



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Caracterização de Compostos Fenólicos e de Minerais em Alguns Pólenes Apícolas

Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar

Marisa Gonçalves Monsanto

Orientadores

Prof. Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Prof. Doutora Maria Graça Campos

Setembro de 2013



Caracterização de Compostos Fenólicos e de Minerais em Alguns Pólenes Apícolas

Marisa Gonçalves Monsanto

Orientadores

Prof. Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Prof. Doutora Maria Graça Campos

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica do Professor Adjunto Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e co orientação do Professor Auxiliar Doutora Maria Graça Campos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro, 2013

Dedicatória

Ao meu Marido, pela sua paciência, mas também pelo apoio e incentivo, nunca me deixando desistir.

Ao meu Filho Rodrigo, que apesar das negas ocasionais para brincar e trabalhar, sempre me dedicou os seus mais belos sorrisos e os seus maiores abraços.

Ao Filho que está para nascer, que me acompanhou sempre na etapa mais trabalhosa e pelo stress que sofreu.

Aos meus Pais e Irmã, pelo constante apoio e incentivo, por acreditarem sempre nos meus sonhos e ambições e nunca me deixarem desistir.

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho contei com o contributo de várias pessoas às quais gostaria de deixar um sincero agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço à minha família, Marido e Filho, por serem o meu porto seguro, pelo apoio e pelo que abdicaram para que eu tivesse tempo para a realização deste trabalho.

Aos meus Pais e Irmã pelo apoio incondicional, por tudo o que abdicaram para que pudesse chegar até aqui e por me terem ensinado, desde pequena, os valores que hoje definem aquilo que sou.

Agradeço também aos Amigos mais próximos, Colegas de Trabalho e Primas que sempre me incentivaram para a continuação e realização deste trabalho.

Um profundo agradecimento à Dra. Maria Graça Campos, pelo exemplo que é para mim e por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela valiosa orientação científica, pelos seus incentivos e pela disponibilidade, bem como paciência revelada na realização do trabalho prático e leitura dos resultados.

À Professora Ofélia Anjos, pela paciência e disponibilidade na realização de parte do trabalho prático e teórico, bem como pela valiosa orientação e incentivo.

Quero ainda expressar ao IPCB e à ESA, o meu reconhecimento pela formação durante dois anos, bem como gratidão a todos os professores que, através dos seus ensinamentos, contribuíram para a construção de novos alicerces a partir dos quais construirei o meu futuro.

Uma palavra também para as minhas Abelhas, que muitas vezes serviram de cobaias para as inúmeras experiências e colheitas que tive de efetuar.

Resumo

O pólen apícola resulta da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas, mediante o acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel. Este possui uma composição química constituída por hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, lípidos, vitaminas, substâncias minerais e oligoelementos, além de quantidades significativas de compostos fenólicos principalmente flavonóides.

No presente trabalho foi realizada a análise polínica ao pólen obtido em Dornelas do Zêzere, determinando assim a origem floral do mesmo bem como a preferência das abelhas por determinada espécie floral. Foi colhida uma amostra em cada apiário em três datas distintas, num total de 6 amostras.

Foi efectuada a separação por cor das cargas polínicas, cada cor deveria corresponder a um tipo de pólen diferente. No entanto, verificou-se que tonalidades diferentes da mesma cor pertenciam ao mesmo *táxon*, ou seja, à mesma espécie floral. Isto deve-se certamente às diferentes percentagens de humidade das cargas polínicas.

Na primeira colheita realizada foram identificadas as espécies *Cistus ladanifer* L., *Erica australis* e *Ulex europeans* L., na segunda colheita realizada em Julho foi identificada a *Rubus ulmifolius*. Na última colheita realizada em Setembro foi identificada a *Calendula arvenses* e *Calluna vulgaris*.

Foi realizada a preparação dos extractos das cargas polínicas, para determinação dos perfis cromatográficos dos compostos fenólicos totais e flavonóides totais por HPLC/DAD.

Foram identificados no pólen de *Cistus ladanifer* L. flavonóis, derivados da miricetina-3-*O*-substituídos, quercetina-3-*O*-ramnósido e quercetina-3-*O*-glucósido, canferol-3-*O*-glucósido. No pólen de *Erica australis* também se encontraram derivados de quercetina-3-*O*-R, como a quercetina-3-*O*-galactose e ainda canferol-3-*O*-substituído. Nas análises de *Ulex europeaus* L. o pólen continha 8-*O*-metil-herbacetina-3-*O*-soforósido, derivados de ácido cafeico e derivados de ácido cumárico. Os compostos fenólicos como a herbacetina-3-*O*-ramnósido e outros derivados da herbacetina-3-*O*-substituída e ácidos fenólicos foram encontrados também nos extractos de pólen de *Rubus ulmifolius*. O canferol-3-*O*-ramnósido foi encontrado na *Calluna vulgaris* e na espécie *Calendula arvenses*, foram detectados derivados de quercetina-3-*O*-R, e derivados de ácido cafeico, gálico e síringico.

