

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

**QUALIDADE DO PÓLEN ARMAZENADO (SAMBURÁ)  
POR *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA:  
APIDAE) SUBMETIDO A MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO**

**MARIVALDA FIGUEREDO SANTA BÁRBARA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
MARÇO - 2016**

**QUALIDADE DO PÓLEN ARMAZENADO (SAMBURÁ)  
POR *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA:  
APIDAE) SUBMETIDO A MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO**

**MARIVALDA FIGUEREDO SANTA BÁRBARA**

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geni da Silva Sodré

Coorientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Cerilene Santiago Machado

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

S231q	<p>Santa Bárbara, Marivalda Figueredo.</p> <p>Qualidade do pólen armazenado (Samburá) por <i>Melipona mandacaia</i> Smith, 1863 (Hymenoptera: apidae) submetido a métodos de conservação / Marivalda Figueredo Santa Bárbara. _ Cruz das Almas, BA, 2016. 105f.; il.</p> <p>Orientadora: Geni da Silva Sodré. Coorientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Apicultura – Pólen. 2.Pólen – Armazenamento. 3.Microorganismos – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Machado, Cerilene Santiago. III.Título.</p> <p>CDD: 638.1</p>
-------	---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
MARIVALDA FIGUEREDO SANTA BÁRBARA

---

Membro Presidente: Profa. Dra. Geni da Silva Sodré  
Instituição: UFRB

---

Membro Externo ao Programa: Profa. Dra. Norma Suely Evangelista Barreto  
Instituição: UFRB

---

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Daniela de Almeida Anacleto  
Instituição: IFBAIANO

Homologada em       /       /       .

*Aos meus pais Maria Dalva e Rosalvo, pelos ensinamentos e exemplos de vida.  
Aos meus irmãos Elieni, Roseval e aos meus sobrinhos, pelas alegrias.  
À Evaldo, pela compreensão e por está sempre ao meu lado em todos esses anos.*

## **Dedico**

“Não importa onde você parou...  
Em que momento da vida você cansou...  
O que importa é que sempre é possível recomeçar.  
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...  
É renovar as esperanças na vida e,  
o mais importante...  
Acreditar em você de novo”.

**Carlos Drummond de Andrade**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e determinação para que concluísse mais uma etapa da minha vida.

Ao meu esposo Evaldo que sempre me incentivou a alcançar caminhos mais distantes e por ter possibilitado e lutado para que tudo isso se concretizasse.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio, amor e carinho.

À minha irmã, pelas conversas, apoio e momentos de descontração.

Ao meu irmão, tios, tias primos, sobrinhos, minha cunhada e meu cunhado pela amizade e carinho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Geni da Silva Sodré, por ser uma pessoa tão maravilhosa. Pela confiança que a me foi dada, pelo apoio em todos esses anos e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Grupo de Pesquisa INSECTA, em especial ao Professor Carlos Alfredo Lopes de Carvalho pela oportunidade de desenvolver meu trabalho junto ao Grupo.

Aos colegas de pesquisa Polyana Carneiro, Cerilene Machado, Mariza Alves, Cristovam Lima Junior, Maiara Janine, Carize Mercês, Daiane Oliveira, Daniel Moraes, Rosane da Silva, Carla Miquez, Adailton Freitas, Cátia Lucas, Cândida Lima, Eliabe Barros e Todos pela descontração nos momentos de trabalho.

Aos Coorientadores: Dr<sup>a</sup>. Cerilene Santiago Machado e Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Leticia Miranda Estevinho (IPB/PT) pelo apoio na publicação do artigo e pela ajuda em treinamentos e disciplina ministrada.

Ao Meliponicultor Márcio Pires pelo apoio na aquisição das amostras.

Aos colegas de turma do semestre 2014.1

A todos os amigos e familiares que não foram citados, mas que torcem por mim e estão felizes por mais uma conquista.

A todas as pessoas que se fizeram presentes e que foram solidárias, e que de uma forma ou de outra permitiram concluir este trabalho.

## **SUMÁRIO**

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
 <b>Capítulo 1</b>	
ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DO PÓLEN ARMAZENADO POR <i>Melipona mandacaia</i> SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE), SUBMETIDO A DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO.....	08
 <b>Capítulo 2</b>	
ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO PÓLEN ARMAZENADO POR <i>Melipona mandacaia</i> SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE) SUBMETIDO A DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO.....	30
 <b>Capítulo 3</b>	
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE PÓLEN DE ABELHA <i>Melipona mandacaia</i> SMITH, 1863 .....	67
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	98

# QUALIDADE DO PÓLEN ARMAZENADO (SAMBURÁ) POR *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE) SUBMETIDO A MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

Autora: Marivalda Figueredo Santa Bárbara

Orientadora: Geni da Silva Sodré

**RESUMO:** Este estudo objetivou contribuir com informações sobre o pólen armazenado (samburá) por *Melipona mandacaia*, estabelecendo técnicas adequadas para a sua conservação, de maneira a fornecer subsídios para incremento da atividade meliponícola. O pólen coletado formou uma única unidade analítica, sendo retirada uma alíquota para as análises do produto *in natura*, posteriormente dividida em quatro partes e submetidas a quatro processos de conservação: refrigeração, pasteurização, secagem e desumidificação. Na sequência foram armazenados por 180 dias e realizadas análises mensais dos parâmetros microbiológicos: bolores e leveduras, aeróbios mesófilos, psicotróficos, coliformes totais e *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* sulfito redutores e *Staphylococcus* coagulase positiva e físico-químicos acidez livre, açúcares redutores, atividade de água, carboidrato, cinzas, lipídios, proteínas, pH, umidade, valor energético, atividade antioxidante, fenóis totais, flavonoides totais e ácidos graxos. Não foi detectado contaminação para nenhum dos microrganismos analisados. As avaliações físico-químicas revelaram os seguintes valores médio: acidez livre 134,64 meq.kg<sup>-1</sup>; açúcares redutores 10,20%; Aw 0,66; carboidratos 65,78%; cinzas 5,48%; lipídios 3,22%; proteínas 25,93%; pH 3,55; umidade 22,36%; valor energético 395,96 Kcal; atividade antioxidante 1,30 mg.mL<sup>-1</sup>; fenóis totais 37,14 mg GAE.g<sup>-1</sup> e flavonoides totais 0,86 mg QE.g<sup>-1</sup>, para o pólen submetidos a métodos de conservação. Os perfis de ácidos graxos poli-insaturados foram significativamente maiores do que os mono-insaturados e saturados. As características microbiológicas e físico-químicas foram mantidas durante o armazenamento do samburá.

**Palavras chave:** Ácidos graxos, flavonoide, desumidificação, estabilidade.



# QUALITY OF THE POLLEN STORED (SAMBURÁ) BY *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE) SUBMITTED TO PRESERVATION METHODS

Author: Marivalda Figueredo Santa Bárbara

Advisor: Geni da Silva Sodré

**ABSTRACT:** The present study aimed at providing information on the pollen stored (locally known as *samburá*) by the stingless bee *Melipona mandacaia* aiming at elaborating techniques for pollen preservation and set the ground for a growth in meliponiculture. The pollen collected formed a single analytical unit, from which we removed one aliquot for analyzing the *in natura* product. Next, we divided this aliquot into four parts and submitted those parts to four preservation methods: refrigeration, pasteurization, drying, and dehumidification. Then, we stored those samples for 180 days and carried out monthly analyses of microbiological parameters: molds and yeasts, mesophilic aerobic and psychrotrophic bacteria, total coliforms and *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., sulfite reducer *Clostridium*, and coagulase-positive *Staphylococcus*. We also checked monthly the physicochemical parameters: free acidity, reducing sugars, water activity, carbohydrate, ashes, lipids, protein, pH, humidity, energy value, antioxidant activity, total phenols, total flavonoids, and fatty acids. We did not detect contamination by any microorganism analyzed. The physicochemical analysis of the pollen submitted to preservation methods revealed the following average values: free acidity: 134.64 meq.kg<sup>-1</sup>, reducing sugars: 10.20%, water activity: 0.66, carbohydrates: 65.78%, ashes: 5.48%, lipids: 3.22%, proteins: 25.93%, pH: 3.55, humidity: 22.36%, energy value: 395.96 Kcal, antioxidant activity: 1.30 mg.mL<sup>-1</sup>, total phenols: 37.14 mg GAE.g<sup>-1</sup>, and total flavonoids: 0.86 mg QE.g<sup>-1</sup>. The profiles of polyunsaturated fatty acids were significantly larger than those of monounsaturated and saturated fatty acids. Microbiological and physicochemical characteristics were maintained during pollen storage.

**Keywords:** Fatty acids, flavonoid, dehumidification, stability.

## INTRODUÇÃO

Os meliponíneos estão subdivididos em duas tribos: Trigonini, que agrupa um grande número de gêneros (tais como *Trigona*, *Tetragona*), e Meliponini, composta apenas pelo gênero *Melipona*, encontrado exclusivamente na região Neotropical (América do Sul, Central e Ilhas do Caribe) (PALAZUELOS; BALLIVIÁN, 2008). Dentre as espécies que se destacam no gênero *Melipona* temos a *Melipona mandacaia* popularmente conhecida como mandacaia, essa espécie é endêmica do bioma Caatinga com registros de ocorrência nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe (SILVEIRA et al., 2002; CAMARGO; PEDRO, 2008).

Na Bahia a *M. mandacaia* foi registrada entre as nove espécies de abelhas nativas existentes na região do Vale do Submédio São Francisco (RIBEIRO et al., 2012). O desenvolvimento da criação racional das colônias dessa espécie possibilita a exploração econômica de seus produtos como mel, o pólen (samburá), o cerume, a geoprópolis e a formação de novos ninhos (CAMARGO; PEDRO, 2008).

O Mel desta espécie teve sua qualidade físico-química comprovada em estudo realizado por Alves et al. (2005). No entanto, ainda não há relatos na literatura para os demais produtos, oriundos desta espécie a exemplo do pólen armazenado.

O pólen das flores é recolhido pelas abelhas quando entram em contato com os estames, com o auxílio de muitos pentes e pêlos espalhados por seus corpos, aglutinam os grãos de pólen colhidos das flores, em forma de bolotas ou grânulos, posteriormente são transportados para a colmeia, onde são colocado nos alvéolos das abelhas *Apis mellifera* ou em potes no caso de abelhas sociais sem ferrão (LEBLANC et al., 2009; VASCONCELOS, 2009).

O pólen de abelha contém substâncias nutricionais importantes, como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais (CARPES et al., 2013). Entretanto, cada tipo de pólen apícola têm suas características específicas ligadas à sua espécie floral. O valor nutricional desse produto, varia segundo sua origem botânica e geográfica (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

O pólen é a principal fonte de alimento não líquido para as abelhas, contém todos os nutrientes essenciais, pois dele dependem as abelhas para o seu suprimento de proteínas, sais minerais e produtos biológicos especiais utilizados na sua alimentação. Por essa razão, a produção de mel, cera e geléia real de um apiário está diretamente relacionada com a quantidade de pólen necessária para a alimentação da colmeia ( MARCHINI et al., 2006; GRAIKOU et al., 2011). A quantidade e a qualidade de pólen coletado pelas abelhas afetam a reprodução, a criação de larvas, a longevidade e a produtividade da colônia (HUMAN et al., 2006).

O pólen de abelha é conhecido como o "único alimento perfeitamente completo", pois ele contém todos os aminoácidos essenciais necessários para o organismo humano (PASCOAL et al., 2014). Este produto da colmeia foi usado tradicionalmente para consumo humano, bem como em medicina popular e complementar.

De fato, a evidência recente relata valiosas propriedades biológicas, entre as quais: antimicrobiana, anti-inflamatória, antimutagênica (ÖZCAN et al., 2004; KACÁNIOVÁ et al., 2012), antioxidante (MORAIS et al., 2011), antialérgica (MOITA et al., 2014), antiviral, hipoglicêmica, hipolipidêmica e imunoestimulante (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015); redutor dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol (LEGLER, 2002), imunomoduladora (FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ et al., 2013) e atividade anticancerígena (MARKIEWICZ-ŽUKOWSKA et al., 2013).

No entanto, o pólen apesar de ter bastantes benefícios para a saúde, é necessário que a manipulação seja adequada, pois este produto é suscetível a contaminações ambientais e ao crescimento de microrganismos devido, sobretudo, ao seu elevado teor de nutrientes. De fato, o pólen está exposto a contaminações microbianas, que podem ter origem nas abelhas, materiais vegetais, insetos, animais, manipulação e equipamentos agrícolas (HANI et al., 2012).

A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e

distribuição para o consumo, sua vida útil e potencial risco à saúde da população, isto é, potencial de ser um veículo de transmissão de doenças de origem alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Segundo a Normativa nº 03, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), para ser comercializado no Brasil, o pólen apícola deve apresentar os seguintes requisitos físico-químicos: umidade máxima de 30% para o pólen fresco e umidade máxima de 4% para o pólen seco; teor de cinzas máximo de 4%; lipídios mínimo de 1,8%; proteínas mínimo de 8%; açúcares totais de 14,5% a 55,0%; fibra bruta mínimo de 2% e pH de 4 a 6. Essa composição do pólen não possui um padrão rigoroso, pois varia com a origem floral, áreas geográficas, condições ambientais, climáticas, idade e estado nutricional da planta e estações do ano. De fato, o pólen é dos produtos da colmeia que apresenta maior diversidade (CARPES, 2008; NOGUEIRA et al., 2012, ESWARAN; BHARGAVA, 2014).

O pólen é designado como pólen apícola quando coletado em sua forma original e pólen apícola desidratado quando desidratado até atingir 4% de umidade em temperatura menor que 42°C, conforme Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola (BRASIL, 2001).

A secagem do pólen apícola é um processo de extrema importância para a sua conservação e conseqüentemente para a segurança alimentar deste produto. O processo de secagem reduz o teor de umidade de 25-30% para valores entre 4% e 8%, considerados adequados para a sua preservação (CAMPOS et al., 2008). De acordo com Marchini et al. (2006), o pólen é altamente higroscópico sendo influenciado pelo tipo de embalagem utilizada, além das condições de armazenamento.

Com base neste contexto o objetivo deste trabalho foi contribuir para o conhecimento sobre o pólen (samburá) armazenado por *Melipona mandacaia*, estabelecendo técnica adequada para a sua conservação, de maneira a fornecer subsídios para programas e medidas de incremento da atividade meliponícola. Dessa forma, este trabalho foi estruturado em três Capítulos:

Capítulo 1: Estabilidade microbiológica do pólen armazenado por *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae) submetido a diferentes métodos de conservação;

Capítulo 2: Estabilidade físico-química do pólen armazenado por *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae) submetido a diferentes métodos de conservação;

Capítulo 3: Avaliação microbiológica, caracterização nutricional e composição fenólica do pólen armazenado por *Melipona mandacaia* Smith, 1863.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES, R. M. O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644-650, 2005.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa e Agropecuária. Instrução Normativa N° 03, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de janeiro de 2001.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Meliponini Lepeletier, 1836. In J.S. Moure, D. Urban & G.A.R. Melo (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version, 2008. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

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

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil.** 2008. 245f. (Tese) Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

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

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

FRANCO, G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008.

GRAIKOU, K. et al. Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. **Chemistry Central Journal**, v. 33, n. 5, p. 1-9, 2011.

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

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

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

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

LEBLANC, Blaise W. et al. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1299-1305, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RIBEIRO, M.de F.; RODRIGUES, F.; FERNANDES, N.de.S. A mandaçaia (*Melipona mandacaia*) e seus hábitos de nidificação na região do polo Petrolina(PE)- Juazeiro(BA). **Mensagem Doce**, n.115, p. 6-10, 2012.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 253p, 2002.

VASCONCELOS, M.R.S. **Pólen Apícola do estado de Alagoas: composição físico-química, origem botânica e atividade antioxidante**. 2009 102 f. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2009.



# CAPÍTULO 1

**ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DO PÓLEN ARMAZENADO POR  
*Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE),  
SUBMETIDO A DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Manuscrito a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Caatinga.

**ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DO PÓLEN ARMAZENADO POR *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE), SUBMETIDO A DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO.**

**RESUMO:** O pólen fresco coletado pelas abelhas apresenta teor de umidade elevado, em média 30%, que combinados com ingredientes altamente nutritivos representam um substrato adequado para o crescimento de microrganismos. Este estudo objetivou avaliar a estabilidade microbiológica do pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia*, submetidos a diferentes métodos de conservação. Foram coletados 6 Kg de pólen armazenado (samburá) da abelha *M. mandacaia* do município de Uibaí (11°20'13"S 42°07'58"O) localizado no semiárido da Bahia e encaminhado ao Núcleo de Estudos dos Insetos-INSECTA da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas. O pólen coletado formou uma única unidade analítica, sendo posteriormente dividido em quatro partes iguais e submetidas a quatro processos de conservação: refrigeração, pasteurização, secagem e desumidificação na sequência armazenados por 180 dias em temperatura ambiente exceto o tratamento refrigeração que foi armazenado em geladeira. Mensalmente foram realizadas análises dos parâmetros microbiológicos: bolores e leveduras, aeróbios mesófilos e psicrotróficos cultiváveis, coliformes totais e *Escherichia coli* *Salmonella* spp., *Clostridium* sulfite redutores e *Staphylococcus* coagulase positiva. Não foi detectado contaminação para nenhum dos microrganismos investigados na amostra *in natura*, bem como no pós-processamento. O samburá se manteve livre de contaminantes em todos os processos empregados apresentando estabilidade durante os 180 dias de armazenamento, comprovando a eficiência dos métodos de conservação empregados.

**Palavras-chave:** Armazenamento, desumidificação, microrganismo, pasteurização.

**MICROBIOLOGICAL ESTABILITY OF THE POLLEN STORED (SAMBURÁ)  
BY *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE),  
SUBMITTED TO DIFFERENT PRESERVATION METHODS**

**ABSTRACT:** The fresh pollen collected by bees has high humidity, on average 30%, which combined with highly nutritive ingredients provides a substrate for the growth of microorganisms. The objective of the present study was to assess the microbiological stability of the pollen stored (locally known as *samburá*) by the stingless bee *Melipona mandacaia*, submitted to different preservation methods. We collected 6 kg of *samburá* stored by *M. mandacaia* bees in Uibaí (11°20'13" S, 42°07'58" W), in the semi-arid region of Bahia, northeastern Brazil. We sent the pollen to the Center for Insect Studies (INSECTA) of the Federal University of Recôncavo da Bahia at Cruz das Almas. The pollen collected formed a single analytical unit. Next, we divided the pollen into four equal parts, which we submitted to four preservation methods: refrigeration, pasteurization, drying, and dehumidification. Then, we stored those samples for 180 days at ambient temperature, except for the refrigeration treatment, which we stored in the fridge. We carried out monthly analyses of microbiological parameters: molds and yeasts, cultivable mesophilic aerobic and psychrotrophic bacteria, total coliforms and *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., sulfite reducer *Clostridium*, and coagulase-positive *Staphylococcus*. We did not detect contamination by any microorganism investigated in the *in natura* and post-processing samples. The *samburá* remained contaminant-free in all processes and showed stability during the 180 days of storage, which proved the efficiency of the preservation methods used.

**Keywords:** Storage, dehumidification, microorganism, pasteurization.

## INTRODUÇÃO

O pólen é um material fino, em pó produzido por flores das plantas e coletado pelas abelhas operárias, que é homogeneizado com pequenas quantidades de néctar e saliva sendo recolhido na entrada da colmeia ou armazenados no interior da colônia em potes ou favos (ABOUDA et al., 2011; PETROVIĆ et al., 2014).

O pólen de abelha é um alimento de qualidade nutricional, devido as concentrações elevadas de açúcares redutores, aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados ou saturados, minerais como Zn, Cu, Fe, alta relação K e Na, e várias vitaminas: provitamina A, vitamina E (tocoferol), niacina, tiamina, ácido fólico e biotina (CAMPOS et al., 2010).

Nos últimos anos vem ocorrendo mudança nos hábitos alimentares dos consumidores, onde as pessoas aspiram por dietas mais saudáveis e nutritivas. Com isso o pólen apícola e o pólen armazenado (samburá) são consumidos com fins apiterápico devido as suas propriedades nutricionais e medicinais (ABOUDA et al., 2011).

O teor de água no pólen fresco coletado pelas abelhas é de cerca de 20-30%, que combinados com ingredientes altamente nutritivos representam um substrato adequado para o crescimento de uma variedade de microrganismos, especialmente leveduras, fungos e bactérias formadoras de esporos (BRINDZA et al., 2010; BOGDANOV, 2014).

