. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(01\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00039-X)
- Kurek-Gorecka, A., Górecki, M., Rzepecka-Stojko, A., Balwierz, R., & Stojko, J. (2020). Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 25(3), 556. <https://doi.org/10.3390/molecules25030556>
- Li, Q. Q., Wang, K., Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., Hu, L., Xue, X. F., ... & Hu, F. L. (2018). Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, 49, 472-484. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.008>
- Liolios, V., Tananaki, C., Kanelis, D., & Rodopoulou, M. A. (2022). The microbiological quality of fresh bee pollen during the harvesting process. *Journal of Apicultural Research*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2140924>
- Margaoan, R., Stranț, M., Varadi, A., Topal, E., Yücel, B., Cornea-Cipcigan, M., ... & Vodnar, D. C. (2019). Bee collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants*, 8(12), 568. <https://doi.org/10.3390/antiox8120568>
- Margaoan, R., Özkök, A., Keskin, Ş., Mayda, N., Urcan, A. C., & Cornea-Cipcigan, M. (2021). Bee collected pollen as a value-added product rich in bioactive compounds and unsaturated fatty acids: A comparative study from Turkey and Romania. *LWT*, 149, 111925. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111925>
- Mayda, N., Özkök, A., Ecem Bayram, N., Gerçek, Y. C., & Sorkun, K. (2020). Bee bread and bee pollen of different plant sources: Determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1795-1809. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y>
- Miquel, E., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., & Clemente, G. (2004). Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *International dairy journal*, 14(11), 1003-1011. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.002>
- Mossel, D. A. A., Corry, J. E., Struijk, C. B., & Baird, R. M. (1995). *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*. John Wiley & Sons.

New South Wales Food Authority (NSWFA). (2009). Microbiological quality guide for ready-to-eat foods – A guide to interpreting microbiological results. NSWFA. New South Wales. [http://www.foodauthority.nsw.gov.au/Documents/scienceandtechnical/microbiological\\_quality\\_guide\\_for\\_RTE\\_food.pdf](http://www.foodauthority.nsw.gov.au/Documents/scienceandtechnical/microbiological_quality_guide_for_RTE_food.pdf)

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. <https://doi.org/10.3390/ijms130911173>

Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., & Ngeontae, W. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food research international*, 44(3), 798-806. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.034>

Norma Portuguesa, NP 1829:1982 (1982). Microbiologia Alimentar – Preparação da amostra para análises microbiológica. *Instituto Português da Qualidade (IPQ)*, Portugal.

Norma Portuguesa, NP 3277-1:1987 (1987). Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. *Parte, 1. Instituto Português da Qualidade (IPQ)*, Portugal.

Pascoal, A., Chambó, É. D., & Estevinho, L. M. (2022). Botanical origin, physicochemical characterization, and antioxidant activity of bee pollen samples from the northeast of Portugal. *Journal of Apicultural Research*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2030277>

Pérez-Pérez, E. M., Vit, P., Rivas, E., Sciortino, R., Sosa, A., Tejada, D., & Rodríguez-Malaver, A. J. (2012). Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Mérida, Venezuela. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 62(4), 376-380.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril, (2004). Relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L139/1. <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:pt:PDF>

Regulamento (EU) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro (2011). Relativo à prestação de informação aos consumidores sobre géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L304/18. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:PT:PDF>

Ribeiro, V. S., Leitão, A. E., Ramalho, J. C., & Lidon, F. C. (2014). Chemical characterization and antioxidant properties of a new coffee blend with cocoa, coffee silverskin and green coffee minimally processed. *Food Research International*, 61, 39-47.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.003>

Sagona, S., Bozzicolonna, R., Nuvoloni, R., Cilia, G., Torracca, B., & Felicioli, A. (2017). Water activity of fresh bee pollen and mixtures of bee pollen-honey of different botanical origin. *Lwt*, 84, 595-600. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.015>

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.

<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1205824>

Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., de Freitas, A. D. S., Barth, O. M., A. Sattler & 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

Silva, E. V. C., Reis, I. D. A., de Almeida, L. D. N. T., dos Prazeres, A. R., da Silva, J. B., & Oliveira, A. D. S. (2019). Dehydrated apiculture pollen quality. *Periódico Tchê Química*, 16(31), 335-340.