Das amostras maioritárias de cada colheita foram determinadas as concentrações em Cádmio, Crómio, Ferro, Zinco, Manganês, Cobre e Chumbo, por ICP-OES, verificando-se que as espécies *Rubus ulmifolius* e a *Calluna vulgaris* apresentaram unicamente valores elevados de Manganês, acima de valores de referência.

Até à data ainda são precisos mais estudos em pólen apícola de origem portuguesa dada a importância deste produto como alimento ou mesmo como fonte de moléculas bioactivas. Assim, todos os resultados são importantes para que exista uma completa

base de dados relativa a este recurso natural com origem na flora do nosso país e o presente trabalho pretende contribuir para esta informação.

Palavras chave

Pólen apícola, flora apícola, compostos fenólicos, análise polínica, minerais

Abstract

The Pollen results on a pollen collection from flowers produced by bees, by adding salivary substances and small amounts of nectar or honey. Its chemical composition is made of carbohydrates, proteins, amino acids, lipids, vitamins, minerals and trace elements, as well as significant quantities of phenolic compounds mainly flavonoids.

The present study was carried out on pollen analysis which was collected in Dornelas Zêzere, thus determining its floral origin and the preference for certain species of floral bees. One sample was collected in the apiary on three different dates, a total of 6 samples.

A separation by colour of pollen loads was made; each colour should be corresponding to a specific pollen type. However, it was found that different shades of the same color belonging to the same taxon, or at the same floral species. This is probably due to the different moisture content of the pollen loads.

In the first sample species *Cistus ladanifer* L., *Erica australis* L. and *Ulex europeans* were identified, in the second one collected in July *Rubus ulmifolius* was identified. In the last sample collected in September *Calendula arvensis* and *Calluna vulgaris* were identified.

We prepared preparations of extracts of pollen loads for determination of chromatographic profiles of total phenolics and flavonoids by HPLC / DAD.

In the pollen of *Cistus ladanifer* L. flavonol, derivatives of myricetin-3-O-substituted, quercetin-3-O-rhamnoside, quercetin- 3-O-glucoside and kaempferol-3-O-glucoside have been identified. In pollen *Erica australis* L. derivatives of quercetin-3-O-R, such as quercetin-3-O-galactose and also kaempferol-3-O-substituted were also found. After analyzing *Ulex europeus* L. pollen, it was found 8-O-methylherbacetine-3-O-sophoroside, derivatives of caffeic acid and coumaric acid. Phenolic compounds such as herbacetin-3-O-rhamnoside and other derivatives of 3-O-substituted, phenolic acids have also been found in pollen extracts of *Rubus ulmifolius*. The kaempferol-3-O-rhamnoside was found in *Calluna vulgaris* and in *Calendula arvensis*, quercetin-3-O-R derivatives, and derivatives of caffeic, gallic acid and syringic acid were also found.

In main collected samples, concentrations in Cadmium, Chromium, Iron, Zinc, Manganese, Copper and Lead by ICP – OES were determined, verifying that only the species *Rubus ulmifolius* and *Calluna vulgaris* (L) Hull had elevated manganese result above the limit.

Up to date, more studies are still needed in bee pollen of Portuguese origin given the importance of this product as a food or as a source of bioactive molecules. Thus, all results are important for there in order to complete a database on this natural resource originating in the flora of our country and the present work aims to contribute to this information.

Keywords

Bee pollen, bee flora, phenolic compounds, pollen analysis, mineral

Índice geral

Dedicatória	III
Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice Geral	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XVII
1. Introdução	1
2. Importância do Pólen Apícola	3
2.1 Flora Apícola	3
2.2 Abelha <i>Apis mellifera</i> colectora de Pólen	3
2.3 O Pólen	5
2.3.1 Composição do pólen Apícola	7
2.3.2 Palinologia	8
2.3.3 Produção, Recolha e Armazenamento do Pólen Apícola	10
2.3.4 Propriedades Funcionais do Pólen Apícola	14
2.3.5 Presença de Minerais no Pólen Apícola	17
3. Compostos Fenólicos	20
3.1 Ácidos Fenólicos	23
3.2 Flavonóides	25
4. Material e Métodos	27
4.1 Amostragem	27
4.2 Análise Polínica	31
4.3 Determinação dos Compostos Fenólicos por HPLC/DAD	33
4.4 Determinação do Teor de Minerais	35
5. Resultados e Discussão dos Resultados	36
5.1 Análise Polínica e Determinação da Origem Floral	36
5.2 Compostos Fenólicos	41
5.3 Minerais	65