O beneficiamento do pólen apícola *in natura* é um processo que consiste em transforma-lo em pólen apícola desidratado, definido como sendo o produto que passa por processo de desidratação, seguindo os procedimentos adequados de tratamento, com temperatura inferior a 42 °C, e com teor de umidade inferior a 4% (BRASIL, 2001a).

Portanto, o pólen apícola tem que ser imediatamente processando após coleta, a fim de estender a sua vida útil e evitar a deterioração (PETROVIĆ et al., 2014).

Diante do exposto o objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade microbiológica do pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia*, submetido a diferentes métodos de conservação.

## MATERIAL E MÉTODOS

## **1. Coleta**

Foi coletado pólen armazenado (samburá) da abelha mandacaia (*Melipona mandacaia*) em 50 colônias de apenas um meliponário do município de Uibaí (11°20'13" S 42°07'58" O), pertencente a microrregião de Irecê, no semiárido do estado da Bahia, na região Nordeste do Brasil. A coleta foi realizada em março de 2014, período de maior florada na região. Foram coletados aproximadamente seis quilos de samburá diretamente nos potes por meio de espátulas esterilizadas. Armazenado em recipientes, previamente esterilizados e transportado em caixa térmica com gelo até o laboratório.

## **2. Local**

O experimento foi desenvolvido no Núcleo de Estudos dos Insetos INSECTA do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas - BA.

## **3. Métodos de conservação**

O samburá foi homogeneizado para formação de uma única amostra homogênea, e em seguida retirada uma alíquota para realizar as análises microbiológicas: Quantificação de aeróbios mesófilos e psicrotróficos cultiváveis, coliformes totais e *Echerichia coli*, bolores e levedura, *Clostridium* sulfito redutores, *Staphylococcus* coagulase positivo e pesquisa de *Salmonella* spp. estas foram feitas antes de serem submetidas aos métodos de conservação. O pólen foi dividido em quatro partes que foram submetidas a quatro métodos de conservação: refrigeração, pasteurização, secagem e desumidificação.

### **3.1. Refrigeração (P1)**

O samburá foi dividido em sub amostras de 50 g cada e foram colocadas em 21 potes de vidro de 150 g que foram hermeticamente lacrados e mantidos protegido da luz. Estes foram mantidos sob refrigeração por 180 dias, utilizado a temperatura 0°C a 5°C um pouco acima do ponto de congelamento.

### **3.2. Pasteurização (P2)**

As amostras de 50 g de samburá foram acondicionadas em 21 potes de vidro de 150 g e submetidas ao processo de pasteurização lenta, realizado em conformidade com Witter et al. (2005) utilizando uma temperatura de 65°C por 30 minutos em banho-maria. Estes foram hermeticamente lacrados, protegidos da luz e mantidos em temperatura ambiente, em prateleiras no laboratório por 180 dias.

### **3.3. Secagem (P3)**

O samburá foi espalhado em bandejas e submetido a secagem tradicional em estufa de circulação forçada de ar a 40°C, por aproximadamente 36 horas até atingir a umidade constante. Logo após o samburá foi fracionado em amostras de 50 g e colocados em 21 potes de vidro de 150 g. Estes foram hermeticamente lacrados, protegidos da luz e mantidos em temperatura ambiente, em prateleiras no laboratório por 180 dias.

### **3.4. Desumidificação (P4)**

O samburá) foi espalhado em bandeja e submetido ao processo de desumidificação em Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.) conforme Carvalho et al. (2009) com temperatura de  $35 \pm 2,3$  °C e umidade de 40%, por aproximadamente 36 horas. Logo após o samburá foi fracionado em 21 potes de vidro de 150 g. Estes foram hermeticamente lacrados, protegidos da luz e mantidos em temperatura ambiente, em prateleiras no laboratório por 180 dias.

## **4. Análises microbiológicas**

Mensalmente foram realizadas análises microbiológicas: quantificação de aeróbios mesófilos e psicrotróficos cultiváveis, coliformes totais e *Echerichia coli*, bolores e leveduras, Clostridium sulfito redutores, *Staphylococcus* coagulase positivo e pesquisa de *Salmonella* spp. das amostras submetidas aos métodos de conservação, as avaliações foram feitas em triplicata.

O experimento obteve o seguinte delineamento experimental: 4 x 7 com 3 repetições, sendo quatro tratamentos, sete tempos de avaliações com três repetições. Sendo três potes por tratamento para cada mês.

As análises foram realizadas seguindo o método da *American Public Health Association* (APHA) descrito nas normas internacionais para cada grupo de microrganismo (DIWNES et al., 2001).

#### **4.1. Contagem de Aeróbios Mesófilas e Psicotróficos Cultiváveis**

Inicialmente, pesaram-se 10 g de samburá que foram colocados em 90 mL de Água Peptonada a 0,1%, correspondendo à diluição inicial  $10^{-1}$ . Em seguida, foram realizadas sucessivas diluições até  $10^{-3}$ . Posteriormente, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram plaqueadas, em duplicata, em meio Plate Count Agar (PCA), utilizando o método “pour plate”, e incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. Para a contagem de psicotróficos foi realizado o plaqueamento em superfície utilizando 0,1 mL de cada diluição. As placas foram incubadas a 7°C por 10 dias. Após esse período foi realizada a contagem das placas que continha de 25 a 250 colônias, com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix-CP 600 Plus) (SILVA et al., 2010). O resultado foi expresso em Unidade Formadora de Colônias por grama (UFC/g).

#### **4.2. Contagem de bolores e leveduras**

Inicialmente, pesaram-se 10 g de samburá que foram colocados em 90 mL de Água Peptonada a 0,1%, correspondendo à diluição inicial  $10^{-1}$ . Em seguida, foram realizadas sucessivas diluições até  $10^{-3}$ . Para a contagem dos fungos foram semeadas alíquotas de 0,1 mL na superfície do meio Agar Sabouraud Dextrose, suplementado com cloranfenicol, em duplicata, e incubadas a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por cinco a sete dias. Passado este período, foi realizada a contagem nas placas com crescimento de colônias típicas de fungos sendo os resultados expressos em UFC/g (SILVA et al., 2010).

#### **4.3. Determinação do grupo dos coliformes**

Para a análise dos coliformes totais e *Escherichia coli*, foram pesados 10 g de samburá e colocados em 90 mL de Água Peptonada a 0,1%, correspondendo à diluição inicial  $10^{-1}$ . A partir desta diluição, foram realizadas as demais até  $10^{-3}$ . A determinação do Número Mais Provável (NMP.g<sup>-1</sup>) de coliformes foi realizada usando a técnica de fermentação dos tubos múltiplos. Alíquotas de 1 mL foram inoculadas em caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo tubos de *Durhan* invertidos e incubados por 48 horas a 35°C (SILVA et al., 2010).

#### **4.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Para a pesquisa de *Salmonella*, 25 g da amostra de samburá foram submetidas a um pré-enriquecimento em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW) a 0,1%, e incubados a 35°C por 24 horas. Decorrido esse período, foram retiradas alíquotas de 1 mL e 0,1 mL e inoculadas em 10 mL de caldo Tetrionato (TT) e 10 mL de caldo Rappaport (RV), e incubados por 24 horas a 37°C e 41,5°C em banho-maria, respectivamente. Em seguida, alíquotas foram estriadas nos meios seletivos Agar Mac Conkey (colônias incolores ou translúcidas levemente amareladas), Agar *Salmonella* Shigella (SS) (colônias transparentes com ou sem centro negro) e Agar Verde Brilhante (BGA) (colônias rosáceas a vermelhas) e incubadas por 24 horas a 35°C. (somático e polivalente) (SILVA et al., 2010).

#### **4.5. Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva***

Inicialmente, pesaram-se 10g de samburá que foram colocados em 90 mL de Água Peptonada a 0,1%, correspondendo à diluição inicial  $10^{-1}$ . Em seguida, foram realizadas sucessivas diluições até  $10^{-3}$ . Posteriormente, foi semeada alíquota de 0,1 mL na superfície do meio Agar Baird Parker, em duplicata, e incubou-se a 35°C/ 48 h. Em seguida, foi realizada a contagem do número de colônias que apresentavam características típicas, ou seja, colônias negras, circulares, brilhantes, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente (SILVA et al., 2010).

#### **4.6. Contagem de *Clostridium* sulfito redutores**

Inicialmente, pesaram-se 10 g samburá que foram colocados em 90 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW) a 0,1%, correspondendo à diluição inicial  $10^{-1}$ . Em seguida, foram realizadas sucessivas diluições até  $10^{-3}$ . A partir das diluições escolhidas, semeadas alíquotas de 1 mL em placas estéreis e adicionou cerca de 15 mL de Agar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC) temperatura de 46°C a 48°C, deixadas para solidificarem em superfície plana. Imediatamente após a solidificação do Agar, incubou as placas (sem inverter), em jarra de anaerobiose a 46°C por 18 a 24 horas (SILVA et al., 2010).

### **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas, pelo teste de Tukey para um nível de significância ( $p \leq 0,05$ ). A análise estatística dos dados foi efetuada utilizando o programa ASSISTAT versão 7.7 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para as avaliações microbiológicas de bolores e leveduras, aeróbios mesófilos e psicrotróficos cultiváveis, coliformes totais e *Escherichia coli* Salmonella spp., *Clostridium* sulfito redutores e *Staphylococcus* coagulase positiva no pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia* in natura antes do processamento não foi detectada contaminação para nenhum dos microrganismos, comprovando a qualidade microbiológica do samburá, ao mesmo tempo que reforçam a importância das boas práticas de coleta e manipulação do produto evitando assim possíveis contaminações.

### Bactérias Mesófilas cultiváveis

Na Tabela 1 observa-se que as análises microbiológicas realizadas do samburá após o processamento (tempo 0) indicou contagem de  $1,04 \times 10^2$  e  $1,56 \times 10^2$  (UFC.g<sup>-1</sup>) para bactérias mesófilas em P3 (secagem) e P4 (desumidificação), que se manteve constante durante todo o armazenamento, não havendo diferença entre os tempos de armazenamento. As amostras submetidas aos tratamentos P1 (refrigeração) e P2 (pasteurização) se mantiveram isentas de contaminação.

Ferreira (2012) detectou contaminação por bactérias mesófilas cultiváveis em todas as amostras analisadas para samburá in natura de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Estevinho et al. (2012) obtiveram contagem em 40% de pólen apícola processado de Portugal com valores entre  $2,8 \times 10^3$  e  $7,6 \times 10^2$  (UFC.g<sup>-1</sup>).

Tabela 1. Médias das contagens de bactérias mesófilas cultiváveis no armazenamento do pólen armazenado (samburá) por *Melipona mandacaia* submetidos a métodos de conservação.

Microrganismo	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Bactérias	0	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	$1,04 \times 10^2$ b	$1,56 \times 10^2$ b
Mesófilas	30	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	$2,58 \times 10^2$ b
(UFC.g <sup>-1</sup> )	60	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	$4,0 \times 10^2$ a	$2,03 \times 10^2$ b

90	<10 <sup>a</sup>	<10a	<10a	1,63 x10 <sup>2</sup> b
120	<10 <sup>a</sup>	<10a	<10a	1,46 x10 <sup>2</sup> b
150	<10 <sup>a</sup>	<10a	<10a	1,40 x10 <sup>2</sup> b
180	<10 <sup>a</sup>	<10a	<10a	2,26 x10 <sup>2</sup> b

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

O resultado encontrado neste trabalho está de acordo com o Código Alimentar Argentino (1998) que estabelece para pólen apícola desidratado o limite de  $150 \times 10^3$  (UFC.g<sup>-1</sup>) de aeróbio mesófilos, corroborando com os critérios microbiológicos estabelecidos para pólen apícola seco nas normas cubana a qual constitui limite  $\leq 10^4$  (UFC.g<sup>-1</sup>).

A detecção das bactérias mesófilas é empregada tanto para o controle da qualidade, como da eficiência das práticas de sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento do produto, a maioria dos alimentos apresentam alterações detectáveis a partir de  $10^6$  (UFC.g<sup>-1</sup>) (FRANCO; LANDGRAF, 2006). De acordo com Silva et al. (2010) bactérias mesófilas não são consideradas indicador de segurança, pois não estão diretamente relacionados a presença de patógeno ou toxina. A contagem desse microrganismo pode ser usada também para avaliar a vida de prateleira, uma vez que, excesso de bactérias mesófilas compromete a qualidade organoléptica do produto.

A Contagem de bactérias mesófilas do tratamento (P4) desumidificação pode ter ocorrido devido a exposição ambiental que ocorreu no momento do processamento, uma vez que o ambiente de desidratação é maior e não se faz uso de temperatura.

### **Bactérias Psicotróficas cultiváveis**

Bactérias psicotróficas cultiváveis não foram detectadas nas amostras submetidas aos tratamentos empregados para conservação do samburá, bem como em todo o período de armazenamento A mesma observação foi realizada por Almeida et al. (2014) analisando pólen apícola na Bahia.

Os psicotróficos, embora apresentem crescimento ótimo na mesma faixa de temperatura dos mesófilos, são capazes de crescer a temperaturas próximas a 0 °C. Quando se trata de alimentos refrigerados, os psicotróficos constituem-se num

grave problema, pois, continuam a crescer sob refrigeração, embora não cresçam as taxas tão altas quanto sob temperatura ambiente (SILVA et al., 2010).

Segundo Lima (2013) altas contagens de microrganismos psicrófilos estão associadas a deficiências na higiene, falhas na limpeza e sanitização de equipamento de refrigeração ou quando o tempo de estocagem refrigerado é demasiadamente longo.

Apesar do tratamento P1, ser um método de conservação por refrigeração e o produto ter ficado armazenado por 180 dias não houve proliferação desse microrganismo, evidenciando que foram adotadas as boas práticas de higiene durante o manuseio e armazenamento.

### **Bolores e leveduras**

Em relação à contagem de bolores e leveduras, constatou-se a eficácia dos métodos de conservação empregados, uma vez que, não foi constatada presença de bolores e leveduras em nenhuma das amostras analisadas durante a vida de prateleira do samburá

Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Pinheiro et al. (2007) analisando samburá *in natura* de espécies de *Melipona* (*Melipona flavolineata* e *Melipona fasciculata*) onde não houve presença destes microrganismos. A elevada acidez do samburá de *Melipona* é responsável pela sua autoconservação, o que pode ter levado a inibição do crescimento dos bolores.

Rodrigues et al. (2008) analisando amostras de samburá de *Tetragonisca angustula* detectou a presença de fungos em todas as 30 amostras, sendo seis gêneros fúngicos, com presença dos principais gêneros produtores de micotoxinas.

Em trabalhos realizados com pólen apícola *in natura* e processado por Brindza et al. (2010), Santos et al. (2010), Féas et al. (2012), Hani et al. (2012), Puig-Peña et al. (2012), esses autores quantificaram bolores e leveduras em 100% das amostras analisadas. No entanto, Estevinho et al. (2012) e Nogueira et al. (2012) verificaram a presença de bolores e leveduras em 60 e 50% das amostras em pólen processado de Portugal.

De acordo com Brindza et al. (2010), a grande maioria dos fungos isolados de pólen são representados por grupo de fungos mitospórico de microrganismos que habitam o solo saprófitos de resíduos orgânicos de plantas, indicando a proveniência destes microrganismos do microambiente do apiário.

Os problemas causados pelo desenvolvimento de fungos nos alimentos e suas matérias-primas são motivo de preocupação para a indústria de alimentos. Não apenas pelo fato de reduzir consideravelmente os valores nutritivos dos alimentos, mas também pelas micotoxinas que se encontram presentes uma vez que haja a contaminação fúngica (ZANDONADI, 2007).

Nogueira et al. (2012) afirmaram que a época de colheita do pólen nas colmeias tem também influência na contaminação por bolores e leveduras.

### **Coliformes totais e *Escherichia coli***

Para todas as amostras submetidas em todos os tratamentos analisados em todos os tempos de armazenamento, bem como, na amostra *in natura* não houve contagem para coliformes totais e *Escherichia coli*

Nogueira et al. (2012) não verificaram a presença de coliformes totais e *E. coli* em pólen desidratado de Portugal. Entretanto, Puig-Peña et al. (2012) analisando pólen apícola *in natura* e desidratado em Cuba detectaram presença de coliformes totais e *E. coli*.

A pesquisa de coliformes fecais ou *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos, em alimentos processados indica processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Podendo também ser usado para refletir a qualidade microbiológica de produtos em relação à vida de prateleira ou à segurança, neste último caso, devido à presença de patógenos alimentares (SILVA et al., 2010).

Os resultados apresentados neste estudo avigoram o uso das boas práticas de higiene adotadas no manuseio do samburá neste trabalho, uma vez que, não houve contaminação durante o processamento e no pós processamento, que se manteve estável por todo o período do armazenamento.

### ***Salmonella* spp.**

A Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que fixa o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, determina ausência em 25 g do produto seja qual

for o alimento. A presença desta bactéria nos alimentos o coloca como impróprio para o consumo.

O samburá se manteve ausente para esse microrganismo, desde a análise da amostra *in natura*, após a realização dos processamentos na amostra e no período de armazenamento da amostra Corroborando com esses resultados Ferreira (2013) também não encontrou presença de *Salmonella* em samburá *in natura* e processado de *Melipona scutellaris* da Bahia.

Por outro lado, Puig-Peña et al. (2012) constataram presença de *Salmonella* sp. em pólen apícola *in natura* e processado em Cuba, os critérios microbiológicos estabelecidos nas normas para pólen apícola em Cuba é ausência em 25 g do produto.

*Salmonella* é uma bactéria de ampla ocorrência em animais e no ambiente sendo as principais fontes a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios. A salmonelose geralmente é contraída por meio do consumo de alimentos contaminados (SILVA et al., 2010). Segundo Franco e Landgraf, (2006) está comumente envolvida em surtos alimentares, devido ao fato de que mesmo, presente em pequenas quantidades, pode causar danos à saúde do consumidor.

### ***Staphylococcus coagulase positiva***

Não houve contagem para *Staphylococcus* coagulase positiva para o samburá) por *M. mandacaia* em nenhuma das etapas de análise realizada neste trabalho Em amostras de pólen apícola da Argélia foi detectado por Hani et al. (2012) presença de *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria também foi observada por Puig-Peña et al. (2012) em pólen apícola seco e fresco em Cuba.

*Staphylococcus* em altas densidades em alimentos constituem risco à saúde humana, por causa do seu potencial toxigênico. Estes podem se desenvolver durante os estágios de produção ou estocagem e produzir toxinas quando encontram condições favoráveis ao seu desenvolvimento (CUNHA NETO et al., 2002).

Estas bactérias são frequentemente isoladas a partir da pele, cabelo, vias nasais e garganta de humanos (portadores assintomáticos) e animais de sangue quente, sendo algumas capazes de produzir enterotoxinas, fato que é particularmente grave, uma vez que, estas toxinas são extremamente resistentes

ao calor podendo muitas vezes persistir no produto processado, livre de formas viáveis deste microrganismo (ESTEVEES, 2005; SILVA et al., 2010).

Esses grupos de microrganismos são utilizados como indicadores de contaminação do alimento pelos manipuladores. No entanto, não houve contaminação desse produto, confirmando o emprego correto das boas práticas de higiene na manipulação, processamento e armazenamento do samburá.

### ***Clostridium* sulfito redutores**

Não foi constatado crescimento de *Clostridium* sulfito redutores no samburá. As análises foram realizadas tanto na amostra *in natura* como em pós processamento, em nenhum momento foi verificado a presença desse microrganismo. Foram feitas análises mensais durante os 180 dias de armazenamento, que comprovaram a eficiência dos métodos empregados para conservação do produto, uma vez que o pólen armazenado se manteve livre de patógenos.

Os procedimentos de enlatamento e cocção matam os microrganismos, sem necessariamente matar os endósporos que, em condições anaeróbias adequadas, germinam e produzem toxinas. O botulismo é uma doença grave, que deve ser considerada emergência médica e de saúde pública. O botulismo infantil, também conhecido como botulismo de lactentes (associado à Síndrome de Morte Súbita do Recém-Nascido) ocorre em crianças muito jovens devido à absorção de toxina produzida *in vivo*, no intestino da criança. A ausência da microbiota de proteção permite a germinação de esporos de *C. botulinum* ingeridos e a produção de toxina na luz intestinal (CERESER et al., 2008). Fato que norteou o não consumo de mel por crianças de até dois anos.

Nevas et al. (2006) em seu estudo revelaram a presença de *C. botulinum* em toda a colônia, em amostras de abelhas, cera, mel dos favos, mel centrifugado, grãos de pólen e pólen estocado nos favos (pão das abelhas), sendo que a cera de abelha e o mel dos favos são os produtos mais contaminados. Por este fato, são necessárias maiores investigações não somente na detecção de *C. botulinum* no mel, mais em outros alimentos de origem apícola. Em trabalho realizado por Hervatin (2009) foi observada a presença de *Clostridium* sulfito redutores em amostras de pólen apícola do Sul do Brasil, submetidos há diferentes métodos de desidratação.