Sinell, H.J. (1980). Interacting factors affecting mixed populations. Silliker, J. H. (Ed.), *Microbial Ecology of Foods*, vol. 1, *Academic Press*, New York, p.215.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Straumite, E., Bartule, M., Valdovska, A., Kruma, Z., & Galoburda, R. (2022). Physical and Microbiological Characteristics and Antioxidant Activity of Honey Bee Pollen. *Applied Sciences*, 12(6), 3039. <https://doi.org/10.3390/app12063039>

Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82-106.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>

Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A. & Bandler, R. (2001). Yeasts, moulds and mycotoxins. In *Bacteriological Analytical Manual online*. 8th Ed, Revision A.

<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-yeasts-molds-and-mycotoxins>

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Vegh, R., Csóka, M., Sörös, C., & Sipos, L. (2021). Food safety hazards of bee pollen—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 490-509.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.016>

Zhu, M., Tang, J., Tu, X., & Chen, W. (2020). Determination of Ascorbic Acid, Total Ascorbic Acid, and Dehydroascorbic Acid in Bee Pollen Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), 5696.

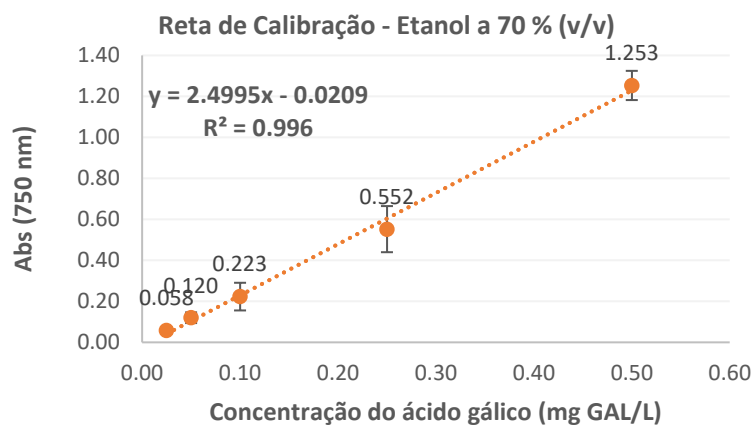
<https://doi.org/10.3390/molecules25235696>

Zuluaga-Domínguez, C., Serrato-Bermudez, J., & Quicazán, M. (2018). Influence of drying-related operations on microbiological, structural and physicochemical aspects for processing of bee-pollen. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 11(2), 57-64.

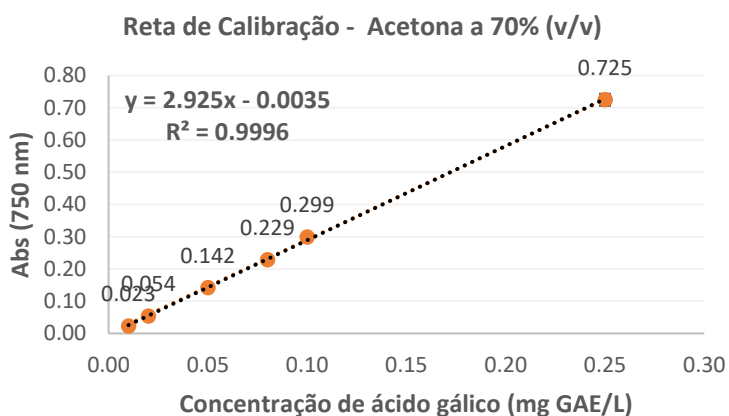
<https://doi.org/10.1016/j.eaef.2018.01.003>

## 7. ANEXOS

### ANEXO A

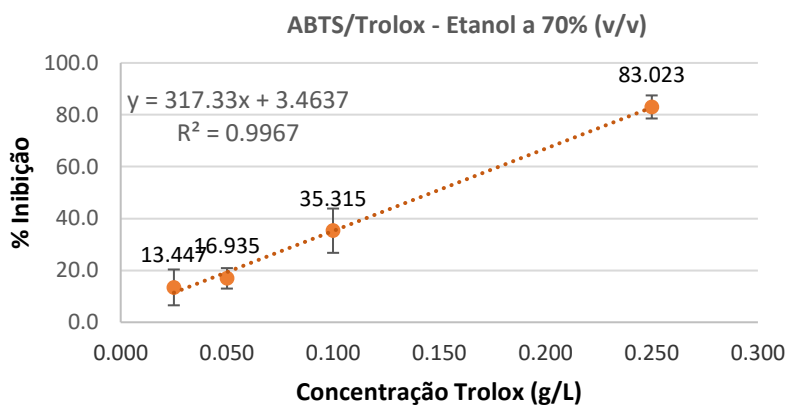


**Figura 17.** Reta de calibração do ácido gálico para a quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, usando como solvente o etanol a 70% (v/v).