6. Considerações Finais	67
7. Referências Bibliográficas	69

Índice de figuras

Figura 1. Abelha <i>Apis mellifera</i>	4
Figura 2. Abelha a colher pólen, com corbículas cheias de pólen	6
Figura 3. Grãos de pólen de várias espécies florais observados ao microscópio óptico.	8
Figura 4. Grãos de pólen de várias espécies florais observados ao microscópio electrónico.....	9
Figura 5. Tipos de arranjos de grãos de pólen na tétrade.....	9
Figura 6. Capta-pólen de madeira.	10
Figura 7. Exemplo de um tipo de Secador de Pólen.....	12
Figura 8. Fontes antropogénicas e naturais de metais pesados nos produtos das abelhas.....	19
Figura 9. Estrutura química de um fenol simples	20
Figura 10. Exemplos de estruturas de polifenóis mais encontrados em alimentos	24
Figura 11. Núcleo Flavano, estrutura genérica dos flavonóides.....	25
Figura 12. Numeração de um flavonoide sem anel C. (Chalcona).....	26
Figura 13. Estrutura química dos principais tipos de flavonóides	26
Figura 14. Localização geográfica dos Apiários	27
Figura 15. Flora apícola em Dornelas do Zêzere	28
Figura 16. Apiário de Vale Grande	29
Figura 17. Apiário do Caniçal	29
Figura 18. Grãos de pólen separados por cores, 20 Maio 2012: a) Caniçal, b) Vale Grande.....	30
Figura 19. Grãos de pólen separados por cores, 14 Julho 2012: a) Caniçal, b) Vale Grande.....	30
Figura 20. Grãos de pólen separados por cores, 12 Setembro 2012: a) Caniçal, b) Vale Grande.....	30
Figura 21. Equipamentos usados para a preparação e análise dos extractos	34
Figura 22. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de <i>Cistus ladanifer</i> L (Caniçal).....	41
Figura 23. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Cistus ladanifer</i> L.(Caniçal) ...	42

Figura 24. Cromatograma tipo de compostos polifenólicos de pólen de <i>Cistus ladanifer</i> L.	43
Figura 25. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de <i>Erica australis</i> (Caniçal).....	44
Figura 26. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Erica australis</i> L (Caniçal).	45
Figura 27. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de <i>Rubus ulmifolius</i> (Caniçal).	46
Figura 28. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Rubus ulmifolius</i> (Caniçal).	46
Figura 29. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos e encontrados no pólen apícola C1_a (Caniçal).....	48
Figura 30. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de C1_a (Caniçal).....	48
Figura 31. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de <i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull (Caniçal).....	50
Figura 32. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Calluna vulgaris</i> L (Hull) (Caniçal)	50
Figura 33. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola <i>Calendula arvenses</i> (Caniçal).....	51
Figura 34. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Calendula arvenses</i> (Caniçal)	52
Figura 35. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de <i>Cistus ladanifer</i> L. (Vale Grande).....	53
Figura 36. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Cistus ladanifer</i> L (Vale Grande)	53
Figura 37. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola <i>Ulex europaeus</i> (Vale Grande).....	55
Figura 38. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Ulex europaeus</i> .(Vale Grande).....	55
Figura 39. Cromatograma tipo de compostos polifenólicos de pólen de <i>Ulex europaeus</i>	57
Figura 40. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola VG1_a (Vale Grande).....	57
Figura 41. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de GV1_a (Vale Grande)	58
Figura 42. Perfil de HPLC/DAD dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola <i>Erica australis</i> (Vale Grande)	59
Figura 43. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Erica australis</i> (Vale Grande).	59
Figura 44. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de <i>Rubus ulmifolius</i> (Vale Grande).....	60

Figura 45. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Rubus ulmifolius</i> (Vale Grande)	61
Figura 46. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola VG1_a (Vale Grande).....	62
Figura 47. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de VG1_a (Vale Grande).	62
Figura 48. Perfil de HPLC/DAD dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de <i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull (Vale Grande).....	63
Figura 49. Espectro DAD dos compostos Fenólicos de <i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull (Vale Grande).....	63

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição do Pólen em Minerais (DDR- Dose Diária Recomendada)...	17
Tabela 2. Classificação dos Compostos Fenólicos	21
Tabela 3. Classificação dos Flavonóides	22
Tabela 4. Identificação de cada amostra de acordo com o local, data de colheita e cor do pólen	31
Tabela 5. Peso dos grãos de pólen de cada amostra e quantidade de solução etanólica a 50% adicionada	34
Tabela 6. Limite de quantificação para os diferentes metais pesados analisados	35
Tabela 7. Resultados obtidos na Microscopia do pólen apícola, foto do pólen e identificação do pólen apícola, no apiário do Caniçal.	37
Tabela 8. Resultados obtidos na Microscopia do pólen apícola, foto do pólen e identificação do pólen apícola, no apiário do Vale Grande.....	39
Tabela 9. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Cistus ladanifer</i> L.(Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas.....	42
Tabela 10. Espectros Flavonóides encontrados em <i>Cistus ladanifer</i> L.	44
Tabela 11. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Erica australis</i> (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas	45
Tabela 12. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Rubus ulmifolius</i> (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas	47
Tabela 13. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de C2_a com relativos tempos de retenção e estruturas	49
Tabela 14. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas	50
Tabela 15. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Calendula arvenses</i> (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas	52
Tabela 16. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Cistus ladanifer</i> L. (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas	54
Tabela 17. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Ulex europeus</i> L. (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas	56
Tabela 18. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de VG1_a com relativos tempos de retenção e estruturas	58
Tabela 19. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Erica australis</i> (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas	60

Tabela 20. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Rubus ulmifolius</i> (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas.....	61
Tabela 21. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de VG_2 (vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas	62
Tabela 22. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de <i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas.....	64
Tabela 23. Valor de Concentração média de Minerais analisados no pólen em mg/kg peso seco	65

1. Introdução

O Homem desde cedo que começou a dedicar-se à criação de abelhas, Apicultura, sabe-se que desde a antiguidade as abelhas têm sido valorizadas pelos seus produtos e admiradas pelo seu comportamento.