O tratamento P1 foi armazenado em refrigeração meio capaz de impedir o desenvolvimento destes, da mesma forma o tratamento P2 que foi a pasteurização, ação capaz de eliminar possíveis microrganismos quando presentes. Os tratamentos P3 e P4 foram submetidos a processos de desidratação e com a redução da atividade de água o que impede a proliferação destes microrganismos, uma vez que o produto venha a sofrer alguma contaminação.

A Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que fixa o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001b), estabelece a determinação de *Clostridium* sulfito redutor a 46°C tem por objetivo a indicação de *Clostridium perfringens* e a enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. Estabelecendo limites para os grupos de alimentos onde se faz necessário. A Legislação de Cuba para pólen apícola estabelece ausência para esses microrganismos (NRAG, 1985)

## CONCLUSÃO

O pólen armazenado (samburá) por *M. mandacaia* não apresentou contaminação por nenhum grupo dos microrganismos analisados. Os métodos aplicados para a conservação do samburá garantem a estabilidade microbiológica do produto durante os 180 dias de armazenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUDA, Z. et al. The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 376, 2011.

ALMEIDA, A. M. M. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de pólen apícola de Ribeira do Pombal. **Mensagem Doce**, v. 128, p. 2-4, 2014.

BOGDANOV, S. **Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health: A Review**. Bee Product Science, 2014. Disponível em: <http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PollenBook2Review.pdf>; Acesso em: 06-de jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa e Agropecuária. Instrução Normativa N° 03, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de janeiro de 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001b.

BRINDZA, J. et al. Pollen microbial colonization and food safety. **Acta Chimica Slovaca**, v. 3, n. 1, p. 95-102, 2010.

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

CARVALHO, C. A. et al. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 1, p. 143-149, 2009.

CERESER, N.D. et al. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 280-287, 2008.

**CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO**. De la Canal y Asociados. Buenos Aires: De la Canal y Asociados, 1998.



CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DIWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** Washington. 4 ed Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 677p.

ESTEVEES, A. Perigos microbiológicos em alheira: Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2005.

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

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

FERREIRA, A. F. **Composição físico-química, sensorial e microbiológica do pólen armazenado por *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: apidae)**. 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2012.

FERREIRA, R. D. C. **Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen da *Melipona scutellaris* Latreille submetido a diferentes processos de desidratação**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia Faculdade de Farmácia. Salvador, 2013.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006.

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

HERVATIN, H. L. **Avaliação microbiológica e físico-química de pólen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2009.

LIMA, S. A. J. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial da água de coco anão verde comercializadas pelas indústrias do sertão da Paraíba e do Ceará**. 2013. 126 fl. Dissertação. (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Pombal, 2013.

NEVAS, M. et al. Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. **Environmental Microbiology**, v. 8. n. 6, p. 1085-1094, 2006.

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

NRAG (Norma Ramal Apicultura Cubana.) en Cuba, **Apicultura: Polen apícola a granel**. Especificaciones de calidad. 1985.

PETROVIĆ, T. et al. Natural mycobiota and aflatoxin B1 presence in bee pollen collected in Serbia. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 30, n. 4, p. 731-741, 2014.

PINHEIRO, F. M. et al. Pólen de abelhas indígenas sem ferrão *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial. **Recursos naturais: uma reflexão para os profissionais da química**. Belém, PA: Conselho Regional de Química da 6ª Região, 2007. Disponível: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/408842/1/polendabelhasindigenassemferraomelipona>. Acesso em: 09 jul. 2015

PUIG-PENÃ, Y. et al. Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de um processo de secado. **CENIC Ciência Biológicas**. v.43, n.1, p. 23-27, 2012.

RODRIGUES, M. A. A. et al. Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de ilha Grande, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 30, p. 249-253, 2008.

SANTOS, L.O. et al. **Avaliação microbiológica do pólen apícola comercializado no Estado de São Paulo**. 2010. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010/Artigos/RE10215.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010. 624p.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

ZANDONADI, R. P. et al. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 1, p.19-26, 2007.

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B.; SANTOS, C. **Abelhas sem ferrão do Rio Grande do Sul: manejo e conservação**. Porto Alegre: Fepagro, 2005. 79 p.

## CAPÍTULO 2

### **ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO PÓLEN ARMAZENADO POR *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE) SUBMETIDO A DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência Rural

## ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO PÓLEN ARMAZENADO POR *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE) SUBMETIDO A DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivo avaliar as características físico-químicas do pólen armazenado (samburá) por *Melipona mandacaia*, submetidos a métodos de conservação. O samburá coletado foi homogeneizado formando uma única amostra, sendo posteriormente dividida em quatro partes iguais e submetidas a quatro processos de conservação: refrigeração, pasteurização, secagem e desumidificação na sequência armazenados por 180 dias. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: umidade; atividade de água; cinzas; lipídios; proteínas; açúcares redutores; pH; acidez livre, carboidratos, valor energético (Kcal) fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante. As avaliações dos parâmetros físico-químicos revelaram os seguintes valores médio: acidez livre 134,64 meq.kg<sup>-1</sup>; açúcares redutores 10,20%; atividade de água 0,66; carboidratos 65,78%; cinzas 5,48%; lipídios 3,22%; proteínas 25,93%; pH 3,55; umidade 22,36%; valor energético 395,96 Kcal/100g e atividade antioxidante 1,30 mg.mL<sup>-1</sup>; fenóis totais 37,14 mg GAE.g<sup>-1</sup>; flavonoides totais 0,86 mg QE.g<sup>-1</sup>. Para as amostras que foram submetidas aos tratamentos secagem (P3) e desumidificação (P4), que passaram por desidratação apenas os parâmetros proteína, lipídios e acidez estão de acordo com a legislação brasileira apresentada como padrão de qualidade oficial para o pólen apícola desidratado. Os métodos de conservação empregados para o samburá, mantiveram a estabilidade físico-químicas do produto durante os 180 dias de armazenamento.

**Palavras-chave:** Flavonoides, Fenóis, proteína, secagem.

**PHYSICOCHEMICAL STABILITY OF THE POLLEN STORED BY BY *Melipona mandacaia* SMITH, 1863 (HYMENOPTERA: APIDAE) SUBMITTED TO DIFFERENT PRESERVATION METHODS**

**ABSTRACT:** The present study aimed at assessing the physicochemical characteristics of the pollen stored (locally known as *samburá*) by *Melipona mandacaia* submitted to different preservation methods. We homogenized the *samburá* so it formed a single sample. Next, we divided that sample into four equal parts and submitted them to four preservation methods: refrigeration, pasteurization, drying, and dehumidification, and stored them for 180 days. We assessed the following physicochemical parameters: humidity, water activity, ashes, lipids, proteins, reducing sugars, pH, free acidity, carbohydrates, energy value (Kcal), total phenols, total flavonoids, and antioxidant activity. The analysis of physicochemical parameters revealed the following average values: free acidity: 134.64 meq.kg<sup>-1</sup>, reducing sugars: 10.20%, water activity: 0.66, carbohydrates: 65.78%, ashes: 5.48%, lipids: 3.22%, proteins: 25.93%, pH: 3.55, humidity: 22.36%, energy value: 395.96 Kcal/100g, antioxidant activity: 1.30 mg.mL<sup>-1</sup>, total phenols: 37.14 mg GAE.g<sup>-1</sup>, and total flavonoids: 0.86 mg QE.g<sup>-1</sup>. For the samples submitted to drying (P3) and dehumidification (P4) treatments, which underwent dehydration, only the parameters proteins, lipids, and acidity were in accordance with the Brazilian law for the official quality standards for the dehydrated pollen stored by bees. The preservation methods used for the *samburá* maintained the physicochemical stability of the product during the 180 days of storage.

**Keywords:** Flavonoids, phenols, protein, drying.

## INTRODUÇÃO

A sociedade como um todo tem buscado alternativas alimentares mais saudáveis; com isso está ocorrendo um consumo crescente de produtos naturais e orgânicos, dos quais, se destacam os produtos oriundos da criação de abelhas sociais sem ferrão (Meliponicultura) (RODRIGUES et al., 2008). Entre as espécies de abelhas que mais se destacam na meliponicultura, encontram-se as do gênero *Melipona*, entre as quais *Melipona mandacaia* Smith, 1863, conhecida por abelha mandacaia espécie endêmica da região semiárida brasileira.

Além do mel, também cresceu o interesse comercial pela produção de outros derivados meliponícolas, tais como, a própolis, o geoprópolis e o pólen armazenado (samburá) (SEBRAE, 2006). Segundo Markiewicz-Żukowska et al. (2013) o pólen armazenado tem um efeito positivo sobre o sistema imunitário de indivíduos saudáveis. Era frequente o uso do pólen armazenado pelos nossos antepassados devido as suas propriedades medicinais, razão pela qual motiva o uso do pólen apícola nos dias atuais (SILVA et al., 2005).

O pólen de abelhas consiste de pólenes de flores coletados por abelhas operárias, combinado com o néctar e suas substâncias salivares o material é compactado em grânulos, que são utilizados como alimento para as abelhas (KACANIOVA et al., 2012). As abelhas utilizam pólen como fonte nutricional de proteínas (25-30%), carboidratos (30-55%), lipídeos (1-20%), vitaminas e minerais (ABOUDA et al., 2011).

A composição do pólen apícola ou do pólen armazenado depende das espécies vegetais que as abelhas visitam, junto com outros fatores, como condições climáticas, tipo de solo e atividades do apicultor, e por essa razão é grande a diversidade de substâncias nutritivas contidas no pólen de abelha, que apresentam inúmeros benefícios tanto para o homem quanto para os animais (MORAIS et al., 2011; BARRETO et al., 2012).

Outras variações podem ser introduzidas por meio de processos de armazenamento ou tratamentos diferentes na produção comercial, tal como secagem por calor, a oxidação relacionada com a idade, exposição ao ultra-violeta (UV), ou esterilização por irradiação. Além disso, diferenças nas propriedades químicas podem resultar de métodos de extração em conjunto com a análise correspondente (DOMÍNGUEZ-VALHONDO et al., 2011; YANG et al., 2013).

O pólen fresco é recolhido com cerca de 20% de umidade, estando sujeito a deterioração microbiana, sendo necessário manter congelado ou desidrata-lo. Mesmo com instrumentos simples é possível atingir valores de umidade determinados pela legislação brasileira, porém se sabe que a forma de processamento pode ser um determinante na composição de nutrientes pois a exposição do pólen a altas temperaturas pode influenciar na composição final de vitaminas, estas são altamente instáveis (ALMEIDA- MURADIAN et al., 2005; MELO; ALMEIDA-MURADIAN, 2010).

A qualidade do pólen de abelha é altamente dependente dos métodos aplicados para sua conservação. Desta forma, se faz necessário estudo de métodos que preservem a estabilidade físico-química do pólen armazenado e aumente o tempo de prateleira deste produto. Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas do pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia* submetidos a métodos de conservação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Coleta**

Foi coletado pólen armazenado (samburá) da abelha mandacaia (*Melipona mandacaia*) em 50 colônias de apenas um meliponário do município de Uibaí (11° 20' 13" S 42° 07' 58" O), pertencente a microrregião de Irecê, no semiárido do estado da Bahia, na região Nordeste do Brasil. A coleta foi realizada em março de 2014, período de maior florada na região. Foram coletados aproximadamente seis quilos de samburá diretamente nos potes por meio de espátulas esterilizadas. Armazenado em recipientes, previamente esterilizados e transportado em caixa térmica com gelo até o laboratório.

### **2. Local**

O experimento foi desenvolvido no Núcleo de Estudos dos Insetos INSECTA do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas - BA.

### **3. Métodos de conservação**



O samburá foi homogeneizado para formação de uma única amostra homogênea e submetida as análises físico-químicas: acidez livre e pH, açúcar, redutores, atividade antioxidante, atividade de água, carboidratos, cinzas, fenóis totais, flavonoides totais, lipídios, proteínas, umidade e valor energético estas foram feitas antes de serem submetidas aos métodos de conservação. O pólen foi dividido em quatro partes que foram submetidas a quatro métodos de conservação: refrigeração, pasteurização, secagem e desumidificação.

### **3.1. Refrigeração**

O samburá foi dividido em sub amostras de 50 g cada e foram colocadas em 21 potes de vidro de 150 g que foram hermeticamente lacrados e mantidos protegido da luz. Estes foram mantidos sob refrigeração por 180 dias, utilizado a temperatura 0°C a 5°C um pouco acima do ponto de congelamento.

### **3.2. Pasteurização**

As amostras de 50 g de samburá de *M. mandacaiá* foram acondicionadas em 21 potes de vidro de 150 g e submetidas ao processo de pasteurização lenta, realizado em conformidade com Witter et al. (2005) utilizando uma temperatura de 65°C por 30 minutos em banho-maria. Estes foram hermeticamente lacrados, protegidos da luz e mantidos em temperatura ambiente, em prateleiras no laboratório por 180 dias.

### **3.3. Secagem**

O samburá de *M. mandacaiá* foi espalhado em bandejas e submetido a secagem tradicional em estufa de circulação forçada de ar a 40°C, por aproximadamente 36 horas até atingir a umidade constante. Logo após o pólen (samburá) foi fracionado em amostras de 50 g e colocados em 21 potes de vidro de 150 g. Estes foram hermeticamente lacrados, protegidos da luz e mantidos em temperatura ambiente, em prateleiras no laboratório por 180 dias.

### **3.4. Desumidificação**

O samburá de *M. mandacaiá* foi espalhado em bandeja e submetido ao processo de desumidificação em Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.)

conforme Carvalho et al. (2009) com temperatura de  $35 \pm 2,3$  °C e umidade de 40%, por aproximadamente 36 horas. Logo após o pólen (samburá) foi fracionado em 21 amostras de 50 g que foi armazenados em potes de vidro de 150 g. Estes foram hermeticamente lacrados, protegidos da luz e mantidos em temperatura ambiente, em prateleiras no laboratório por 180 dias.

#### **4. Análises físico-químicas**

Os seguintes parâmetros foram avaliados: acidez livre e pH, açúcar, redutores, atividade antioxidante, atividade de água, carboidratos, cinzas, fenóis totais, flavonoides totais, lipídios, proteínas, umidade e valor energético. Foram seguidas as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). As análises físico-químicas seguiram os parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 2001), preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Todas as análises foram realizadas mensalmente e em triplicatas. O experimento obteve o seguinte delineamento experimental: 4 x 7 com 3 repetições, com quatro tratamentos, sete tempos de avaliações e três repetições. Sendo três potes por tratamento para cada mês

##### **4.1. Umidade (%)**

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico em estufa a 105°C, até peso constante, onde foi utilizado 2 g de pólen (AOAC, 1995).

##### **4.2. Determinação de Cinzas (%)**

O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico em mufla à 550°C, utilizando-se 2 g de amostra. Este método consiste na incineração da matéria orgânica presente até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

##### **4.3. pH e Acidez livre (meq.kg<sup>-1</sup>)**

O pH foi determinado segundo a metodologia adotada pelo Laboratório do Centro de Apicultura Tropical do Instituto de Zootecnia de Pindamonhangaba, SP (MORAES;TEIXEIRA, 1998).

A acidez foi determinada segundo a metodologia A.O.A.C (1995). O método é baseado em uma titulação simples, utilizando um pHmetro para acompanhar a medida do pH.

#### **4.4. Atividades de água (Aw)**

A determinação da atividade de água (Aw) foi efetuada com o auxílio do aparelho PawKit (Decagon), que utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho.

#### **4.5. Açúcares Redutores (%)**

Os açúcares redutores foram dosados utilizando a técnica do DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), conforme metodologia descrita por Miller (1959). Pesou-se 1 g do samburá e transferiu-se as amostras individualmente para balão volumétrico de 100 mL, aferindo com água destilada, homogeneizou-se e filtrou-se em papel de filtro qualitativo. Em tubos de ensaio, tomou-se uma alíquota de 0,5 mL da solução de pólen e adicionou-se 0,5 mL do reagente DNS Ácido 3,5-dinitrosalicílico, seguido de agitação vigorosa e aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos e imediato resfriamento em banho de gelo e adição de 5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Femto Modelo 700 plus no comprimento de onda 540 nm, sendo os resultados expressos em porcentagem de açúcares redutores.

#### **4.6. Determinação de Proteínas (%)**

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl, que determina o teor de nitrogênio, utilizando o fator de conversão 6,25 para multiplicar a porcentagem de nitrogênio total (AOAC, 1995; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2012).

#### **4.7. Análise de lipídeos ou Gorduras totais (%)**

As frações de lipídeos presentes nas amostras de pólen foram verificadas por meio do método gravimétrico, utilizando o aparelho extrator de Soxhlet, tendo como solvente o hexano (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

#### **4.8. Carboidratos (Glicídios) (%)**

O teor de carboidratos foi calculado de acordo com a seguinte equação (NOGUEIRA et al., 2012): % Carboidratos = 100 - (% cinzas + % proteínas + % lipídios).

#### **4.9. Valor energético (Kcal/100g)**

Foi calculado de acordo com a seguinte equação (ESTEVINHOS et al., 2012): Valor energético (Kcal) = 4 × (% proteína + % carboidratos) + 9 × (% lipídios).

#### **4.10. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante**

Preparo do Extrato Etanólico de Pólen apícola (EEP). Os extratos foram preparados a partir de 4 g de samburá, diluídas em 50 mL de etanol a 70% (v/v). Em seguida ocorre a etapa da extração em banho ultrassônico por 60 minutos. Após esse período foi realizada uma centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado com o auxílio de papel filtro quantitativo, diretamente em placa de Petri. A evaporação do álcool foi realizada, finalizando com a raspagem do extrato seco e o armazenamento sob- refrigeração, em tubos falcon protegido da luz (MAIA-ARAÚJO et al., 2011).

##### **4.10.1- Análise de compostos fenólicos**

O conteúdo total de compostos fenólicos, foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999), utilizando ácido gálico como padrão de referência. Dos extratos de pólen foi retirado uma alíquota de 0,5 mL e adicionada a 2,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em metanol 1:10 (v/v). Uma fração de 2,0 mL de carbonatos de sódio a 4% (v/v) foi adicionado no preparado e deixado em repouso por duas horas em temperatura ambiente. Após esse período foi realizada a leitura em espectrofotômetro Femto Modelo 700 plus a 765 nm. Uma curva analítica foi construída com ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg GAE/g de pólen (GAE: equivalente em ácido gálico).

##### **4.10.2- Análise de flavonoides totais**

Os teores totais de flavonoides foram determinados pelo método proposto por (FEÁS et al., 2012), com algumas modificações. Onde uma alíquota de 3,0 mL de extrato de pólen e adicionando 3,0 mL de cloreto de alumínio a 10% deixado em

repouso por 40 minutos e realizadas as leituras em espectrofotômetro, sendo os tubos em branco submetidos ao mesmo processo, exceto pela adição de cloreto de alumínio. Foi construída uma curva analítica de quercetina e os valores obtidos expressos em (mg QE/g de pólen).

#### **4.10.3- Atividade antioxidante (Método do DPPH)**

Na determinação da atividade antioxidante do pólen foi utilizado o método de avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) de acordo com a metodologia descrita por Ferreira et al. (2009). Foi preparada uma solução concentrada de pólen, pesando  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato seco de pólen para um frasco, diluiu-se em 1 mL de metanol. Foram preparadas várias concentrações a partir da solução concentrada 4; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 e 0,25  $\text{mg.mL}^{-1}$ , que foram aferidas com metanol em balões de 25 mL. Em tubos de ensaio colocara-se 0,3 mL de cada uma das concentrações e 2,7 mL de solução metanoica contendo radicais de DPPH ( $6 \times 10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$ ). A mistura foi agitada vigorosamente e colocada em repouso no escuro durante 60 minutos, ficando com uma cor amarelada. A redução do radical de DPPH foi determinada por medição da absorvância a 517 nm em espectrofotômetro (Femto Modelo 700 plus). A concentração do extrato que induziu uma inibição de 50% ( $E_{c50}$ ) foi calculada a partir do gráfico do efeito da percentagem de eliminação de radicais em função da concentração de extrato na solução.

### **5. Análise Estatística**

O ensaio foi analisado segundo um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x7 com 3 repetições) quatro tratamentos (métodos de conservação) e sete períodos de amostragem (inicial, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). As análises de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Quando observado diferença significativa foi realizado análise de regressão.