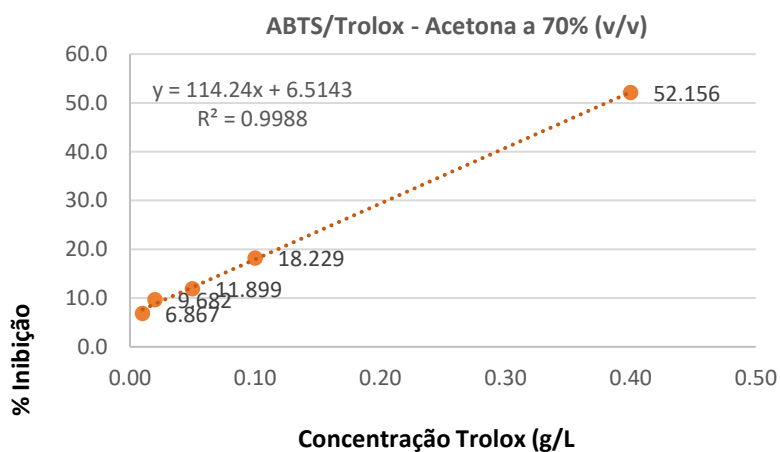


**Figura 18.** Reta de calibração do ácido gálico para a quantificação de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, usando como solvente a acetona a 70% (v/v).

## ANEXO B

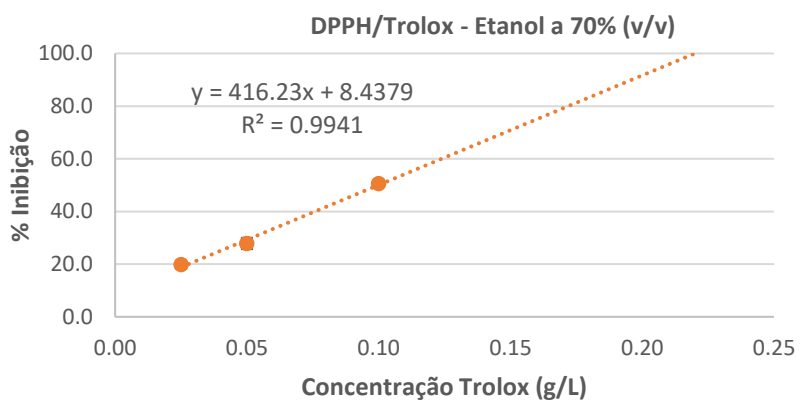


**Figura 19.** Retas de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através pelo método ABTS das amostras de Pólen estudados, como solvente o etanol a 70% (v/v).

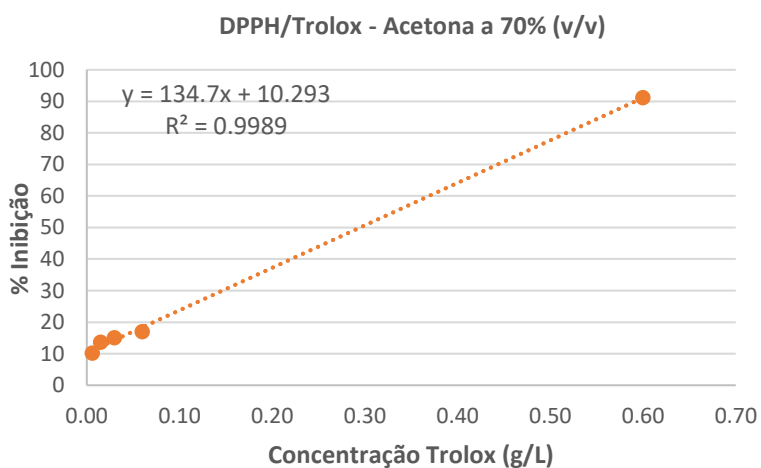


**Figura 20.** Retas de calibração de Trolox para determinação da atividade antioxidante através pelo método ABTS das amostras de Pólen estudados, com solvente acetona a 70% (v/v).

## ANEXO C



**Figura 21.** Retas de calibração do Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, utilizando como solvente o etanol a 70% (v/v).



**Figura 22.** Retas de calibração do Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, utilizando como solvente a acetona a 70% (v/v).