Existem várias espécies de abelha, no entanto a espécie *Apis mellifera* é uma abelha social de origem europeia. Esta espécie é a mais utilizada pelos apicultores portugueses, que pode não ser a espécie maior produtora de mel e de outros produtos apícolas, no entanto é a que se adapta mais facilmente às nossas condições climáticas e geográficas (Nogueira, 2012).

Os principais produtos apícolas são o mel, o pólen, a geleia real, cera, própolis e o veneno de abelha, a apitoxina. Estes produtos têm sido desde cedo procurados e valorizados pelas propriedades terapêuticas e nutricionais, bem como muito utilizados na medicina tradicional, dietas e nutrição suplementar.

O pólen é o gâmeta masculino das flores das plantas, sendo produzido pelas anteras e conduzido pelo ovário tendo como objectivo garantir a fecundação do mesmo e deste modo garantir a reprodução da planta, e a sobrevivência da espécie.

A composição do pólen varia de acordo com a sua origem botânica (Bogdanov, 2011c), condições ambientais, climáticas, geográficas, idade e estado nutricional da planta e estações do ano. Por conter todos os aminoácidos essenciais necessários ao organismo humano, este produto é considerado como um alimento completo.

O pólen é uma boa fonte de energia e de nutrientes para o Homem, pois contém substâncias nutricionais como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, aminoácidos, minerais e vitaminas. Além disso, o pólen apícola apresenta também na sua constituição quantidades significativas de substâncias polifenólicas, principalmente na classe dos flavonóides.

Os flavonóides e ácidos fenólicos são considerados importantes ingredientes do pólen apícola, podendo ser usados para padronizá-lo em relação às suas propriedades nutricionais e para controlar a qualidade das preparações de pólen apícola distribuída no comércio (Carpes, 2008).

O ramo da botânica que estuda o pólen através do tempo e da morfologia é a Palinologia (Arruda, 2008). É através da análise polínica que se classificam as espécies botânicas pelas suas características que são muito variadas. Por exemplo, as camadas que envolvem o grão de pólen possuem formas ovoides, circulares, rugosas, lisas, segmentadas, entre outras.

A análise polínica depende de grande experiência por parte do analista já que se baseia na análise morfológica do pólen, a partir de descrições da literatura.

O pólen desde a sua produção, recolha e armazenamento, deve obedecer a determinados padrões e critérios de forma a manter um rigor na qualidade em todo o processo e produção.

Este é recolhido dos apiários através do auxílio de uma ferramenta designada de capta-pólen que é colocada na entrada de voo no exterior da colmeia. Este utensílio pode ser constituído por diferentes materiais. O transporte e processamento do pólen devem ser feitos o mais rápido possível. Após a chegada à unidade transformadora, pode-se proceder à sua congelação e posteriormente à secagem. Após esta etapa é feita a remoção de partículas estranhas, embalamento e rotulagem.

As abelhas como agentes polinizadores, são bons bioindicadores para a poluição ambiental. Devido ao efeito da poluição é previsível que plantas que crescem em zonas contaminadas absorvam parte desses contaminantes, que se vão alojar em partes das plantas nomeadamente no pólen e deste modo chegar à cadeia alimentar e integrar na alimentação das pessoas.

A Apicultura é uma actividade valiosa do ponto de vista social, ambiental e económico, no entanto, a produção de pólen apícola em Portugal é muito reduzida, talvez devido, principalmente, ao desconhecimento por parte dos apicultores e dos consumidores, dos atributos que este produto possui e a falta de métodos adequados para a sua conservação.

A falta de legislação Portuguesa relativa a este produto da colmeia, torna essencial a sua caracterização, a fim de contribuir para a elaboração de critérios (normas), que permitam regulamentar e valorizar este produto apícola em Portugal.

Este trabalho tem como objectivo global caracterizar e avaliar o pólen apícola de dois apiários recentes localizados em Dornelas do Zêzere, enquanto os objectivos específicos são:

- Avaliar e identificar a origem floral do pólen apícola através da análise polínica;
- Identificar qualitativamente os fenóis totais e flavonóides;
- Quantificar os minerais presentes no pólen.

2. Importância do Pólen Apícola

2.1 Flora Apícola

As plantas de interesse apícola pertencem a diversas famílias botânicas. A sua identificação em termos de características melíferas é muito importante, visto que cada planta contém néctares e pólenes específicos e em quantidades diferentes (Agreste e Bem-haja, 2003). Além disso, pelo facto de cada planta apresentar pólen específico, sendo a cor uma dessas características torna-se mais fácil a identificação e separação das cargas polínicas após a sua recolha, bem como associar a carga polínica e a espécie botânica a que pertence.