Foi realizada também as análises descritivas para as variáveis físico-químicas: valores mínimos, máximo, média, desvio padrão e coeficiente de variação. Os dados foram testados quanto a sua distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As médias foram comparadas entre si pelo teste de

Tukey a 5% de significância. A análise foi realizada com o auxílio do pacote estatístico ASSISTAT® 7.7 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os dados obtidos para a estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos do pólen de *M. mandacaiá*, *in natura* e submetidos a métodos de conservação e armazenamento estão descritos na (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva das variáveis físico-químicas do pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias e da amostra *in natura*.

Variáveis	Amostra <i>in natura</i>	Mínimo	Máximo	Média	D <sub>Pad</sub>	CV%	Teste F		
							Trat	Tempo	Trat X Tempo
<b>Acidez (meq.kg<sup>-1</sup>)</b>	146,56	121,00	148,50	134,64	6,19	1,66	**	**	**
<b>Açúcares redutores (%)</b>	6,06	5,30	15,10	10,20	2,89	8,51	**	ns	**
<b>Atividade de água</b>	0,86	0,28	0,88	0,66	0,21	1,93	**	**	**
<b>Carboidrato (%)</b>	69,92	54,45	74,81	65,78	5,23	3,20	**	**	**
<b>Cinza (%)</b>	4,66	4,12	6,73	5,48	0,77	4,05	**	**	**
<b>Ativ. Antiox. (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	1,39	0,65	1,56	1,30	0,16	9,56	**	**	ns
<b>Fenóis (mg GAE.g<sup>-1</sup>)</b>	39,91	27,35	64,85	37,14	5,53	13,70	ns	*	ns
<b>Flavonoide (mg QE.g<sup>-1</sup>)</b>	0,89	0,65	1,20	0,86	0,12	11,85	ns	ns	**
<b>Lipídios (%)</b>	1,83	1,23	5,42	3,22	0,81	15,63	**	*	**
<b>pH</b>	3,47	3,42	3,71	3,55	0,064	0,35	**	**	**
<b>Proteína (%)</b>	23,56	17,19	35,46	25,93	4,34	7,46	**	**	**
<b>Umidade (%)</b>	34,89	7,99	36,63	22,36	11,12	2,73	**	**	**
<b>Valor energético (kcal/100g)</b>	390,50	386,58	413,26	395,92	3,96	0,0076	**	**	**

D<sub>Pad</sub> - Desvio Padrão; CV – Coeficiente de variação; Trat. Tratamento; \* - significativo; \*\* - Altamente significativo ns – não significativo pelo teste (Shapiro-Wilk). Ativ. Antiox= Atividade antioxidante

## Acidez e pH

Os ácidos orgânicos presentes em alimentos influenciam o sabor, o odor, a cor, a estabilidade e a manutenção de qualidade.

A acidez das amostras avaliadas apresentou tendência decrescente durante o armazenamento em todos os tratamentos aplicados no pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia*. O oposto foi observado para pH que apresentou um comportamento crescente, pois a medida que diminui o teor de ácido, conseqüentemente diminui o teor de H<sup>+</sup> aumentando assim o pH. Os tratamentos refrigeração (P1) e pasteurização (P2) não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ) assim como os tratamentos secagem (P3) e desumidificação (P4), para os parâmetros acidez e pH foram encontrado valores entre 121 a 148.5 meq.kg<sup>-1</sup> e 3,42 a 3,71 (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios de pH e acidez para o pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Acidez (meq.kg <sup>-1</sup> )	0	146,55 aA	144,77 aA	133,83 bAB	133,72 bAB
	30	142,55 aAB	143,66 aA	132,77 bAB	136,27 bA
	60	135,77 aCD	135,44 aBC	126,66 bCD	127,83 CD
	90	132,55 aDE	135,22 aBC	122,50 bD	122,27 bD
	120	129,77 bE	134,66 aC	132,83 abA	129,94bBC
	150	138,44 aBC	140,50 aAB	137,05 abA	133,55bAB
	180	137,33aBC	137,33 aBC	129,22 bBC	136,88 aA
pH	0	3,47aD	3,48 aD	3,48 aE	3,48 aE
	30	3,43 bE	3,43 bE	3,52 aD	3,53 aD
	60	3,57 bB	3,51 cCD	3,61 aB	3,62 aB
	90	3,52 bC	3,54 bBC	3,57 aC	3,57 aC
	120	3,60 aAB	3,57 bB	3,54 bcCD	3,54 cD
	150	3,53 bC	3,55 bB	3,60 aB	3,61 aB
	180	3,60 cA	3,64 bA	3,68 aA	3,66 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Bárbara et al. (2015) analisando pólen armazenado (samburá) *in natura* de *M. mandacaia* encontraram valores de acidez médio de 146,00 meq.kg<sup>-1</sup> e valor médio de pH de 3,49 corroborando com os valores encontrado neste estudo.

Em pesquisa realizada com pólen apícola desidratado Pinto et al. (2012) relataram acidez média de 98,20 meq.kg<sup>-1</sup> e pH médio de 5,00 e para pólen apícola



fresco e acidez média de  $97,50 \text{ meq.kg}^{-1}$  e pH de 4,50 para pólen apícola desidratado. A legislação brasileira para pólen apícola estabelece valor de acidez livre ( $300 \text{ meq.kg}^{-1}$ ) e valor de pH entre (4,00-6,00). Os valores de pH encontrados neste trabalho estão abaixo do estabelecido.

A composição do pão de abelha ou pólen armazenado difere ligeiramente do pólen apícola, ele tem maior acidez, devido à presença de ácido láctico. A elevada quantidade de ácido láctico no “pão de abelha”, reflete-se num grau de acidez mais acentuado e conseqüentemente num valor de pH mais baixo, esta acidez do “pão de abelha” é responsável pela sua autoconservação pois inibe o crescimento dos bolores e outros microrganismos (NAGAI et al., 2005).

As reduções no pH durante a conversão do pólen coletados pelas abelhas em pólen apícola ou pólen armazenado têm sido atribuídas à atividade das bactérias produtoras de ácido láctico que são adicionados ao pólen a partir do estômago e do mel das abelhas (VASQUEZ; OLOFSSON, 2009). Então isso explica o baixo pH.

A acidez pode ser aplicada para indicação de deterioração por bactérias com produção de ácido, para indicação de deterioração de óleos e gorduras pela presença de ácidos graxos livres provenientes da hidrólise dos triacilgliceróis, estabilidade do alimento, onde produtos mais ácidos são naturalmente mais estáveis quanto à deterioração (CECCHI, 2003).

### **Açúcares redutores**

Em relação à composição química do pólen apícola são os açúcares os principais nutrientes. Os monossacarídeos, glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupo de carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (SILVA et al., 2003).

Não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para açúcares redutores em nenhum das amostras submetidas aos tratamentos durante o armazenamento do pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaiá*. Os tratamentos P1 e P2 não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ) O tratamento P4 foi o que apresentou maior teor de açúcares redutores (Tabela 3), com valores entre 5,30 e 15,10% (tabela 1).

Tabela 3. Valores médios de açúcares redutores para o pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Açúcares redutores (%)	0	6,06 cB	8,74 bA	12,40 aAB	13,51 aA
	30	7,46 cAB	7,25 cAB	11,42 bB	13,72 aA
	60	7,08 bAB	7,04 bAB	13,63 aA	13,00 aA
	90	7,12 bAB	6,19 bB	12,36 aAB	12,61 aA
	120	8,31 cA	7,89 cAB	12,19 bAB	14,10 aA
	150	8,65 bA	8,14 bAB	12,40 aAB	13,04 aA
	180	8,31 cA	7,21 cAB	11,89 bAB	13,93 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Os resultados encontrados neste estudo estão abaixo de resultados apresentados por Nogueira et al. (2012) com níveis variando entre 26,09 a 41,79%, Martins et al. (2011) em amostras de pólen apícola de diferentes regiões do Brasil, com níveis de glicose e frutose variando de 6,99-21,85% e 12,59-23,62%, respectivamente. De-Melo et al. (2016) analisando pólen apícola desidratado, encontrou níveis de glicose e frutose variando entre 12 a 24%, e 7 a 22% valores superiores aos encontrados neste trabalho e Carpes et al. (2009) com variação de 38,2 a 56,6%. Um elevado teor de açúcares redutores do pólen apícola tem sido associada com a presença de néctar / mel, comumente utilizado pelas abelhas para formação dos *pellets*.

Conforme relatado por Martins et al. (2011) há predominância de açúcares redutores no pólen de abelha, onde os níveis de frutose superam os de glicose.

A frutose é encontrada principalmente nas frutas e no mel. É o mais doce dos açúcares simples. Fornece energia de forma gradativa, por ser absorvida lentamente, o que evita que a concentração de açúcar no sangue (glicemia) aumente muito depressa. A glicose é resultado da "quebra" de carboidratos mais complexos, polissacarídeos, encontrados nos cereais, frutas e hortaliças. É rapidamente absorvida, sendo utilizada como fonte de energia imediata ou

armazenada no fígado e no músculo na forma de glicogênio muscular (PINHEIRO et al., 2005).

A baixa quantidade de açúcares redutores encontrados para o pólen de de *Melipona*, pode está relacionado ao consumo destes açúcares por microrganismos fermentadores envolvidos no processo de formação do pólen armazenado.

### Atividade de água (aW)

Não houve diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras submetidas aso tratamentos P1 e P2 nem em seus respectivos armazenamentos. As amostras submetidas ao tratamento P4 foi o que apresento menor atividade de água, que assim como o P3 houve variação durante o armazenamento (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios de atividade de água para o pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (Dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Atividade de água	0	0,86 aA	0,85 aA	0,49 bC	0,29 cC
	30	0,87 aA	0,86 aA	0,50 bBC	0,33 cB
	60	0,85 aA	0,85 aA	0,53 bB	0,35 cB
	90	0,86 aA	0,85 aA	0,49 bC	0,29 cC
	120	0,87aA	0,86 aA	0,59 bA	0,50 cA
	150	0,86 aA	0,87 aA	0,58 bA	0,29 cC
	180	0,86 aA	0,85 aA	0,49 bC	0,33 cB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

As amostras submetidas aos tratamentos P3 e P4 apresentaram baixos valores de AW, que é característica de alimentos desidratados, permitindo a estabilidade no armazenamento.

Em estudo com pólen apícola desidratado Carpes et al. (2009), encontraram atividade de água média de 0,38unidade, semelhantes ao valor encontrado para o tratamento P4. Estevinho et al. (2012) e Nogueira et al. (2012) encontraram

atividade de água semelhantes em pólen apícola desidratado de Portugal com valores entre (0,32 a 0,55) e (0,26 a 0,43) respectivamente. Ferreira (2013) em pesquisa com pólen armazenado (samburá) fresco de *Melipona quadrifasciata anthidioides* verificou atividade de água entre 0,86 a 0,92.

O pólen é um alimento bastante higroscópico se exposto a ambientes de alta umidade relativa. Sendo assim a secagem deve ser rápida e tão completa quanto possível. A importância do estudo da quantidade de água em alimentos reside no fato de que por meio desta podem ser previstos reações químicas e enzimáticas indesejáveis e o desenvolvimento de microrganismos que, por sua vez, pode alterar as características organolépticas do produto (MORGANO et al., 2011; SOUSA et al., 2013).

### **Carboidratos**

O grupo dos carboidratos, que inclui açúcares, amido e fibra dietética, representa o componente principal das amostras de pólen de abelha. Os carboidratos representam a principal fração do pólen de abelha, correspondendo a 2/3 dos constituintes totais (CARPES et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2012).

As amostras submetidas aos tratamentos P1 e P2 não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ) e mostraram estabilidade durante os 180 dias de armazenamento. As amostras submetidas aos tratamentos P3 e P4 apresentaram diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os meses de armazenamento, com teores de carboidratos menores que os tratamentos P1 e P2 (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios de carboidrato para o pólen armazenado por *Melipona mandacaiá* submetido a métodos de conservação e vida de prateleira por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO	TRATAMENTOS
----------	-------	-------------

	(dias)	P1	P2	P3	P4
<b>Carboidratos</b> (%)	<b>0</b>	69,92 aA	69,15 aA	59,80 bBC	60,28 bB
	<b>30</b>	68,34 aA	69,80 aA	60,98 bABC	69,00 aA
	<b>60</b>	68,66 aA	69,31 aA	60,81 bABC	60,15 bB
	<b>90</b>	68,06 aA	71,63 aA	56,10 bC	60,66 bB
	<b>120</b>	70,54 aA	70,69 aA	63,90 bAB	60,22 bB
	<b>150</b>	70,47 aA	74,37 aA	65,63 bA	63,20 bB
	<b>180</b>	70,10 aA	70,42 aA	60,16 bBC	59,41 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Valores de carboidratos semelhantes foram encontrados por Yang et al. (2013) com variação entre 59,43 a 75,65% em pólen apícola desidratado, Souza et al. (2004) analisando pólen *in natura* de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, com valores entre 64,8 e 75,5%, e Modro et al. (2007) com média de 66,30 analisando pólen apícola desidratado.

### Cinzas

As cinzas em alimentos referem ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica. É importante observar que a composição das cinzas corresponde à quantidade de substâncias minerais presentes nos alimentos, devido às perdas por volatilização ou mesmo pela reação entre os componentes. Os teores de cinzas encontrados para o pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaiá* estão apresentados na (Tabela 6).

Foi observado teores maiores de cinzas nas amostras dos tratamentos P3 e P4 que não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ), os tratamentos P1 e P2 apresentaram menor conteúdo em cinzas.

Tabela 6. Valores médios de cinzas para o pólen armazenado por *Melipona mandacaiá* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO	TRATAMENTOS			
----------	-------	-------------	--	--	--

	(Dias)	P1	P2	P3	P4
<b>Cinzas (%)</b>	0	4,66 bA	4,74 bAB	6,31 aA	6,56 aAB
	30	4,94 bA	4,90 bAB	6,28 aA	6,11 aAB
	60	4,77 bA	5,19 abA	5,24 abB	5,57 aC
	90	4,75 bA	4,75 bAB	6,35 aA	6,64 aA
	120	4,77 bA	4,61 bB	6,02 aA	6,06 aBC
	150	4,71 bA	4,72 bAB	6,17 aA	6,51 aAB
	180	4,68 bA	4,81 bAB	6,37 aA	6,28 aAB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Todas as amostras em seus respectivos tratamentos não estão conformidade com o estabelecido no Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001) e o Código Alimentario Argentino (1998) ambos estabelecem máximo de 4,00% para teores de cinzas. Indicando a necessidade da criação de uma legislação própria para o pólen de abelhas sem ferrão

Valores menores a estes foram observados em pesquisa realizada com pólen apícola no Brasil, Melo et al. (2009) encontraram valores entre 1,50 a 3,60%, Barreto et al. (2012) 1,90 a 2,40% e Carpes et al. (2008) em amostras do Sul do Brasil, com valores oscilando entre 1,90 a 3,91%. Yang et al. (2013) em pólen apícola do China encontraram valores mais elevados que estiveram entre 1,70 a 5,01%.

Campos et al. (2008) tomando como base diversas pesquisas publicadas com este produto, estabeleceram limites de 2,00 a 6,00% para teor de cinzas em pólen apícola. O teor de cinzas é influenciado pelo tipo de solo, origem geográfica, espécies da flora e da capacidade da planta a acumular minerais (SERRA-BONVEHI; ESCOLÀ-JORDÀ, 2001).

O elevado teor de cinzas observado para o pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaiá*, neste estudo é um indicativo que o produto possui uma quantidade de minerais maior quando comparado ao pólen apícola.

## Lipídios

O Regulamento Técnico Brasileiro para pólen apícola (BRASIL, 2001) estabelece valor mínimo de 1,8% para o pólen apícola desidratado. Não houve diferença entre os tempos para as amostras do samburá para os tratamentos empregados, os teores de lipídios se mantiveram estáveis durante os 180 dias de armazenamento. As amostras submetidas aos tratamentos P1 e P2 não diferem entre si ( $p \leq 0,05$ ) assim como as amostras submetidas aos tratamentos P3 e P4 também não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ). Os teores médios de lipídios apresentaram valores entre 1,83 e 4,65% sendo os valores mais baixos observados para as amostras submetidas aos tratamentos P1 e P2 tratamentos que não passaram por desidratação (Tabela 7). Atendendo, portanto a determinação imposta pelo Regulamento Técnico Brasileiro.

Tabela 7. Valores médios de lipídios para o pólen armazenado por *Melipona mandacaiá* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
	0	1,83 bC	2,37 bA	3,83 aA	3,48 aAB
	30	2,99 aBC	2,98 aA	3,67 aA	3,73 aAB
	60	4,42 aA	2,36 bA	3,06 bA	3,32 bB
<b>Lipídios</b>	<b>90</b>	2,74 bBC	2,33 bA	3,98 aA	4,55 aAB
<b>(%)</b>	<b>120</b>	3,15 bB	2,30 bA	3,04 bA	4,65 aA
	<b>150</b>	2,94 aBC	3,03 aA	3,68 aA	3,34 aB
	<b>180</b>	2,39 bB	2,79 abA	3,84 aA	3,44 abAB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si. Pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Valores semelhantes aos encontrados neste estudo foram relatados por diversos autores como, Pinto et al. (2012) que obtiveram média de 4,40% para pólen apícola desidratado e 2,8% para *in natura*, Kostic et al., (2015) analisando pólen apícola desidratado da Sérvia com valores entre 1,32 e 6,78%, Nogueira et al. (2012) em pólen português desidratado encontraram valores entre 2,35 e 3,33%,

Valores semelhantes foram encontrados por Pinheiro et al. (2007) em pólen armazenado de abelhas sem ferrão que apresentaram variação entre 2,26 e 3,65%.

Os lipídios são, em parte, responsáveis pelas propriedades físico-químicas dos alimentos, e aqueles que são de importante interesse nutricional são os ésteres de ácidos graxos (ESTEVINHO et al., 2012). Bárbara et al. (2015) estudando pólen armazenado de *M. mandacaia* relataram a presença de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, sendo os poli-insaturados encontrados em maior quantidade.

### Proteína

O pólen apícola é uma importante fonte de proteína, podendo ser usado para a nutrição das abelhas e também na complementação alimentar na nutrição humana. Sendo um dos componentes mais abundantes do pólen das abelhas. No entanto, devido à sua elevada quantidade de proteínas, quando não armazenado corretamente, rapidamente pode perder o valor nutricional, passando por reações de Maillard (NOGUEIRA et al., 2012)

O teor de proteína foi altamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) houve diferença entre as amostras submetidas aos tratamentos P1 e P2 os quais, não passaram por processos de desidratação, em relação ao P3 e P4 que foram desidratados, estes apresentaram teores de proteína mais elevados (Tabela 8). Com um teor de proteína médio de 25,40%.

Tabela 8. Valores médios de proteína para o pólen armazenado por *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Proteína	0	23,56 bA	23,72 bA	30,04 aA	29,66 aAB
(%)	30	23,71 bA	22,31 bAB	29,05 aAB	28,13 aC



<b>60</b>	22,13 bA	24,47 bA	30,87 aA	30,92 aAB
<b>90</b>	24,43 bcA	21,26 cAB	33,56 aA	28,18 aAB
<b>120</b>	23,91 bA	24,63 bA	30,04 aA	32,05 aA
<b>150</b>	21,87 bcA	17,86 cB	24,49 abB	26,94 aB
<b>180</b>	22,81 bA	21,96 bAB	29,60 aA	30,84 aAB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si. Pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Os valores atendem a resolução do Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001) que estabelece um mínimo de 8,00%. Não foi observado grandes perdas de proteínas em nenhum dos métodos de conservação empregados no pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia*, nem durante o tempo de armazenamento, os valores se mantiveram praticamente estáveis, apresentando pequenas oscilações mensais.

Em estudos realizados por Pinto et al. (2012) o pólen apícola *in natura* apresentou teor de proteína médio de 13,00%. O mesmo foi observado por Barreto et al. (2012) onde o pólen apícola *in natura* conteve média de 13,10% e o desidratado 15,00%. Isso é atribuído ao elevado conteúdo de água do pólen *in natura* que promove a diluição do nutriente. Souza et al. (2004) analisando pólen armazenado *in natura* de várias espécies de abelhas sem ferrão do Amazonas detectou valor médio de proteína de 19,50%.

Em estudo realizado com pólen apícola desidratado em outros países foram encontrados valores de proteína parecidos aos constados neste estudo, como na Servia, Kostic et al. (2015) relataram variação entre 14,81 e 27,25%, na China valores entre 14,86 e 28,96% por Yang et al. (2013) e em Portugal 12,50 e 25,15% por Nogueira et al. (2012).