Existem várias agentes polinizadores que favorecem a polinização cruzada, como o vento, os animais, a água e os insectos. Estes últimos são os mais importantes, principalmente as abelhas, que desenvolveram na sua evolução mecanismos apropriados para se tornar excelentes polinizadores, como pelos em todo o corpo, que favorecem o transporte dos grãos e o seu eficiente sistema de comunicação, que permite a uma abelha indicar rapidamente a todas as outras abelhas a localização de alimento (Agreste e Bem-haja, 2003).

A flora apícola é definida como um conjunto de espécies vegetais que as abelhas utilizam como fonte de néctar e/ou pólen para a sua sobrevivência e produção de mel (Almeida, 2007).

De acordo com Silva (2009), as plantas apícolas podem ser divididas em três grupos:

- a) Plantas nectaríferas – que fornecem exclusivamente néctar às abelhas;
- b) Plantas poliníferas – que fornecem pólen às abelhas;
- c) Plantas nectaríferas-poliníferas – que fornecem tanto néctar como pólen às abelhas.

2.2 Abelha *Apis mellifera* colectora de Pólen

Segundo Spurgin (1996) é difícil de determinar a partir de que data é que o Homem começou a dedicar-se à criação de abelhas, no entanto sabemos que desde a antiguidade as abelhas têm sido valorizadas pelos seus produtos e admiradas pelo seu comportamento.

Pertencem á ordem *Hymenoptera*, classificada em duas subordens e várias superfamílias divididas em inúmeras espécies. Conhecem-se mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam mais do dobro que ainda não foram descobertas (Nogueira, 2012).

As abelhas são descendentes das vespas, estas deixaram de se alimentar de aranhas e de pequenos insetos para consumirem o pólen das flores (Nogueira, 2012).

A espécie *Apis mellífera* (Figura 1) é uma abelha social de origem europeia. Esta espécie embora não sendo a que produz maior quantidade de mel é a que se adapta mais facilmente às nossas condições climáticas e geográficas (Nogueira, 2012).

As abelhas são bastantes organizadas, uma colónia das abelhas é constituída por cerca de 80.000 abelhas, a maior parte operárias, uma rainha e zangões que variam entre 0 a 400. A função da abelha rainha é a postura dos ovos bem como a manutenção da ordem social na colmeia. As operárias realizam todo o trabalho para manter a colmeia, executando actividades distintas de acordo com a idade devido ao desenvolvimento glandular e das necessidades diferenciadas da colónia (Carpes, 2008).

As abelhas obreiras têm funções diferentes consoante a sua idade (Fernandinho, 2002):

- 1-3 dias, tem como função limpar as células;
- 3-6 dias, tratar e alimentar as larvas mais velhas;
- 6-10 dias, tratar as larvas mais novas;
- 10-17 dias, as obreiras têm o dever de alimentar e cuidar da rainha;
- 18 dias, limpar e fazer cera e favos para mel e crias;

-18 a 20 dias, guardam a casa. Após os 20 dias saem para o campo, para a colheita de própolis, néctar, pólen e água.

Os zangões são os machos da colónia, sendo a sua função fecundar a rainha durante o voo nupcial.

O tamanho das colónias pode variar de acordo com a disponibilidade de alimento, época do ano, tratamento e com a região.



Figura 1. Abelha *Apis mellifera* (Fonte: FNAP, 2010)

Existem vários factores que influenciam a preferência das abelhas por determinadas flores, nomeadamente e como foi referido anteriormente da quantidade de produção de néctar e pólen.

Segundo Almeida (2007), a atractividade de uma flor pode ser influenciada pela quantidade de pólen produzido, a concentração e abundância das flores, o número de insectos competidores, a distância entre a flor e o ninho e a preferência por determinada espécie.

As variações como o tamanho da flor, a humidade relativa do ar, a humidade do solo, a temperatura, a altitude, o horário e duração do dia são também factores que afectam as condições florais (Almeida et al, 2003).

De acordo com Silva (2009), na abelha *Apis mellifera*, a variação do tamanho corporal poderá contribuir potencialmente para a eficiência da colheita de pólen.

2.3 O Pólen

O pólen é o gâmeta masculino das flores das plantas, sendo produzido pelas anteras e conduzido até ao ovário tendo como objectivo garantir a fecundação do mesmo e deste modo garantir a reprodução da planta, e a sobrevivência da espécie. O pólen é formado por minúsculos grãos e é recolhido pelas abelhas e levado para a o interior da colmeia, sendo utilizado na preparação do alimento das larvas jovens, devido ao seu alto valor nutritivo, riqueza em proteínas naturais, a que se acresce sais minerais como o potássio, o fósforo, o enxofre, o cobre, o ferro, o cloro, o magnésio, o silício e quantidades variáveis de elementos dos complexos vitamínico B, C, D e E (FNAP, 2010).