De acordo com Pinto et al. (2012) essa concentração de proteínas no pólen apícola pode variar tanto de uma região para outra como em uma mesma região ao longo do tempo e disponibilidade floral. Além disso, também foram relatadas diferenças dentro das mesmas espécies de plantas que crescem sob diferentes condições ambientais (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

Em estudos realizados com pólen apícola armazenado ou pão de abelhas as concentrações de proteínas foram mais elevadas que no pólen apícola, porém

as concentrações de aminoácidos foram menores no pólen armazenado, sugerindo o consumo de aminoácidos livres por algumas bactérias ou a conversão destes em proteínas (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2013).

Fato que foi observado neste estudo onde se observou um teor de proteína maior que os observados por alguns autores para o pólen apícola.

### Umidade

O teor de água do pólen é um importante parâmetro de qualidade ou indicador, uma vez que influencia diretamente várias características básicas do produto, além de afetar diretamente a qualidade do produto como sabor e aroma (MORGANO et al., 2011).

As amostras submetidas aos tratamentos P1 e P2 não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ), apresentaram teores de umidade entre 31,15 e 35,38%, ambos tiveram comportamento semelhante ao longo do armazenamento. Os tratamentos P3 e P4 diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 9). O tratamento P4 apresentou menor teor de umidade que os demais métodos de conservação.

Houve interação altamente significativa e ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos e o tempo de armazenamento do pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaiá* (Tabela 1).

Tabela 9. Valores médios de umidade para o pólen armazenado por *Melipona mandacaiá* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (Dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Umidade (%)	0	34,89 aA	33,47 bB	11,28 cB	8,13 dD
	30	32,93 aBC	32,06 aBC	12,22 bAB	11,17 bAB
	60	34,13 aAB	35,38 aA	12,72 bAB	10,37 cBC

<b>90</b>	31,74 aC	31,86 aC	12,06 bAB	10,62 cBC
<b>120</b>	33,57 aAB	32,88 aBC	12,75 bAB	12,49 bA
<b>150</b>	34,15 aAB	33,11 aBC	12,84 bA	10,87 cBC
<b>180</b>	33,95 aAB	32,56 bBC	12,22 cAB	9,51 dCD

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si. Pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Ao analisar pólen apícola *in natura* Marchini et al. (2006) encontraram valores entre 16,80 e 33,20% de umidade. Souza et al. (2004) em amostras de pólen armazenado de abelhas sem ferrão apresentaram umidade média de 36,90%, valores mais elevados do que os encontrados neste estudo para os tratamentos P1 e P2. Analisando a umidade em pólen apícola desidratado na China, Yang et al. (2013) encontraram valores de 1,82 a 7,33%. Morgano et al. (2011) analisaram amostras de pólen desidratado de regiões produtoras do Brasil, constatando que a maioria das amostras estavam com o teor de água elevado encontrando-se fora da Legislação Brasileira, a qual permite a comercialização de pólen apícola desidratado com um teor máximo de umidade de 4,00% e *in natura* com o máximo de 30% (BRASIL, 2001). O elevado teor de água nas amostras submetidas aos tratamentos P3 e P4 pode estar relacionado com a umidade inicial do pólen de abelha sem ferrão, a qual se encontrava em torno de 34% o que dificulta o processo de desidratação, e devido à alta higroscopicidade do pólen de abelha que consegue rapidamente absorver água de ambientes saturados.

### Valor Energético

A quantidade de energia existente no alimento disponível na digestão é quantificada por meio do Valor Energético Total expresso em KiloCalorias (kcal). O conteúdo energético médio encontrado foi de 395,92 Kcal / 100 g (Tabela 1) para o pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaiá* submetidos aos métodos de conservação e avaliação ao longo dos 180 dias de armazenamento. Os tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quanto ao valor energético do pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaiá* também foi observado variação no armazenamento dentro dos tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10. Valores médios de calorias para o pólen armazenado por *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Calorias (Kcal/100g)	0	390,50 aA	395,19 aB	392,66 aD	390,66 aA
	30	392,91 aA	396,45 aAB	394,71 aD	396,30 aA
	60	391,17 bA	394,34 bB	410,99 aA	393,72 bA
	90	393,94 bA	394,29 bB	403,15 aBC	392,08 bA
	120	394,22 bA	403,01 aA	402,55 aBC	393,73 bA
	150	393,20 bA	396,18 bAB	406,23 aAB	394,71 bA
	180	395,31 aA	394,49 aB	395,86 aCD	393,21 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si. Pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Valores energéticos semelhantes foram constados por Yang et al. (2013) que encontraram valores entre 380,00 a 486,00 kcal / 100 g em pólen apícola da China, que se assemelham aos encontrados por Feas et al. (2012) 396,40 a 411,10 kcal / 100 g em pólen apícola de Portugal.

Orzáez-Villanueva et al. (2002) compararam o percentual calórico fornecido por proteínas, lipídeos e carboidratos em 15 amostras de pólen apícola espanhol com as recomendações dietéticas estabelecidas (10-12% do total de calorias deve ser proveniente de proteínas, 30% de gorduras e 60% de carboidratos). Além de fatores como clima, geografia, práticas apícolas e a composição genética das espécies de plantas Feas et al. (2012).

O pólen contém um teor médio de 5% de gorduras, sendo parte lipídios hidrocarbonetos ou ceras, os quais dificilmente são digeridos e absorvidos pelo organismo e, portanto, contribuem com poucas calorias (HERVATIM, 2009).

Os altos valores de calorias encontrados para este estudo estão associados aos altos tores de carboidratos no pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia*.

### Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

### Fenóis totais

Os principais componentes biológicos de pólen de abelha são os derivados de ácidos fenólicos e compostos polifenólicos, na sua maioria glicosídeos flavonoides (CAMPOS et al., 2010). O conteúdo de fenóis totais no pólen armazenado samburá não apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos empregados em sua conservação (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios de fenóis totais para o pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação.

VARIÁVEL	TRATAMENTOS			
	P1	P2	P3	P4
<b>Fenóis totais</b> (mg GAE.g <sup>-1</sup> )	39,11 a	36,97 a	36,18 a	36,29 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si. Pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Foram observadas diferenças significativas nos valores de fenóis nas amostras submetidas ao armazenamento. Os valores encontrados para os fenóis totais neste estudo estiveram entre 27,84 a 64,84 (mg GAE/g de pólen). Segundo LeBlanc et al. (2009) o pólen coletado no semiárido pode apresentar valores de compostos fenólicos mais elevados do que pólen nas regiões mais chuvosas. Corroborando com esta observação Carpes et al. (2008) avaliando amostras de pólen apícola do Sul do Brasil relataram que o teor dos compostos fenólicos das amostras de pólen variou de 19,28 a 48,90 (mg GAE/g de pólen). Valores bem mais elevados foram relatados por Freire et al. (2012) avaliando amostras de pólen da Bahia região menos chuvosa, onde os valores oscilaram entre 41,50 a 213,20 (mg GAE/g de pólen), Pascoal et al. (2014) observaram valores bem menores, entre 18,55 a 32,15 (mg GAE/g pólen) em pólen apícola de Portugal.

Não só a origem geográfica pode ter influenciado na composição de fenóis totais do pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia* neste trabalho, mas também a diversidade de espécie de flora presente na região semiárida, bem como a especificidade de cada abelha em trabalhar seu alimento.

### Flavonoides totais

Os flavonoides encontram-se em grande quantidade no pólen apícola. A sua estrutura básica é constituída por um núcleo fundamental, contendo quinze átomos de carbono (C15). Este grupo de compostos apresenta dois anéis fenólicos substituídos e um heterocíclico oxigenado, formando um sistema C6-C3-C6 (ARAÚJO et al., 2005; DORNAS et al., 2007).

Não foi observada diferença significativa entre as amostras submetidas aos tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) empregados na conservação do pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaia*. Nas amostras que passaram pelo processo de armazenamento não foi detectado variação do teor de flavonoides (Tabela 12), foram encontrados valores entre 0,65 a 1,19 (mg QE.g<sup>-1</sup>).

Tabela 12. Valores médios de flavonoide para o pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação e armazenamento por 180 dias.

VARIÁVEL	TEMPO (dias)	TRATAMENTOS			
		P1	P2	P3	P4
Flavonoide (mg QE/g)	0	0,89 abA	0,76 bA	0,80 bA	1,10 aA
	30	0,79 abA	0,74 bA	1,00 aA	0,75 bC
	60	0,79 bA	0,99 abA	0,86 abA	1,02 aAB
	90	0,87 aA	0,76 aA	0,90 aA	0,87 aABC
	120	0,85 aA	0,81 aA	0,81 aA	0,92 aABC

<b>150</b>	0,84 aA	0,84 aA	0,88 aA	0,75 aC
<b>180</b>	0,81 aA	0,98 aA	0,98 aA	0,82 aBC

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si. Pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação.

Valores superiores foram observados por Menezes et al. (2010) avaliando pólen apícola da Bahia, com valores que variaram de 0,72 a 1,99 (mg CAE.g<sup>-1</sup>), valores mais elevados foram apresentados por Feas et al. (2012) com variação entre 4,50 a 7,10 (mg CAE.g<sup>-1</sup> pólen) e por Pascoal et al. (2014) com valores variando entre 3,92 a 10,14 (mg CAE.g<sup>-1</sup> pólen) analisando pólen apícola de Portugal.

Enquanto que, Serra-Bonvehí et al. (2001) no pólen apícola espanhol observaram a presença de rutina, quercetina, miricetina, campferol e isoramnetina, sendo estes também identificados em pólen da Índia por Lv et al. (2015). Entre os vários flavonoides associados ao pólen apícola, à quercetina tem sido atribuída atividade anti-inflamatória, enquanto que, o campferol e os seus derivados estão associados à redução da hiperplasia prostática e a miricetina ao combate das alergias (VIT, 2009).

O grupo constituído por compostos fenólicos que corresponde a 1,60%, em média. Este grupo inclui flavonóides, leucotrienos, catequinas e ácidos fenólicos. Entre os flavonóides de ocorrência no pólen 1,40%, existenres são principalmente campferol, quercetina, e isorhamnetina (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015).

Segundo Carpes et al. (2013) os padrões de flavonoides podem ser utilizados como marcadores bioquímicos da origem botânica do pólen, devido a exclusividade de alguns compostos a uma determinada espécie.

### **Atividade antioxidante**

Foi observado diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras submetidas aos tratamentos empregados para conservação do pólen. Os tratamentos P2 e P3 apresentaram maior valor de Ec50 (quantidade do extrato necessária para sequestrar 50% dos radicais livre) indicando menor atividade antioxidante, as amostras submetidas aos tratamentos P1 e P4 apresentaram menor valor de Ec50 e conseqüentemente, a maior capacidade antioxidante em

termos de radical livre (Tabela 13). Neste trabalho foram encontrados valores de  $Ec_{50}$  entre 0,64 e 1,56  $mg.mL^{-1}$ .

Tabela 13. Valores médios de atividade antioxidante para o pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia* submetido a métodos de conservação

VARIÁVEL	TRATAMENTOS			
	P1	P2	P3	P4
Ativ. antiox. ( $mg.mL^{-1}$ )	1,266 b	1,380 a	1,341 ab	1,246 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. P1=refrigeração; P2=pasteurização; P3=secagem; P4=desumidificação. Ativ. antiox.= atividade antioxidante

Em pólen apícola desidratado da Argentina Aloisi e Ruppel (2014) encontraram valor médio de 2,49  $mg.mL^{-1}$ . Em pólen apícola brasileiro Carpes et al. (2009) relataram atividade antioxidante com valores de  $Ec_{50}$  entre 0,81 a 4,69  $mg.mL^{-1}$ .

Avaliando a atividade sequestradoras de radicais livres de extrato de pólen armazenado de *Melipona rufiventris* em diferentes solventes Silva et al. (2009) relataram que o extrato AcOEt (acetato de etila) foram isolados os compostos: ácido p-hidroxicinâmico, dihidroquercetina, isoramnetina, 3-O- (6"-O-E-p-coumaroil)- $\beta$ -D-glicopiranosidatina, luteolina e quercetina que apresentou potente atividade sequestradora de radicais livres em DPPH em relação ao extrato EtOH (Hexano).

A atividade antioxidante do pólen é em grande parte resultado dos compostos fenólicos e flavonoides que têm atividade sequestradoras dos radicais livres, embora outros constituintes, tais como, as proteínas e as vitaminas podem também contribuir para esta propriedade (CAMPOS et al., 2003). De acordo com Almaraz-Abarca et al. (2004) a composição de flavonoide e ácido fenólico e não concentração, pode ser um fator determinante a combinação de flavonoides glicosídicos e ácidos fenólicos que definem o nível de capacidade antioxidante do pólen de diferente origem.

Segundo Carpes et al. (2009) cada tipo de pólen tem suas próprias características específicas relacionadas com a genética das espécies florais e plantações visitadas pelas abelhas e podem influenciar as propriedades biológicas.



## CONCLUSÕES

Os métodos de conservação (refrigeração, pasteurização, secagem e desumidificação) empregados para conservação do pólen armazenado (samburá) por *Melipona mandacaia*, mantem as características físico-química do pólen, durante os 180 dias de armazenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUDA, Z. et al. The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 376, 2011.

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

ALMEIDA-MURADIAN L.B.; ARRUDA, V.A.S.; BARRETO, L.M.R.C. Manual de Controle de Qualidade do pólen apícola. **Apacame**, p. 28, 2012.

ALOISI, P.V; RUPPEL, S. Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia del Chubut, Argentina. **Revista de investigação agropecuária**, v. 40, n. 3, dic. 2014.

ALMARAZ-ABARCA, N. et al. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. **INTERCIENCIA**, v. 29, p. 574-578, 2004.

ARAÚJO, P.W.B. et al. Flavonoides e hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.12, n. 3, p.188-189, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Association of Official Agricultural Chemistry. 1995, 960p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=12479&word>. Acesso em: 27 de junho de 2015.

BARRETO, L. M. R. C et al. Qualidade físico-química do pólen apícola produzido no Vale do Paraíba-SP. **Revista Biociências**, v. 18, 2012.

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

CARPES, S.T. et al. Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 7, n. 3, p. 667-673, 2009.

CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.

CARVALHO, C. A. et al. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 1, p. 143-149, 2009.

CAMPOS, M. G. et al. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollen and the contribution of constituent flavonoids. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 51, p.742-745, 2003.

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

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

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2ª ed. rev. São Paulo: Editora da Unicamp, 2003.

**CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO DE PÓLEN.** Artículo 785 - Resolucion 1550 de 12 de dezembro de 1990. Capitulo X, página 15. Disponível em:[http://www.anmat.gov.ar/codigoo/CAPITULO\\_X\\_Azucarados\\_atualiz\\_06-3.pdf](http://www.anmat.gov.ar/codigoo/CAPITULO_X_Azucarados_atualiz_06-3.pdf). Acesso em 20 de julho 2015.

CORONEL, B.B. et al. Caracterización bromatológica del pólen apícola Argentino. **Ciencia docencia y tecnología**, v. 15, p. 141-181, 2004.

DEGRANDI-HOFFMAN, A. et al. comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. **Apidologie**, v. 44, n. 1, p. 52-63, 2013.

DOMÍNGUEZ V. D. et al. Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee - collected pollen. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 2204-2211, 2011.

DORNAS, W.C. et al. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 241-249. 2007.

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

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

FERREIRA, I. C.F.R et al. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1438-1443, 2009.

FERREIRA, R. D. C. **Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen da *Melipona scutellaris* Latreille submetido a diferentes processos de desidratação**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia Faculdade de Farmácia. Salvador, 2013.

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

HERVATIN, H. L. **Avaliação microbiológica e físico-química de pólen apícola *in natura* e desidratado sob diferentes temperaturas**. 2009. 83 f. (Dissertação) (Mestrado em Ciências de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. p. 1020

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

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

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

LEBLANC, B. W. et al. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1299–1305, 2009.

LV, H. et al. Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from Qinghai-Tibetan Plateau by HPLC-DAD-APCI/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 49-54, 2015.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F. et al. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena** v. 7, n. 4, 2011.

MARTINS M C. T. et al. Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states. *Journal of* **Apicultural Science** v. 55, n. 2, 2011.

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

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

MELO, I.L.P.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 514-518, 2010.

MELO, I.L.P. et al. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 346-53, 2009.

MENEZES, S. D. J. et al. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, p. 233-242, 2010.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Biochem**, v. 31, p.426-428, 1959.

MODRO, A.F.H. et al. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1057-1065, 2007.

MORGANO, M. A. et al. Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration. **Food Control**, v. 22, n. 10, p. 1604-1608, 2011.

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

MORAES, R. M.; TEIXEIRA, E. W. **Análise de mel**. Pindamonhangaba, 1998. 42p. (Manual Técnico).

NAGAI, Takeshi et al. Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from beebread. **Zeitschrift für NaturforschungC**, v. 60, n. 1-2, p. 133-138, 2005.

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

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

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

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K.R.A.; MENEZES, M.E.S. **A Química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais**. Maceió: EDUFAL, 2005.

PINHEIRO, F de M. et al. Pólen de abelhas indígenas sem ferrão *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial. **Recursos naturais: uma reflexão para os profissionais da química**. Belém, PA: Conselho Regional de Química da 6ª Região, 2007. Disponível:[http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/408842/1/polend\\_eabelhasindigenassemferraomelipona](http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/408842/1/polend_eabelhasindigenassemferraomelipona). Acesso em: 09 de julho de 2015

PINTO, F.A. et al. Perfil físico-químico do pólen apícola produzido em Taubaté, Vale do Paraíba, sudeste do Brasil. **Archivos Latino americanos de Producción Animal**, v. 20, n.12, p.1-6, 2012.

RODRIGUES, M. A. A. et al. Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de ilha Grande, Angra dos Reis, RJ\*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 30, p. 249-253, 2008.

DE-MELO, A. A. M. et al. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 808-815, 2016.

SEBRAE. **Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia**: relatório completo. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, Série Mercado, Brasília, DF, 243p., 2006.

SERRA BONVEHI et al. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee- collected pollen produced in Spain. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 4, p.1848-1853, 2001.

SILVA, M. S. S. et al. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina-PI. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 801-804. 2005.

SILVA, Tania et al. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 173-178, 2009

SILVA, R.N. et al. Comparision methods for the determination of reducer's sugars and total in honey. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 337–341, 2003.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

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

SOUSA, J. M. B. et al. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do semiárido, estado do rio grande do norte, Brasil. **Semina. Ciências Agrárias (Impresso)**, v. 34, n. 4, p. 1765-1774, 2013.

SOUZA, S.R. C. et al. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazonica**. v. 34, n. 2, 2004.

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B.; SANTOS, C. **Abelhas sem ferrão do Rio Grande do Sul**: manejo e conservação. Porto Alegre: Fepagro, 2005. 79 p.

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



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

VIT, P. Origen botánico y propiedades medicinales del pólen apícola. **Departamento Ciência de los Alimentos**, v. 3, 2009.

## CAPÍTULO 3

### **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE PÓLEN DE ABELHA *Melipona mandacaia* SMITH, 1863<sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup> Manuscrito ajustado e publicado no periódico científico *Molecules*, v. 20, p.12525-12544, 2015.  
(doi:10.3390/molecules200712525)

## **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE PÓLEN DE ABELHA *Melipona mandacaia* SMITH, 1863**

**RESUMO:** Este estudo teve por objetivo avaliar os parâmetros microbiológicos e composição química de 21 amostras de pólen armazenado (samburá) de abelhas sem ferrão (*Melipona mandacaia*) de duas regiões da Bahia, Brasil, (João Dourado e Uibaí) com ênfase especial no valor nutricional, fenóis e flavonoides totais e composição de ácidos graxos. Com relação a qualidade microbiológica, os microrganismos estudados (bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., Psicotróficos e Clostridium sulfito redutores) estiveram ausentes em todas as amostras. Por outro lado, os microrganismos aeróbios e mesófilos os valores obtidos variaram entre  $11,00 \pm 1,00$  a  $1,32 \pm 1,20$  UFC.g<sup>-1</sup> (Amostras de Joao Dourado) e de  $282,00 \pm 3,82$  a  $688,00 \pm 10,10$  UFC.g<sup>-1</sup> (Amostras de Uibaí). Os parâmetros nutricionais (umidade, cinzas, atividade de água, pH, acidez total, proteína fibra, fenóis totais, flavonoides totais e açúcares redutores) estavam dentro do estipulado por lei, com exceção do pH e teor de umidade, que apresentaram valores superiores e inferiores, respectivamente. Os ácidos graxos poliinsaturado (54,1%) foram significativamente mais altos que saturados (42,18%) e monoinsaturados (3,71%). Verificou-se que o samburá é seguro do ponto de vista microbiológico e tem uma boa qualidade nutricional. A influência da origem geográfica nos parâmetros avaliados foi evidente, principalmente em relação ao perfil de ácidos graxos.

**Palavras chave:** pólen de abelha; ácidos graxos; *Melipona mandacaia*; qualidade microbiológica; caracterização nutricional; abelha sem ferrão.

**MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT, NUTRITIONAL CHARACTERIZATION AND PHENOLIC COMPOUNDS OF BEE POLLEN FROM *Melipona mandacaia* SMITH, 1983**

**ABSTRACT:** This study aims to assess the microbiological parameters and the chemical composition of 21 samples of stingless bee pollen (*Melipona mandacaia*) from two regions of Bahia, Brazil (João Dourado and Uibaí), with particular emphasis on the nutritional value, total phenols and flavonoids and fatty acids composition. Regarding the microbiological quality, the studied microorganisms (moulds and yeasts, coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., psychrotrophic and sulfite-reducing Clostridia) were absent in all samples. On the other hand, the values obtained for the aerobic mesophilic microorganism ranged from  $11.0 \pm 1.0$  to  $1.32 \pm 1.2$  cfu·g<sup>-1</sup> (JD samples) and from  $282 \pm 3.82$  to  $688 \pm 10.1$  cfu·g<sup>-1</sup> (U samples). The nutritional parameters (moisture, ash, water activity, pH, total acidity, protein, fiber, total phenolic, flavonoids and reducing sugars) were within the stipulated by law, except for pH and moisture content, which presented superior and inferior values, respectively. Polyunsaturated fatty acids (54.1%) were significantly higher than saturated (42.18%) and monounsaturated (3.71%). It was found that the bee pollen is safe from the microbiological point of view and has a good nutritional quality. The influence of the geographical origin on the assessed parameters was evident, especially concerning the fatty acid profile.

**Keywords:** bee pollen; fatty acids; *Melipona mandacaia*; microbiological quality; nutritional characterization; stingless bee.

## INTRODUÇÃO

Por muitos anos, a meliponicultura foi considerada uma atividade de recreação, visto que as colônias são consideradas de baixa produtividade quando comparada com as abelhas *Apis mellifera* [1]. No entanto evidências recentes comprovam que estas abelhas são facilmente criadas constituindo em uma fonte de renda viável e importante para os meliponicultores, fornecendo uma quantidade considerável de produtos de alta qualidade [2].

No Brasil, as abelhas *Melipona* são abelhas indígenas sem ferrão e estão presentes em todo o seu território, embora as espécies difiram de acordo com a região [3].

A espécie de abelha sem ferrão *Melipona mandacaia* é muito difundida no Brasil nos estados da Bahia, Ceara, Paraíba, Pernambuco e Piauí, geralmente ocorre às margens dos rios São Francisco e Vaza Barris [4]. Além da sua importância como principais polinizadores da maioria das plantas silvestres e de algumas espécies de cultivo, os produtos obtidos a partir desta espécie são também fontes úteis de compostos ativos terapêuticos e desempenham um importante papel na indústria nutricional [5].

De fato, tem sido afirmado que os produtos obtidos a partir da meliponicultura possuem características distintas quando comparado com os produzidos por *Apis mellifera*, principalmente em relação as propriedades sensoriais, recebendo as mais elevadas classificações e atendendo às exigências dos consumidores [6]. No entanto, há pouca evidência disponível na literatura a respeito da composição desses produtos, o que dificulta ainda mais sua utilização na indústria alimentar e farmacêutica.

Dentre estes produtos, ênfase especial pode ser dada ao pólen armazenado sambura um produto natural composto por pólen de flores que as abelhas recolhem e misturam com substâncias específicas, formando as pelotas que são então colocadas nos potes [7]. Este produto da colmeia tem sido usado tradicionalmente para consumo humano, bem como em medicina popular e complementar. De fato, evidências recentes relatam valiosas propriedades biológicas, dentre elas: antimicrobiano, anti-inflamatório, antimutagenica [8], antioxidante [7], anti-alérgica [9], antiviral, hipoglicémicas, hipolipidémicos e imunoestimulantes [10].

O pólen de abelha é rico em carboidratos, fibra bruta, lipídios, vitaminas e compostos fenólicos, sendo comumente chamado como "alimento perfeitamente completo", devido à presença de todos os aminoácidos essenciais [11]. Apesar disso, a composição química específica deste produto natural depende fortemente das espécies de abelhas, origem botânica e geográfica, bem como de outros fatores, entre os quais as condições climáticas, tipo de solo e práticas agrícolas [8].

Este estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros microbiológicos e relatar a composição físico-química de 21 amostras de pólen armazenado (samburá) de *M. mandacaiá* de duas regiões da Bahia (João Dourado e Uibaí) no Brasil, com interesse especial no valor nutricional, fenóis totais e flavonoides totais e composição de ácidos graxos. Em revisão realizada pelos autores, não foi encontrado dados na literatura sobre o pólen de abelha a partir dessa espécie de abelha, apesar da importância científica e sócio-econômico cada vez maior deste produto.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 21 amostras de samburá foram coletadas em duas cidades da Bahia (João Dourado e Uibaí) no Brasil. Os ensaios para avaliação microbiológica e química foram analisados em triplicatas. Devido à ausência de especificações na literatura para o samburá, foi utilizado o pólen de *Apis mellifera* como elemento de comparação, baseado na legislação de diferentes países e trabalhos realizados por diversos pesquisadores [8].

### Contaminação Microbiológica

Em relação aos resultados obtidos para as análises microbiológicas, observou-se que *Salmonella* spp., *Clostridium* sulfito redutores, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras estavam ausentes em todas as amostras. Estes resultados mostraram que, microbiologicamente, as amostras de samburá analisadas são seguras e capazes de serem usadas como um produto alimentar. Estas análises foram realizadas visto que as contaminações microbianas são possíveis, principalmente associada com o processamento dos pólenes, como observado em outros trabalhos, por exemplo, Coronel et al. [12] que

detectaram contaminação por coliformes fecais em vinte e três amostras de pólen apícola e Estevinho et al. [13] detectaram bolores e leveduras em 60% das amostras de pólen, embora em baixa contagem. Na Tabela 1 estão presentes as determinações dos microrganismos aeróbios mesófilos.

Os microrganismos aeróbios mesófilos estavam presentes em todas as amostras de pólen analisadas e com grande variabilidade na concentração ( $85 \pm 63 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  para João Dourado JD e  $443 \pm 142 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  em Uibaí U). Todos os resultados estavam dentro dos limites estabelecidos pelo Código Alimentar Argentino [14], cujo valor máximo foi fixado em  $1,5 \times 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  para os microrganismos aeróbios mesófilos a  $30^\circ \text{ C}$ . Isto sugere que as condições de higiene durante a coleta, limpeza, e armazenamento foram adequadas.

Para avaliar qual teste estatístico poderia ser empregado para verificar a influência da origem (João Dourado JD e Uibaí U) na quantidade de microrganismos aeróbios mesófilos presente nas amostras. Foi verificado se os dados apresentavam normalidade e homogeneidade de variância.

Para cada grupo, o teste de Shapiro-Wilk mostrou que os dados não tinham distribuição normal ( $p < 0,006$  em  $\alpha = 0,05$ ) e o teste de Levene que entre os dois grupos que se formaram não houve homogeneidade de variância ( $p < 0,001$  em  $\alpha = 0,05$ ). Considerando esta situação, o teste de Welch foi aplicado para verificar a igualdade entre as médias dos grupos. Este teste mostrou que as médias dos valores obtidos para mesófilos em ambas as regiões apresentaram diferenças não significativas ( $p < 0,001$  em  $\alpha = 0,05$ ). A Figura 1, mostra o gráfico boxplot para os microrganismos aeróbios mesófilos de cada região que corrobora com achados anteriores, porque foi possível demonstrar que as quantidades de microrganismos aeróbios mesófilos foram maiores nas amostras da região U (com uma média de 5,2 vezes maior do que aqueles apresentados em amostras da região JD) e também com uma maior variabilidade.

Tabela 1. Os resultados obtidos para os aeróbios mesófilos (UFC.g<sup>-1</sup>) nas amostras de samburá de *Melipona mandacaia* de João Dourado e Uibaí, Bahia, Brasil.

João Dourado											
Amostras	JD1	JD2	JD3	JD4	JD5	JD6	JD7	JD8	JD9	JD10	JD11
Aeróbios Mesófilos (UFC.g <sup>-1</sup> )	66,00±3,60	19,7±1,50	132,00±1,2	10,90±1,00	195,64±4,56	21,33±1,53	87,80±2,97	11,00±1,00	162,00±2,64	11,17±1,26	121,58±1,41
Uibaí											
Amostras	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	
Aeróbios Mesófilos (UFC.g <sup>-1</sup> )	514,21±8,51	497,48±8,51	678,27±2,32	307,20±3,41	350,39±2,06	385,60±58,88	688,40±4,13	352,83±10,07	282,15±2,46	375,67±3,82	

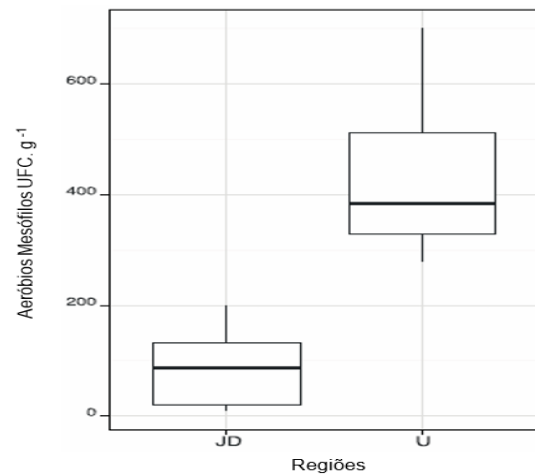


Figura 1. Boxplot para bactérias aeróbios mesófilos.



## Caracterização nutricional e composição fenólica

Os parâmetros físico-químicos analisados foram: teor de umidade, cinzas, atividade de água (aw), valor de pH, acidez total, teor de proteínas, teor de fibras, teor de fenóis totais, teor de flavonóides e teor de açúcares redutores. Os resultados mostraram que parte destes parâmetros tinham valores variando em um intervalo pequeno, com valores de desvio padrão percentual que variaram entre 1,10% e 6,60%. Estes parâmetros foram o teor de umidade, o qual tinha um valor médio de  $36,00 \pm 2,0\%$ ; as cinzas, com uma percentagem de  $4,90 \pm 0,3\%$ ; e, a atividade da água com  $0,86 \pm 0,02\%$  (valores obtidos em  $26,7 \pm 0,8^\circ \text{C}$ ). Além disso, os valores médios de pH foram  $3,49 \pm 0,04$  e acidez total,  $146 \pm 10 \text{ meq kg}^{-1}$ . Em relação aos outros parâmetros estudados, as porcentagens de desvio padrão relativo variou de 11,00% a 39,00%: teor de proteína apresentou um valor médio de  $21,00 \pm 2\%$ ; teor médio de fibra foi de  $3,60 \pm 1,40\%$ ; teor de fenóis totais foi de  $40,00 \pm 13,00 \text{ mg GAE / g}$ ; teor de flavonóides foi de  $1,0 \pm 0,2 \text{ mg CAE / g}$ ; e, o teor de açúcares redutores foi de  $12,00 \pm 2,00\%$ .

Os valores obtidos para pH são inferiores aos estabelecidos pela legislação brasileira [15] e o Código Alimentar Argentino [14], bem como, aos obtidos por Coronel et al. [12] e Marchini et al. [16], em amostras de pólen desidratadas da Argentina e do Brasil, respectivamente. No que diz respeito as análises de AW, cinzas e a umidade, os valores obtidos foram mais altos que aqueles encontrados por Morais et al. [7], Feás et al. [11] e Nogueira et al. [17], em amostras de pólen desidratados de Portugal. O teor de cinzas estava de acordo com os limites estabelecidos no Código de Alimentos da Argentina [14], ou seja, entre 2% e 5%, e também com os obtidos por Almeida-Muradian et al. [18] ( $2,10 \pm 0,8\%$ ) e Bonvehi et al. [19] (4,80%) em amostras de pólen desidratados do Brasil e da Espanha, respectivamente.

Todas as amostras apresentaram teor de água elevado, excedendo o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (Max de 30% para pólen apícola e 4% para pólen apícola desidratado), Argentina (8% em pólen apícola), Bulgaria (10%) e Suíça (6%) [20]. De acordo com Marchini et al. [16] isto pode estar relacionada com o fato do pólen, ser um produto higroscópico, e facilmente afetado pelas condições ambientais. O teor de proteína foi similar aos obtidos por Almeida-Muradian et al. [18], González-Martín et al. [21] e Carpes [22] em

amostras de pólen do Brasil, Espanha. Estevinho et al. [13] apresentaram resultados de proteína em pólen Português entre 24,00% e 34,00%, valores ligeiramente mais elevados do que os encontrados neste estudo. O teor de açúcares redutores foi muito menor do que os valores obtidos por Carpes [22] ( $49,00 \pm 4\%$ ) em amostras de pólen do Brasil e de González-Martin et al. [21] em amostras de pólen da Espanha (23,00% a 41,00%). De acordo com Silva et al. [23] e Carpes et al. [24], o teor de açúcares redutores no pólen está associada com a quantidade de mel ou néctar presente no produto. O teor de fibra e da acidez total estão dentro dos limites estipulados pela legislação brasileira (mínimo de 2% de fibras e máx.  $300 \text{ meq kg}^{-1}$  de acidez livre) [15].

As concentrações de compostos fenólicos obtidos no presente estudo foram ligeiramente maiores do que o relatado por Carpes et al. em amostras de pólen de abelhas *Apis mellifera* do Brasil [25] e por Morais et al. [7] e Feás et al. [11], que estudou pólen de abelha *Apis mellifera* de Portugal. No entanto, os resultados aqui relatados estão dentro do intervalo encontrado em outros estudos, por exemplo, em amostras de pólen de *A. mellifera* da região Sul do Brasil [22], em pelotas de pólen dos EUA [26] e em diferentes pólenes comerciais de abelhas ibéricas [17].

Neste contexto, apesar das diferenças obtidas não serem muito relevantes, estas podem ser atribuídas, principalmente, a diferenças nas espécies de abelhas, mas também a diversidade botânica e origem geográfica dos produtos estudados [25,27]. Quanto ao teor de flavonóides totais, as amostras de pólen analisadas apresentaram valores mais baixos do que aqueles encontrados por LeBlanc et al. [26], Mărghitas et al. [28], Feás et al. [11] e Carpes [22], em amostras de pólen da América do Norte, Roménia e Brasil, respectivamente.

No estudo de colinearidade, utilizando todas as variáveis, as relações lineares apresentaram coeficiente de correlação (R) menor que 0,5, com exceção de 2 relações: teor de umidade x cinzas ( $R = -0,67$  com  $p < 0,001$ ); fenóis totais versus teor de flavonóides ( $R = 0,63$  com  $p < 0,001$ ). Estes resultados estão de acordo com o fato de que a gama de valores de variáveis não era muito grande, a fim de se obter qualquer tendência linear relevante. Figura 2 apresenta dois gráficos boxplot de todos os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras: (A) os dados brutos; (B) dados centralizados e padronizados. Figura

2A permite visualizar a variabilidade das variáveis em uma única escala e para identificar os valores extremos.

Em primeiro lugar, foi possível verificar que as variáveis tiveram ordem de importância diferente, indicando que quando se utiliza múltiplas variáveis, devem ser centralizadas e padronizadas de modo que todas tenham a mesma importância no estudo estatístico. Em segundo lugar, os valores extremos (melhor visualizado na Figura 2B) identificados no gráfico boxplot foram: acidez total na amostra de U4, teor de proteínas na amostra de J10, teor de fenóis totais na amostra U10 e teor de açúcares redutores na amostra JD7. Estes valores extremos não eram comuns a outras variáveis sendo assim, as amostras respectivas não podem ser consideradas como *outlines*.

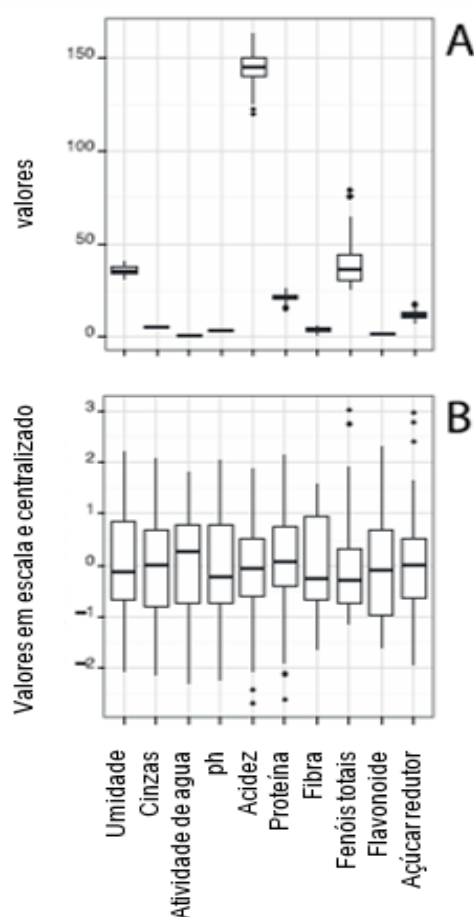


Figura 2. Dois gráficos boxplot de todos os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras: (A) dados brutos; (B) dados centralizados e padronizados.

Para verificar a similaridade das amostras considerando essas características físico-químicas, foi aplicada a análise de componentes principais, um método para análise multivariada supervisionada. O método deu 10

componentes principais (PCs) que explicavam 100% da variância total dos dados; o PC1 explicou 28% da variância total, enquanto PC2 explicou 21%. Os três PCs seguintes representam 15%, 10% e 9% da variância total dos dados, enquanto os PCs restantes tinham valores entre 0,8% e 6%. A Figura 3 mostra dois gráficos dos resultados das amostras nos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), enfatizando o local de origem de cada amostra por meio de marcadores diferentes; no primeiro gráfico (A) mostra-se a capacidade das variáveis originais; no segundo gráfico (B), a proposta de agrupamento e possíveis *outline*. Outras representações com outras funções de PC foram consideradas, mas verificou-se que não mostraram informação relevante para o estudo. Figura 3 permitiu visualizar que a maioria das amostras da região JD são separadas da região de U, mostrando que a origem da amostra contribui para as características físicas-químicas.

Amostras da região de JD, em geral, são caracterizadas por terem valores mais elevados de acidez total, teor de proteína e teor de açúcares redutores e valores baixos / intermediários da atividade de água, pH, teor de fibras, teor de flavonóides e teor de fenóis totais. No que diz respeito às amostras de U, a maioria teve a tendência oposta, com exceção das amostras U8, U9 e U10, que se desviaram de todas as outras, apresentando níveis mais elevados de compostos fenólicos totais e teor de umidade.

Antes de avaliar a significância das diferenças entre os resultados das duas localidades, foi avaliada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis acidez total, proteínas, fibras, flavonóides totais e açúcares redutores não possuem normalidade ( $p < 0,033$ ) para amostras de pólen de JD, enquanto que para as amostras de pólen de U foi observado o mesmo comportamento para pH, fibras e flavonóides totais ( $p < 0,012$ ) (em vez de acidez total, teor de proteínas, teor de fibras, teor de flavonóides e teor de açúcares redutores nas amostras de JD mostrou falta de normalidade ( $p < 0,033$ ); as amostras de U as variáveis que apresentaram ausência de normalidade foram os valores de pH, teor de fibras e teor de flavonóides ( $p < 0,012$ ).

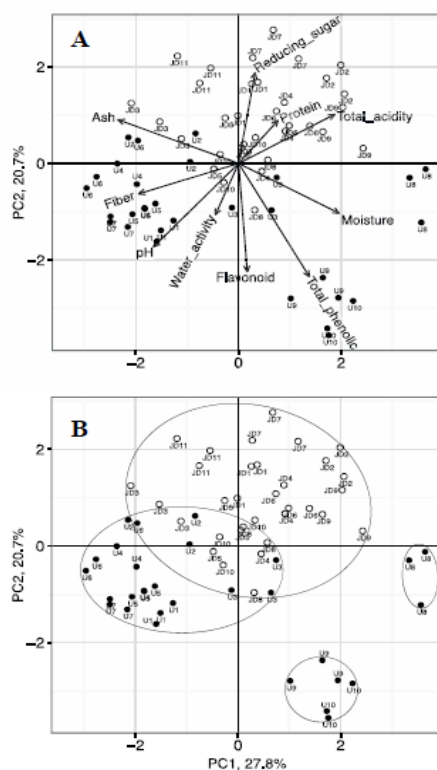


Figura 3. Representação dos dois primeiros componentes principais para todas as amostras de pólen que distinguem o local de origem por meio de marcadores diferentes: enredo (A) inclui as cargas das variáveis originais; plot (B) inclui possíveis outline do agrupamento das amostras.