Os grãos de pólen podem ser de várias cores, variando entre o branco, amarelo, laranja, vermelho e tons mais escuros dependendo da sua origem botânica e da composição química de pigmentos encontrados na exina (camada externa do grão de pólen).

As abelhas polinizam cerca de 40000 espécies de plantas. A polinização das abelhas é fundamental para a manutenção das espécies, biodiversidade e agricultura (Bogdanov, 2011c).

O pólen apícola é recolhido pelas abelhas e levado para o interior da colmeia, sendo este utilizado na preparação do alimento das larvas jovens, devido ao seu alto valor nutritivo.

As abelhas recolhem os grãos de pólen das anteras das flores, aglutinam os grãos de pólen em pequenas bolotas e agregam-no com o auxílio de pequenas quantidades de néctar e de secreções salivares. Depois é transportado com as patas posteriores, mais especificamente com a tíbia, até á colmeia, onde o depositam nos alvéolos. Durante o transporte do pólen, as abelhas recorrem às suas características físicas,

como os pentes e pelos que possuem espalhados pelo corpo para evitarem a perda de pólen durante o raio de voo até à colmeia (Arruda, 2009).

Depois de pousar em várias flores, a abelha começa a recolher os grãos da sua cabeça, tórax e abdómen, transferindo-o com o auxílio das patas traseiras e intermediários para as corbículas (Figura 2).

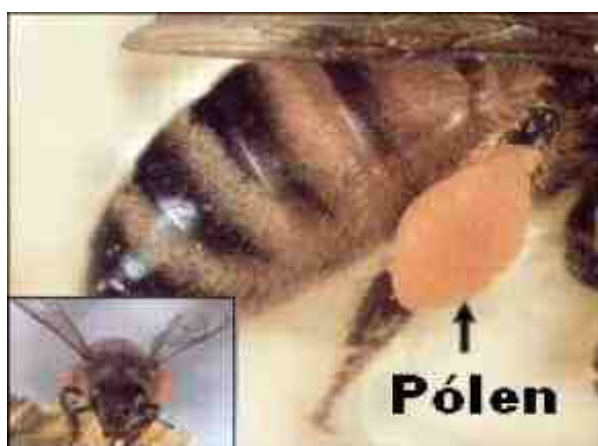


Figura 2. Abelha a colher pólen, com corbículas cheias de pólen (Fonte: Frigerio, 2009)

A seletividade das abelhas em relação às espécies vegetais está relacionada com a qualidade e a quantidade de recursos disponíveis, com vista a obter uma maior eficiência da recolha numa determinada área geográfica. As abelhas visitam uma ou varias espécies florais para um pólen completo, e as características específicas deste produto, estão ligadas às espécies florais e cultivares, visitadas pelas abelhas. A composição química dos grãos de pólen e o seu valor nutricional depende da “escolha” da planta polinizada pelas abelhas. O desenvolvimento das abelhas depende da sua alimentação, ou seja, do tipo de pólen, pois a sua origem botânica interfere na quantidade de vitaminas, proteínas, hidratos de carbono, minerais e açucares (Nogueira, 2012).

O pólen apícola é assim o resultado da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas, mais o acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel pelas abelhas, mas que no entanto na constituição geral não difere significativamente do pólen floral (Campos *et al.*, 2008).

A importância do pólen é indubitável, quer para a colónia quer para os produtos derivados da colmeia, de fato a quantidade e a qualidade do pólen estão diretamente relacionados com a produção de mel, cera e geleia real de um apiário (Nogueira, 2012).

2.3.1 Composição do Pólen Apícola

A composição do pólen varia de acordo com a sua origem botânica (Bogdanov, 2011c), condições ambientais, climáticas, geográficas, idade e estado nutricional da planta e estações do ano. O pólen apícola contém substâncias nutricionais como Hidratos de Carbono, Proteínas, Aminoácidos, Lípidos, Vitaminas e Minerais. Além disso, o pólen apícola apresenta também na sua constituição quantidades significativas de substâncias polifenólicas, principalmente na classe dos flavonóides (Carpes, 2008).

Segundo Campos *et al.* (2008), o pólen apícola apresenta grandes concentrações de açúcares redutores, aminoácidos essenciais e ácidos gordos insaturados e saturados, verifica-se também a presença de minerais como o Zinco, Cálcio, Ferro e uma alta taxa de potássio/sódio que tornam o pólen apícola um alimento com interesse para dietas humanas.

Carpes (2008) refere ainda que a composição mineral do pólen não depende somente da origem floral, mas também das condições de crescimento da planta, como o solo e a origem geográfica.

O pólen é recolhido pelas abelhas em espécies florais por elas seleccionadas, este vai conter uma pequena percentagem de açúcares derivados do mel (ou do néctar) que as abelhas misturam quando formam as cargas polínicas que transportam nas suas patas (FNAP, 2010).