Para confirmar estes resultados foram obtidos uns gráficos QQ normais. Foi possível verificar um baixo grau de inclinação em que valores inferiores estavam presentes na distribuição das mesmas variáveis. Em segundo lugar, foi utilizado o teste de Levene para avaliar a homogeneidade das variâncias. Os parâmetros umidade, acidez total, fibras e açúcares redutores mostraram homogeneidade de variância ( $p > 0,57$ ) nos dados das duas regiões investigadas (em vez de conteúdo de umidade, acidez total, conteúdo de fibras e teor total de açúcar tiveram variações de homogeneidade ( $p > 0,57$ ) nos dados de ambas as regiões).

Foi aplicada Anova *one-way* e foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos para as duas regiões para todos os parâmetros, exceto teor de umidade ( $p = 0,78$ ).

Em relação às variáveis teor de cinzas, atividade de água, pH, teor de proteína, conteúdo de fenóis totais e flavonóides neste momento não havia

homogeneidade de variância. Neste caso, foi aplicado um Welch ANOVA. As variáveis teor de cinzas, valores de pH, atividade de água e teor de proteínas não apresentaram diferenças significativas entre as amostras de cada região ( $p > 0,070$ ). Em contraste, o teor de compostos fenólicos totais e flavonóides diferiram significativamente ( $p < 0,003$ ).

Globalmente, as variáveis acidez total, fibra, fenóis totais, teores de açúcares redutores e de flavonóides, tinham informações relevantes que permitem distinguir amostras das duas regiões e sua contribuição para distinção das amostras é evidente na Figura 3.

### **Perfil de ácidos graxos**

No geral, por análise de cromatografia em fase gasosa, foi possível identificar 15 ácidos graxos diferentes presentes nas amostras, sendo nove saturados e seis ácidos graxos insaturados: ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido pentadecílico (C15:0), ácido palmítico (C16:0), ácido margárico (C17:0), ácido esteárico (C18:0), de ácido oleico (C18:1n9ct), ácido linoleico (C18:2n6c), ácido  $\alpha$  linolénico (C18:3n3), ácido araquídico (C20:0), ácido eicosatrienóico (C20:3n3), o ácido erúico (C22:1n9) e ácido nervónico (C24:1). Estes ácidos graxos já foram identificados em amostras de pólen estudados em outros trabalhos [29,30].

Exceto os ácidos erúico e nervônico que, de acordo com informações recolhidas pelos autores, é a primeira vez que é mencionado. Alguns dos ácidos graxos identificados não foram detectados em todas as amostras de pólen. Quatro ácidos graxos (C8:0, C12:0, C20:3n3 e C24:1) não foram detectados em mais que 5 amostras, presente em ambas as regiões, enquanto que o ácido graxo C22:1n9 não foi detectado em 2 amostras da região de JD e o C17:0, em 2 amostras da região de U. Deve ser notado que, as amostras da região de JD, o ácido gordo C20:3n3 tinham níveis geralmente inferior ou não foi detectada em número maior de amostras que nas amostras da região de U. A Tabela 2 mostra a média e desvio padrão dos valores totais dos resultados dos ácidos graxos, bem como, os resultados parciais, para cada uma das regiões em estudo. O perfil cromatográfico obtido mostra que o ácido palmítico, ácido linoleico e ácido linolénico (C16:0, C18:2n6c e C18:3n3, respectivamente) foram aqueles com

valores superiores a média que >18% dos ácidos graxos totais. Mas, embora as duas regiões terem níveis médios similares de ácido palmítico, pólen da região de JD apresentaram maiores níveis médios de ácido linoleico (duas vezes o valor obtido no pólen da região de U) e, pelo contrário, o ácido linolénico tinham níveis baixos, cerca de metade daqueles encontrados em amostras da região de U. Os ácidos graxos restantes mostraram níveis médios inferiores a 2,3% e 4,4% em pólen das regiões de JD e U, respectivamente. Além disso, os valores do desvio-padrão mostraram uma grande variabilidade nos resultados para esses ácidos graxos com níveis baixos, o que mostra que, neste trabalho, houve uma variabilidade intrínseca em amostras utilizadas, ainda que na mesma região.

No geral os níveis de ácidos graxos insaturados foram maiores que os ácidos graxos saturados, apresentando níveis entre 43% e 70% dos ácidos graxos totais.

Além disso, em geral, os ácidos graxos poli-insaturados foram significativamente maiores do que os ácidos graxos mono-insaturados e saturados totais. A proporção entre ácidos graxos insaturados / saturados foi de  $1,4 \pm 0,4$ . Apenas quatro amostras mostraram tendências contrárias, embora em duas amostras os resultados entre as repetições não foram concordantes. Esta tendência de proporção foi relatada em um trabalho anterior [13], que afirma que estes resultados estão de acordo com a hipótese de que as abelhas escolhem pólen com maior teor de ácidos graxos insaturados (mais adequadas para o seu metabolismo). De um ponto de vista nutricional, esta relação mostra que esse pólen pode ser um trunfo se adicionado a alimentos processados, melhorando a qualidade nutricional dos alimentos fabricados [13].

Tabela 2. A análise descritiva dos ácidos graxos do pólen.

Nome comum dos ácidos	Ácidos Graxos	Todas as amostras (%)		Amostras da região JD (%)		Amostras da região U (%)	
		Média	DPAD	Média	DPAD	Média	DPAD
Ácido caprílico	C8:0	0.11	0.11	0.14	0.13	0.09	0.08
Ácido caprico	C10:0	0.28	0.17	0.42	0.05	0.12	0.11
Ácido láurico	C12:0	0.06	0.04	0.05	0.04	0.06	0.02
Ácido mirístico	C14:0	0.28	0.11	0.32	0.12	0.24	0.08
Ácido pentadecilico	C15:0	1.28	1.10	2,00	1.04	0.50	0.41
Ácido palmítico	C16:0	34.99	4.88	34.1	5.28	35.96	4.33
Ácido margárico	C17:0	0.36	0.27	0.54	0.25	0.17	0.10
Ácido esteárico	C18:0	1.97	0.88	1.36	0.51	2.65	0.67
Ácido oléico	C18:1n9ct	1.79	1,00	2.22	0.84	1.33	0.99
Ácido linoleico	C18:2n6c	27.79	9.91	36.58	4.04	18.12	2.51
Ácido a-linolênico	C18:3n3	26.08	10.03	18.85	6.47	34.03	6.62
Ácido araquidônico	C20:0	2.85	2.02	1.44	0.85	4.4	1.77
Ácido eicosatrienóico	C20:3n3	0.23	0.25	0.14	0.24	0.33	0.22
Ácido erúcico	C22:1n9	1.12	0.53	0.87	0.48	1.40	0.44
Ácido nervonico	C24:1	0.80	0.50	0.97	0.48	0.61	0.45

Na Tabela 3 está apresentada a matriz de correlação obtida por meio de testes de dependência linear entre pares das variáveis (ácidos graxos) utilizando coeficientes de correlação de Pearson. Apenas 10 relações entre os pares de variáveis apresentaram tendência linear razoável (inclinação positivos e negativos), com valores de correlação de person entre 0,71 e 0,87; e coeficientes de correlação positiva maior que 0,7 foram obtidas entre pares de variáveis de C10:0 C18:2n6c (R = 0,87), C15:0-C17:0 (R = 0,71), C17: 0 C18: 2n6c (R = 0,74 ) e C18: 0-C20: 0 (R = 0,84); aqueles com valores negativos, e os valores absolutos superiores a 0,7 foram encontrados para as relações: C10:0–C18:2n6c (R = -0,80), C10: 0-C20:0 (R = -0,82), C18:0-C18:2n6c (R = -0,74), C18:2n6c-C18:3n3 (R = -0,79), C18: 2n6c-C20:0 (R = -0,73) e C18:3n3-C24:1 (R = -0,71).

Não foram encontrados relação linear com valores absolutos de coeficientes de correlação superior a 0,9 e, por isso, todos os ácidos graxos foram considerados nos estudos seguintes.



Tabela 3. Matriz de correlação para os ácidos graxos utilizando coeficientes de correlação de Pearson.

Valores R-Pearson	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1n9ct	C18:2n6c	C18:3n3	C20:0	C20:3n3	C22:1n9	C24:1
<b>C8:0</b>	1.00														
<b>C10:0</b>	0.10	1.00													
<b>C12:0</b>	-0.29	0.00	1.00												
<b>C14:0</b>	0.27	0.43	0.13	1.00											
<b>C15:0</b>	0.27	0.66	-0.32	0.53	1.00										
<b>C16:0</b>	0.42	0.00	-0.17	0.26	0.05	1.00									
<b>C17:0</b>	0.19	0.66	-0.11	0.11	0.71	-0.15	1.00								
<b>C18:0</b>	0.15	-0.67	0.03	-0.15	-0.56	0.54	-0.63	1.00							
<b>C18:1n9ct</b>	-0.08	0.49	0.40	0.37	0.25	-0.43	0.29	-0.45	1.00						
<b>C18:2n6c</b>	0.14	0.87	-0.05	0.32	0.65	-0.26	0.74	-0.74	0.48	1.00					
<b>C18:3n3</b>	-0.41	-0.80	0.11	-0.52	-0.67	-0.35	-0.62	0.31	-0.24	-0.79	1.00				
<b>20:0</b>	0.10	-0.82	-0.09	-0.27	-0.48	0.32	-0.59	0.84	-0.60	-0.73	0.43	1.00			
<b>C20:3n3</b>	-0.43	-0.17	0.21	0.01	-0.17	0.08	-0.03	0.19	0.00	-0.28	0.19	0.06	1.00		
<b>C22:1n9</b>	-0.19	-0.44	0.19	-0.07	-0.55	0.42	-0.53	0.68	-0.38	-0.53	0.20	0.51	0.42	1.00	
<b>C24:1</b>	0.24	0.55	0.27	0.48	0.22	0.51	0.22	0.05	0.22	0.38	-0.71	-0.27	0.09	0.24	1.00

Na Figura 4 estão apresentados os boxplots de cada ácido graxo permitindo visualizar os dados obtidos para as amostras de pólen das duas regiões e a variabilidade encontrada dentro de cada grupo. A figura mostrou gráficos com valores considerados extremos resultados típicos (não outline) uma vez que as amostras não apresentaram a mesma tendência em outras variáveis.

Por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, foi mostrado que as variáveis de ácidos graxos sem normalidade ( $p < 0,007$ ) foram C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C17:0, C18:1n9ct, C18:2n6c, C20:0 e C20:3n3. Com valores  $p$  maiores que 0,09, e as variáveis que apresentaram normalidade foram C16:0, C18:0, C18:3n3, C22:1n9 e C24:1.

Para avaliar a homogeneidade das variâncias, em cada ácido graxo, considerando os grupos definidos, foi aplicado o teste de Levene. As variáveis que apresentaram homogeneidade de variância ( $p > 0,05$ ) foram: C8:0, C10:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1n9ct; C18:3n3, C20:3n3, C22:1n9 and C24:1. Para as variáveis que atendem aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, foi aplicado a Anova one-way para verificar se houve diferenças significativas entre os valores médios das amostras das duas regiões. Também nesta oportunidade, para as variáveis não-normais, foram utilizados métodos não paramétricos; o teste de Kruskal-Wallis, se as variáveis foram homocedástico, ou teste de Welch (Anova com correção de Welch), se as variáveis foram heteroscedástico.

O método da Anova mostrou que apenas o ácido graxo C16:0 não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos de amostras ( $p = 0,22$ ). Com os testes não-paramétricos, verificou-se que apenas os ácidos graxos C8:0 e C12:0 não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,12$ ), enquanto as demais variáveis apresentaram diferenças significativas entre as amostras das duas regiões ( $p < 0,036$ ). As três variáveis com diferenças significativas entre os grupos de amostras (C8:0; C12:0 e C16:0) não foram utilizadas no estudo PCA. As demais variáveis, por terem resultados com diferentes magnitudes, foram centralizadas e escalonadas. Portanto, a matriz de dados de PCA foi construída utilizando os resultados de 12 ácidos graxos analisados nas 21 amostras de pólen.

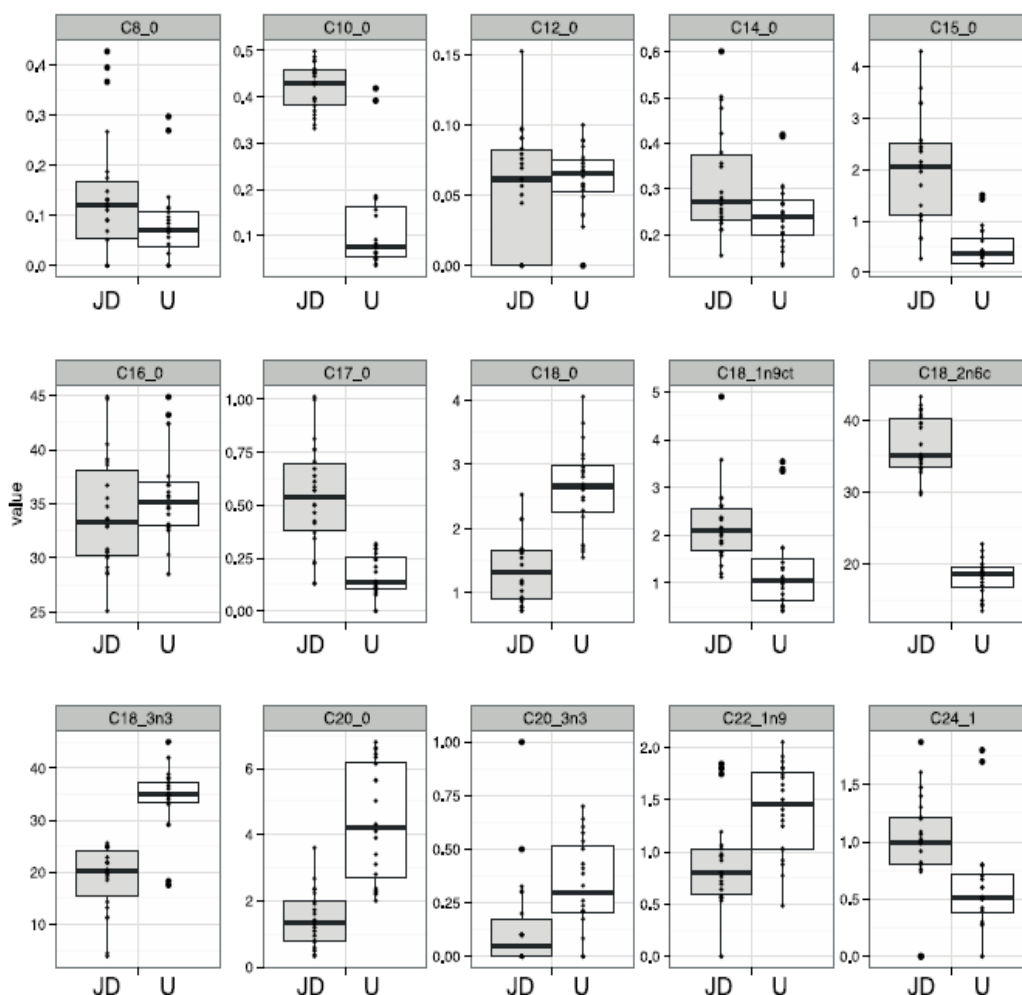


Figura 4. Boxplot de cada ácido graxo de acordo com sua região.

Os resultados de PCA mostraram que 7 componentes principais foram suficientes para explicar 96% da variância total dos dados. O primeiro e o segundo componente principal explicaram 67% da variância total dos dados. A Figura 5 mostra a representação dos valores dos dois primeiros componentes principais obtidos para os resultados da análise de ácidos graxos.

Foi possível visualizar o comportamento de variabilidade das amostras, mostrando que as amostras de pólen podem ser separadas em dois grupos, de acordo com o local de origem dos pólenes. Usando o primeiro componente principal (PC1), foi possível separar as amostras de pólen da região de JD, presentes no quadrante negativo, da região de U, presente no quadrante positivo. A figura mostra que as amostras da região de U foram agrupadas em PC1 devido principalmente a altos níveis dos ácidos graxos C18:0, C18:3n3, C20:0, C20:3n3 e C22:1n9. Apenas a amostra U3 se desviou deste agrupamento

por ter níveis globais médios de ácidos graxos na dimensão PC1, mas, principalmente, porque tinham valores mais elevados no segundo componente principal (PC2). Caso contrário, na mesma dimensão, o pólen da região JD mostrou ter um perfil de lipídios com níveis mais elevados de ácidos graxos: C10:0, C14:0, C15:0, C17:0, C18:1n9ct, C18:2n6c and C24:1. Neste grupo, a amostra JD8 também demonstrou ter um perfil distinto sobre todas as outras amostras JD, que é enfatizada pelo PC2.

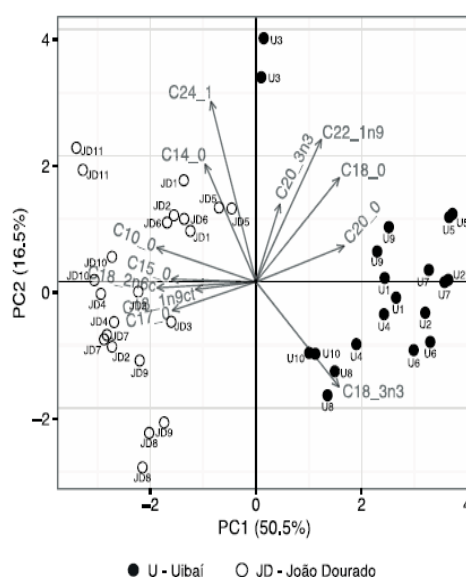


Figura 5. Os valores dos dois primeiros componentes principais dos ácidos graxos dos pólen.

## SEÇÃO EXPERIMENTAL

### Amostras de pólen

Neste estudo, foram coletadas 21 amostras de pólen de abelha *Melipona mandacaiá* em duas regiões: 11 amostras de João Dourado (JD: 11 ° 21'00 " S 41 ° 39'50 'O') e 10 amostras de Uibaí (U: 11 ° 20'13 " S 42 ° 07'58 'O'), os dois municípios pertencem a micro-região de Irecê, no estado da Bahia, na região Nordeste do Brasil. Estas duas regiões têm diferenças em suas altitudes refletindo na diversidade de flora. Condições ambientais encontradas em Uibaí permitem maior umidade, resultando em maior diversidade de plantas. Neste ambiente, a vegetação nativa ainda é preservada. Em contraste, a região de João Dourado tem menor umidade e maior influência humana, sobre tudo em

atividades agro-pastoris, refletida em uma menor diversidade de espécies nativas. Essas diferenças na composição florística entre as duas regiões podem influenciar a composição físico-química do pólen armazenado pela abelha *M. mandacaia*.

Cada amostra foi identificada usando letras U ou JD, representando a origem geográfica, e número. A preparação dos extratos foi realizada como descrito por Morais et al. [7], por mistura do pólen de abelha com metanol (1: 2) (w / v). Após maceração, o extrato de pólen de abelha foi evaporado num evaporador de vácuo e o extrato seco foi mantido no escuro à temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas em triplicata, obtendo-se 63 resultados para cada parâmetro.

### **Determinação microbiológica**

Para avaliar a qualidade microbiana das amostras de pólen de abelha *Melipona mandacaia*, foram analisadas as presenças de microrganismos mesófilos, bolores e leveduras, coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sulfito redutores e *Salmonella* spp

### **Preparação da amostra**

Uma massa de 25 g de pólen foi assepticamente tomada e homogeneizada durante 3 minutos com 225 mL de água peptonada. Diluições decimais seriadas foram preparadas a partir deste homogeneizado nos mesmos diluentes estéreis refrigerados (1:10 v / v) [31].

### **Quantificação dos microrganismos mesófilos totais**

A quantificação dos microrganismos aeróbios mesófilos totais foi feito seguindo o regulamento português [32], com a semeadura por incorporação de 1 mL para cada diluição decimal em placa de Petri contendo meio cultura *Plate Count Agar* (PCA-Himedia, Mumbai, Índia). A contagem de colónias foi efetuada após a incubação das placas a 30 °C durante 72 h e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de pólen de abelha (UFC g<sup>-1</sup>).

### **Quantificação de bolores e leveduras**

A quantificação de bolores e leveduras foi efetuada no DG18 e incubou-se a 25 °C durante 5 dias. As contagens foram expressas em UFC g<sup>-1</sup> [33].