A determinação da humidade presente no pólen pode ser realizada antes ou depois da secagem do pólen, isso depende dos critérios e objectivos de cada pesquisa e do investigador. Como é evidente a quantidade de humidade é muito superior em pólen natural antes de sofrer a secagem. Alguns países estabeleceram um mínimo de humidade para o pólen seco, que está muitas vezes relacionado com as temperaturas e humidade da região. A legislação no Brasil refere um máximo de 4g/100g, na Suíça e Polónia máximo 6g/100g, Uruguai máximo 8g/100g e na Bulgária vão até um máximo de 10g/100g (Campos *et al.* 2008).

No caso dos Hidratos de Carbono estes são os que estão presentes em maior quantidade no pólen.

Em geral a média dos valores reportados em relação à composição máxima do pólen variam de 7,7 a 35% de proteínas, 15-50% de açúcares, 18% de amido e 5 % de lípidos. Os ácidos gordos presentes no pólen são os ácidos mirístico, linoleico, oleico, esteárico e palmítico, sendo este último em maior quantidade. Todos os aminoácidos essenciais são encontrados no pólen estando a prolina presente em maior quantidade (Arruda, 2009).

Segundo Carpes (2008), o pólen apícola possui cerca de 15 a 30% de proteínas, onde parte está sob a forma de aminoácidos livres (10 a 13 %), 40% de açúcar total, 20-25% de açúcar redutor, 1,0 a 5% de lípidos, 3-5% de fibras e 2,5 a 3,5% de sais minerais.

2.3.2 Palinologia

Palinologia deriva dos radicais latinos *pollen*, *pulvis* (pó, farinha fina) e do grego *logos* (conhecimento, palavra), foi criada em 1945 por Hyde e Williams para designar o estudo morfológico do pólen e dos esporos, bem como das suas aplicações e dispersões.

Palinologia representa o ramo da botânica que estuda o pólen através do tempo e da morfologia (Arruda, 2008).

Na análise polínica classificam-se as espécies botânicas pelas características muito variadas das camadas que envolvem o grão de pólen, como formas ovóides, circulares, rugosas, lisas, segmentadas, entre outras (Nogueira, 2012).

Os grãos de pólen são microscópicos (da ordem de 0,01 a 0,2 mm) e têm formas variáveis e típicas para cada espécie vegetal (Hesse *et al*, 2009). Desta forma o trabalho de identificação do pólen baseia-se no reconhecimento da sua morfologia ao microscópio óptico (Figura 3) ou, mais raramente, ao microscópio electrónica de varrimento (Figura 4).

Sob a lente do microscópio, os grãos de pólen aparecem nas mais variadas posições, porém duas são básicas: a posição polar e a posição equatorial.

Os grãos de pólen variam quanto à forma, tamanho, cor, aparência, características morfológicas e por isso, podem ser utilizados para identificar o género das plantas e algumas vezes, as espécies vegetais (Nogueira, 2012).

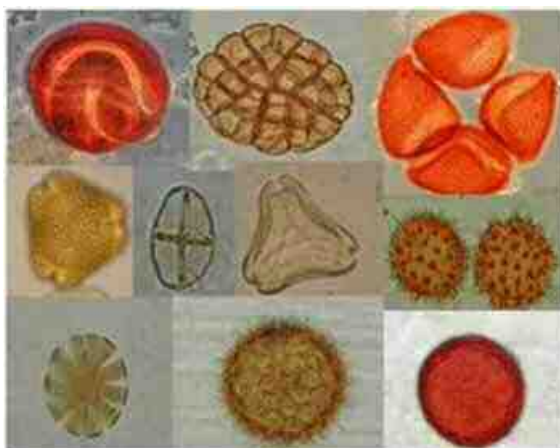


Figura 3. Grãos de pólen de várias espécies florais observados ao microscópio óptico. (Fonte: Loredo, 2013)

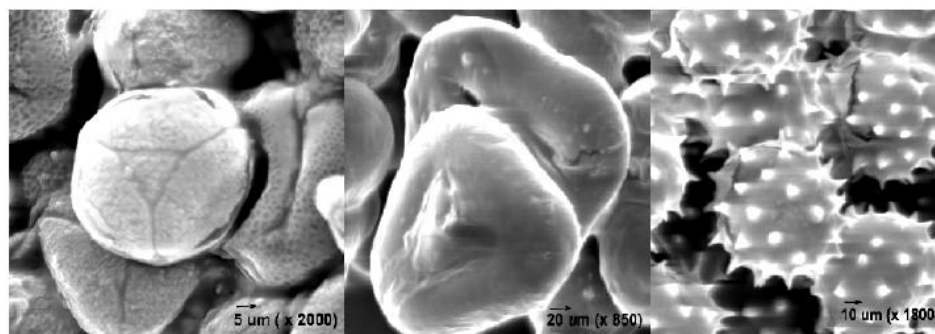


Figura 4. Grãos de pólen de várias espécies florais observados ao microscópio electrónico (Fonte: Nogueira, 2012)

Em relação à morfologia dos grãos de pólen a distinção entre grãos de pólen isolados ou agrupados é o primeiro passo para identificar as espécies vegetais a que pertencem. Como se pode observar na imagem Figura 5, quando por exemplo, se agrupam em tétrede os grãos de pólen podem apresentar vários arranjos.