### **Esporo de *Clostridium* sulfito redutor**

A quantificação de esporos de *Clostridium* sulfito redutores foi realizada de acordo com a norma ISO [34]. Primeiramente, 1, 5 e 10 mL do caldo em suspensão foram colocados no tubo de ensaio. Os tubos foram aquecidos num banho de água a 80 °C durante 10 min. Subsequentemente, as amostras foram divididas em placas de Petri contendo o ágar sulfito base de ferro (Himedia). Em seguida, adicionou-se uma outra camada de meio e a placa selada com parafilme. Após solidificação, as placas foram incubadas a 37 °C durante 72h. O aparecimento de colônias negras nas placas foi considerado como um resultado positivo. Os resultados foram expressos em Numero Mais Prováveis de esporos de *Clostridium* sulfito redutores esporos por grama de pólen de abelha (MPN g<sup>-1</sup>).

### **Quantificação de coliformes fecais e *Escherichia coli***

Para a quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*, foi usando o sistema SimPlate kit de Controle Bio. O meio de cultura fornecido foi pré-hidratado em 9 mL de água destilada, inoculados com 1 mL da suspensão de estoque e homogeneizada no vórtex, seguindo as recomendações do fabricante. O conteúdo foi vertido em placas que contêm 84 poços. O líquido foi uniformemente distribuído entre os poços em um movimento circular a baixa velocidade e o excesso foi removido. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 a 48h. A enumeração de coliformes totais foi realizada por contagem do número de cavidades em que ocorreu a alteração da cor no meio de cultura. A enumeração de *E. coli* foi realizada por contagem do número de cavidades em que a fluorescência foi observada após a exposição da placa a uma luz ultravioleta (UV) a 365 nm. O número de coliformes presentes na amostra foi calculada de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante [35].

### **Pesquisa de *Salmonella* sp.**

A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada utilizando o teste de imunodifusão em 1-2 test, como descrito no método da AOAC [36]. Os resultados

foram obtidos após 16-20 horas de pré-enriquecimento em água peptonada tamponada e os resultados foram interpretados visualmente, por monitoramento do desenvolvimento de uma imunobanda, que é um padrão característico de imobilização de células.

### **Determinação de *Staphylococcus aureus***

Diluições seriadas da amostra foram inoculadas em Caldo Baird-Parker com gema de ovo, Telurito e Solução sulfadimidina (Himedia) durante 24 h (37 °C). Em seguida, três a cinco colônias características foram selecionadas, a fim de verificar a presença de coagulase e catalase. Contagens microbianas foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por grama de pólen de abelha (UFC g<sup>-1</sup>) [37].

### **Analises físico-química**

#### **Teor de umidade**

Aproximadamente 2 g de cada amostra de pólen de *Melipona mandacaia* foi seco em temperatura de 105 °C, até peso constante [38].

#### **Teor de Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria após a incineração a 550 ± 15 ° C [39].

#### **Atividade de água**

Este parâmetro foi determinado pela colocação de cada uma das amostras de pólen diretamente num medidor de atividade de água (Rotronic HygroPalm. Bassersdorf CH-8303) [40].

#### **Valor de pH**

O pH foi medido na fase aquosa obtido após a mistura de 1 g de pólen em 75 mL de água destilada [40], por um eletrodo combinado de pH conectado a um pH 211 Microprocessor Medidor de pH da Hanna Instruments.

### **Acidez livre**

Em relação à acidez total, 2,5 g de pólen foram misturados com água isenta de CO<sub>2</sub> e a titulação com NaOH 0,05 M foi iniciada num fluxo de 5 mL por minuto, até atingir o pH 8,5. Esta determinação foi realizada de acordo com a norma da AOAC [40].

### **Teor de proteína**

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl (230 Kjeltex Analyzer, Foss Tecator, Höganäs, Suécia). O teor de proteína bruta (PB), foi calculada usando o fator de conversão de 6,25 ( $N \times 6,25$ ) [38].

### **Teor de Fibra**

O teor de fibra foi determinado de acordo com o método de Van Soest et al. [41] adaptado por Komarec [42] e Senger et al. [43], utilizando detergente neutro e digestão por autoclavagem.

### **Teor de Fenóis totais**

O teor fenólico total no extrato de pólen de abelha foi estimado seguindo o método Folin-Ciocalteu, previamente descrito por Moreira et al. [44]. Resumidamente, a reação de 500 µL de extrato de metanol (MeOH / pólen de abelha; 500 µL 1:10 g mL<sup>-1</sup>), misturou-se com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10% m/v) manteve-se no escuro à temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida, após da reação da mistura absorvância foi lida a 700 nm, utilizando um espectrômetro de UV-visível Unicam Helios Alpha (Thermo Spectronic, Cambridge, Reino Unido). Para a obtenção da curva padrão foi utilizado ácido gálico ( $0,01 \times 10^{-3}$  a  $0,08 \times 10^{-3}$  M). O Teor de fenóis totais foram expressos em mg de equivalentes de ácido Gálico por g de extrato de pólen de abelha (GAEs).

### **Teor de Flavonoides**

Para determinação do teor de flavonóides, 250 µL de extratos metanólico de pólen foram misturados com 1,25 mL de H<sub>2</sub>O destilada e 75 µL solução de NaNO<sub>2</sub> 5%. Depois de 5 minutos, foram adicionados 150 µL de uma solução AlCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 10%. Após 6 min, foram adicionados 500 µL de NaOH (1 M) e 275 µL



de H<sub>2</sub>O destilada foram adicionados. A solução foi bem misturada e a intensidade da cor foi medida a  $\lambda = 510$  nm. Soluções padrão catequina ( $0,022 \times 10^{-3}$  a  $0,34 \times 10^{-3}$  M) foram utilizados para a obtenção da curva de calibração. O teor de flavonóides totais foram expressos em mg de catequina por g de pólen de abelha (CAEs).

### **Açúcares Redutores**

Açúcares redutores foram determinados pelo método de DNS (ácido dinitrossalicílico) [45].

### **Determinação de perfil de ácido graxo**

A gordura bruta (CF) foi extraída com éter de petróleo usando um dispositivo automático de Soxtec (FOSS, Soxtec™ 2050, Höganäs, Suécia) [41 AOAC, 1995].

Ésteres metílicos dos ácidos graxos foram preparados a partir da fração CF extraída por transesterificação utilizando MeOH na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uma amostra contendo de  $20 \pm 0,5$  mg de lipídeos foi re-dissolvido em 0,75 mL de n-hexano; em seguida, 0,1 mL de KOH 2 N em MeOH foi adicionado e a solução foi misturada num misturador *vortex*, durante 2 min (Modelo Reax 2000, Schwabach, Alemanha) e secou-se sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro.

Após separação de fases, a camada superior de n-hexano contendo os ésteres de ácidos graxos foi removida e injetada num cromatógrafo de fase gasosa DANI modelo GC 1000 (Izasa, Barcelona, Espanha), equipado com um injetor *split/splitless*, um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey-Nagel (30 m x 0,32 mm DI x 0,25  $\mu$ m: fase estacionária de 50% cianopropilo-metil-50% phenylmethylpolysiloxane).

As análises dos ésteres metílicos foram realizadas utilizando H<sub>2</sub> como gás de transporte a uma pressão de 0,61 bar e a razão de separação foi de 1:40. O fluxo do gás transportador foi estabelecido em 4,0 mL min<sup>-1</sup>. Um gradiente térmico a partir de 170 até 240 °C a 3,5 °C min<sup>-1</sup> foi usado com as temperaturas de injetor e do detector a 240 °C. O volume de injeção foi de 1  $\mu$ L. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos na amostra de pólen com os ésteres de referência conhecidos. A composição de ácidos graxos foi expressa como percentagem dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos a partir das áreas dos picos. Os resultados

foram gravados e processados usando Clarity 4.0.1.7 Software (DataApex, Podohradská, República Checa).

### **Analises estatísticas**

Todos os ensaios foram realizados de forma totalmente aleatória. Numa primeira abordagem, foi realizada uma análise descritiva geral, calculando médias, desvios-padrão e porcentagens de desvio padrão relativo (RSD (%)). Para avaliar a dependência linear entre os pares de variáveis, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson e apresentados na forma de matriz de correlação.

O Teste de Shapiro-Wilks foi utilizado para verificar se os dados seguiam distribuições normais para cada categoria da variável e gráfico normal QQ trama independente foi utilizado para confirmar se as variáveis que faltam normalidade poderia ter uma distribuição aproximadamente normal. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Então, Anova one-way foi aplicado quando as variáveis tiveram grupos com normalidade e homogeneidade de variância e teste de Kruskal-Wallis, sempre que havia homogeneidade de variância (variáveis homocedásticas) e não-normalidade. A Anova com correção de Welch foi aplicada em não normalidade e sem homogeneidade de variância (variáveis heteroscedásticos).

Para estudar a variabilidade dos dados em geral, a análise de componentes principais (PCA), uma técnica multivariada não supervisionada, foi utilizada para gerar um novo conjunto de variáveis ortogonais (combinações lineares das variáveis originais), componentes principais (PCs), o que representa um novo subespaço onde a principal variação presente nos dados originais é representada principalmente pelos primeiros componentes. Foi utilizado para a visualização de grupos ocultos, e possíveis outline, considerando as projeções das variáveis cargas originais, a influência das variáveis na distribuição de amostras.

Todos os estudos estatísticos [46,47] foram realizados utilizando o programa estatístico R fonte aberta (versão 2.15.1) [48] e adotando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **CONCLUSÃO**

O pólen de abelha é um produto natural com uma composição química que possui relevantes propriedades biológicas, confirmando seu valor nutricional como um produto alimentício. Neste trabalho, pela primeira vez, foi estudado o perfil geral de ácidos graxos e caracterização físico-química de amostras de pólen coletados por *Melipona mandacaia* em duas regiões.

Além disso, verificou-se a presença de microrganismos, a fim de avaliar a sua segurança alimentar, uma vez que as amostras seguiram um processamento normal, quer em todos os passos de colheita do pólen ou a nível de armazenamento. Neste último estudo, os resultados mostraram que todas as amostras estavam livres de contaminação microbiana e apenas a presença de mesófilos foram detectados, indicando que a manipulação pólen era adequado.

Os parâmetros físicos-químicos apresentaram valores dentro do estipulado pela legislação, com exceção do pH e teor de umidade, que as amostras apresentaram valores inferiores e superiores, respectivamente, do que os estabelecidos pela legislação brasileira [15] ou Código Alimentar Argentino [14]. Estes dois resultados sugeriram que os parâmetros de condições de armazenagem devem ser melhorados a fim de evitar fermentações indesejáveis deste produto. Deve se notar que os compostos fenólicos possuem um elevado teor o que contribui para um aumento da capacidade antioxidante de pólen embora, uma situação diferente foi encontrada para o teor total de flavonóides. Considerando a variabilidade natural dentro dos resultados das amostras de pólen, foi possível considerar que a origem geográfica das amostras teve um grande impacto nas características físico-químicas, confirmados por PCA, mostrando que os resultados globais tinham informações relevantes para distinguir parcialmente as amostras entre as duas regiões. Este ponto foi mais evidente quando se lida com perfil de ácidos graxos, que foi mostrado que os dados permitiram completa distinção entre as amostras das duas regiões em estudo. Os perfis de ácidos graxos confirmaram que os compostos poli-insaturados foram significativamente maiores do que os ácidos graxos mono-insaturados e saturados. Assim, considerando a relação entre ácidos graxos insaturados e saturados, o pólen coletado por abelhas sem ferrão *Mandacaia* pode ser um trunfo como produto alimentar, devido à sua qualidade nutricional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Venturieri, G.C.; Raiol, V.F.O.; Pereira, C.A.B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança-PA, Brasil. *Biota Neotrop.* **2003**, *3*, 1–7.
2. Contrera, F.A.L.; Menezes, C.; Venturieri, G.C. New horizons on stingless beekeeping (Apidae, Meliponini). *R. Bras. Zootec.* **2011**, *40*, 48–51.
3. Lima-Verde, L.W.; Freitas, B.M. Occurrence and biogeographic aspects of *Melipona quinquefasciata* in NE Brazil (Hymenoptera, Apidae). *Braz. J. Biol.* **2002**, *62*, 479–486.
4. Kuhn-Neto, B.; Contrera, F.A.L.; Castro, M.S.; Nieh, J.C. Long distance foraging and recruitment by a stingless bee, *Melipona mandacaia*. *Apidologie* **2009**, *40*, 472–480.
5. Batalha-Filho, H.; Waldschmidt, A.M.; Alves, R.M.O. Distribuição potencial da abelha sem ferrão endêmica da caatinga, *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Apidae). *Magistra* **2011**, *23*, 129–133.
6. Rodríguez-Malaver, A.J.; Rasmussen, C.; Gutiérrez, M.G.; Gil, F.; Nieves, B.; Vit, P. Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1221–1226.
7. Morais, M.; Moreira, L.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1096–1101.
8. Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *63*, 233–239.
9. Moita, E.; Sousa, C.; Andrade, P.B.; Fernandes, F.; Pinho, B.R.; Silva, L.R.; Valentão, P. Effects of *Echium plantagineum* L. bee pollen on basophil degranulation: Relationship with metabolic profile. *Molecules* **2014**, *19*, 10635–10649.
10. Komosinska-Vassev, K.; Olczyk, P.; Kafmierczak, J.; Mencner, L.; Olczyk, K. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 2015.

11. Feás, X.; Vázquez-Tato, M.P.; Estevinho, L.; Seijas, J.A.; Iglesias, A. Organic bee pollen: Bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules* **2012**, *17*, 8359–8377.
12. Coronel, B.B.; Grasso, D.; Pereira, S.C.; Fernández, G. Caracterización bromatológica del pólen apícola argentino. *Cienc. Docencia Tecnol.* **2004**, *15*, 141–181.
13. Estevinho, L.M.; Rodrigues, S.; Pereira, A.P.; Feás, X. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 429–435.
14. *Argentine Food Code (Código Alimentario Argentino—CAA)*; De la Canal y Asociados: Buenos Aires, Argentina, 1998.
15. Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Polen Apícola, Propolis e Extrato de Propolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília, DF, 19 January 2001. Available online: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%203.htm> (accessed on 21 May 2015).
16. Marchini, L.C.; Reis, V.D.A.; Moreti, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Afrecanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Ciênc. Rural Santa Maria* **2006**, *36*, 949–953.
17. Nogueira, C.; Iglesias, A.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 11173–11187.
18. Almeida-Muradian, L.B.; Pamplona, L.C.; Coimbra, S.; Barth, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 105–111.
19. Bonvehí, J.S.; Jordà, R.E. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 725–732.
20. Melo, I.L.P.; Almeida-Muradian, L.B. Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. *Food Sci. Technol. (Camp.)* **2011**, *31*, 194–197.

21. González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J.M.; Barros-Ferreiro, N.; Marcos, C.C.; García-Villanova, R.J. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. *Talanta* **2007**, *72*, 998–1003.
22. Carpes, S.T. Estudo das características Físico-Químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil. PH.D. Thesis, Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Sector de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brazil, 2008.
23. Silva, T.M.S.; Camara, C.A.; Lins, A.C.S.; Barbosa-Filho, J.M.; Silva, E.M.S.; Freitas, B.M.; Santos, F.A.R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 507–511.
24. Carpes, S.T.; Cabral, I.S.R.; Rosalen, P.L.; Alencar, S.M.; Masson, M.L. Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. *Aliment. Nutr.* **2009**, *20*, 271–277.
25. Carpes, S.T.; Begnini, R.; Alencar, M.; Masson, M.L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciênc. Agrotecnol.* **2007**, *31*, 1818–1825.
26. LeBlanc, B.W.; Davis, O.K.; Boue, S.; DeLucca, A.; Deeby, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1299–1305.
27. Leja, M.; Mareczek, A.; Wyżgolik, G.; Klepacz-Baniak, J.; Czekoń, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem.* **2007**, *100*, 237–240.
28. Mărghitas, L.A.; Stanciu, O.G.; Dezmirean, D.S.; Bobiș, O.; Popescu, O.; Bogdanov, S.; Campos, M.G. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem.* **2009**, *115*, 878–883.
29. Saa-Otero, M.P.; Díaz-Losada, E.; Fernández-Gómez, E. Analysis of fatty acids, proteins and ethereal extract in honeybee pollen: Considerations of their floral origin. *Grana* **2000**, *39*, 175–181.
30. Isidorov, V.A.; Isidorova, A.G.; Szczepaniak, L.; Czyzewska, U. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1056–1063.

31. Microbiologia Alimentar—Preparação da amostra para análise microbiológica. In *Norma Portuguesa (NP) 1829*; Instituto Português de Qualidade (IPQ): Lisboa, Portugal, 1982.
32. Microbiologia Alimentar—Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30 °C. In *Norma Portuguesa (NP) 3788*; Instituto Português da Qualidade (IPQ): Lisboa, Portugal, 2002.
33. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds—Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95. In *ISO 21527-2*; International Standards Organization: Winterthur, Switzerland, 2006.
34. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. In *ISO 15213*; International Standards Organization: Winterthur, Switzerland, 2003.
35. Detection and confirmed quantitation of coliforms and *E. coli* in foods SimPlate coliform and *E. coli* color indicator first action. In *AOAC-Official Method 2005.03*; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA, 2005.
36. Motile Salmonella in All Foods Immunodiffusion (1–2 Teste). Method First Action. In *AOAC-Official Method 989.13*; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA, 1989.
37. Microbiologia Alimentar—Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte 1: Técnica com confirmação de colónias (método corrente). In *Norma Portuguesa (NP) 4400-1*; Instituto Português da Qualidade (IPQ): Lisboa, Portugal, 2002.
38. *AOAC-Official Methods of Analysis*, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA, 1995.
39. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos Para Análise de Alimentos*, 4th ed.; Ministry of Health: Brasília, Brazil, 2005.
40. *Official Method of Analysis of the AOAC*, 15th ed.; AOAC International; Association of Official Analytical Chemists Inc.: Rockville, MD, USA, 1990; pp. 31–46.

41. Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 3583–3597
42. Komarek, A.R. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. *J. Dairy Sci.* **1993**, *76* (Suppl. 1), 250.
43. Senger, C.C.D.; Kozloski, G.V.; Snachez, L.M.B.; Mesquita, F.R.; Aaves, T.P.; Castagnino, D. S. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *146*, 169–174.
44. Moreira, L.; Dias, L.G.; Pereira, J.A.; Estevinho, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis sample from Portugal. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 3482–3485
45. Silva, R.N.; Monteiro, V.N.; Alcanfor, J.A.X.; Assis, E.M.; Asquieri, E.R. Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. *Food Sci. Technol. (Camp.)* **2003**, *23*, 337–341.
46. Dalgaard, P. *Introductory Statistics with R (Statistics and Computing)*; Springer-Verlag New York: New York, NY, USA, 2008.
47. Rencher, A.C. *Methods of Multivariate Analysis*; Wiley: New York, NY, USA, 1995.
48. R Project for Statistical Computing. Available online: <http://www.r-project.org/> (accessed on 23 May 2015).



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo pode-se avaliar o efeito de diferentes condições de processamento e armazenamento nas características físico-químicas (nutricionais) e microbiológicas do pólen armazenado (samburá) de *Melipona mandacaia*.

Os tratamentos refrigeração, pasteurização, secagem e desumidificação, mantiveram a estabilidade microbiológica e físico-química do pólen armazenado (samburá) em todos os processos de conservação durante os 180 dias de armazenamento.

Os métodos de conservação refrigeração e pasteurização poderão ser indicados como métodos alternativos, uma vez que, são métodos simples e não requerem uso de equipamentos sofisticados, no entanto, a longo prazo se tornam caros, uma vez que tem que manter o produto sob refrigeração para sua comercialização. Os métodos de secagem e desumidificação ambos promovem a desidratação da amostra com uso de equipamentos como estufa e desumidificadores.

Após a comprovação da eficiência de ambos os métodos aplicados na conservação do samburá há sugestão de uso do método de secagem uma vez que é um método consagrado no ramo de alimentos, sendo também a secagem um método simples e que não requer grandes investimentos, podendo ser aproveitadas estruturas existentes para o processamento do pólen apícola, sem grandes investimentos em infraestrutura e compra de equipamentos.

Com os resultados deste trabalho pode se perceber também que muitos dos parâmetros avaliados não estão de acordo com a legislação vigente para pólen apícola, porém ela é usada como base para qualificar o samburá devido a falta de literatura para este produto.

Com esse estudo comprovou-se que o samburá apresenta recursos polínicos ricos em nutrientes e que uso correto de técnicas de coleta, conservação e armazenamento são fundamentais para a obtenção de um produto de qualidade. Entretanto, se faz necessário a ampliação dos estudos para outras espécies com vista na criação de uma legislação própria para o samburá.