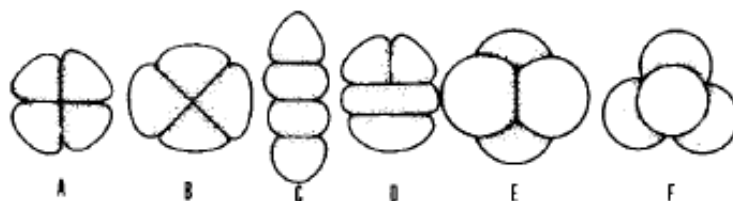


Figura 5. Tipos de arranjos de grãos de pólen na tétrede. (Fonte: Ramalho, s/d)

Para identificar os grãos de pólen tem-se ainda de ter em atenção a polaridade, simetria, forma e aberturas pois estas características permitem e ajudam a identificar as espécies vegetais.

Quando estão isolados, nem sempre é possível reconhecer os polos, isso ocorre com alguns grãos esféricos, chamados de grãos apolares. Nos grãos isolados, com polos e região equatorial bem definidos, os polos distal e proximal podem ser semelhantes denominados de grãos isopolares (com polos iguais), quando estes polos são diferentes, são denominados de grãos heteropolares.

Antes de atingir a maturidade, os grãos de pólen usualmente encontram-se reunidos em tétredes. Nesta fase é fácil definir o que se denomina “polaridade” dos grãos de pólen (Hesse *et al*, 2009).

Os grãos de pólen podem apresentar várias formas, quando observados no microscópio muitos grãos de pólen aparecem em duas posições bem definidas: a vista equatorial, onde vemos o equador de frente, e a vista polar, onde vemos o polo de frente.

As aberturas variam quanto ao número, forma, posição e estrutura, dependendo da espécie vegetal. Por isso, são importantíssimas na identificação dos grãos de pólen das diferentes espécies vegetais. As aberturas podem ser uma região mais estreita, da mesma espessura ou ainda mais grossa do que a área circunjacente da parede polínica (Hesse *et al*, 2009).

Existem diversas espécies botânicas devido à diversidade da flora apícola, mas provavelmente inúmeras espécies ainda não foram observadas pelo apicultor, investigador ou mesmo descritas na literatura científica.

Através da análise polínica é possível determinar a origem dos produtos da colmeia, como pólen, mel, cera, geleia real e própolis, contribuindo para a valorização destes produtos. Assim sendo, a identificação taxonómica e respetiva catalogação das espécies botânicas de uma determinada região são importantes para maximizar a utilização dos recursos disponíveis e identificar as fontes de alimento (Nogueira, 2012).

Segundo Nogueira (2012), no caso dos méis, a contagem e identificação dos pólenes permite identificar as plantas visitadas pelas abelhas na recolha do néctar possibilitando o reconhecimento sobre a origem geográfica dos méis, verificar a veracidade da origem floral declarada nas embalagens e diferenciar méis monoflorais de méis multiflorais.

2.3.3 Produção, Recolha e Armazenamento de Pólen Apícola

O pólen é recolhido dos apiários através do auxílio de uma ferramenta designada de capta-pólen que é colocada na entrada de voo no exterior da colmeia. Este utensílio pode ser constituído por diferentes materiais.

O que foi utilizado na recolha do pólen estudado foi um capta-pólen de madeira, visto que os apiários em questão se encontram em modo de produção biológica (Figura 6).



Figura 6. Capta-pólen de madeira

Desta forma, as abelhas ao entrarem na colmeia têm de passar por uma rede, cujos orifícios têm uma dimensão que não permite às abelhas entrarem na colmeia com as cargas polínicas que são transportadas pelas patas traseiras. Assim, elas vão cair, numa gaveta que se encontra na parte inferior do capta-pólen e de onde serão retirados pelo apicultor.

A colheita do pólen deve ser feita regularmente para facilitar a circulação de ar e evitar a humidade de modo a evitar a deterioração do pólen e crescimento microbiano (FNAP, 2010).

Os capta-pólenes só devem ser colocados quando as condições climatéricas forem favoráveis, e não houver prejuízo para a colmeia.

Segundo FNAP (2010), é recomendado que os capta-pólen sejam retirados 10 a 15 dias após a sua colocação, permitindo manter um equilíbrio no pólen colhido bem como naquele que passa para o interior da colmeia com o objectivo de responder às necessidades da criação. Ainda segundo este manual, alguns autores propõem um esquema de recolha que passa pela colocação dos capta-pólenes durante três semanas, retirando-os durante a quarta semana.

Numa situação ideal, a colheita de pólen pode atingir os 5 Kg por colmeia, mas alguns estudos apontam para produções até 1,5 Kg/colmeia/ano.

O transporte e processamento do pólen devem ser feitos o mais rápido possível, devendo-se ter alguns cuidados. Os equipamentos de transporte do pólen do campo devem ser fabricados em madeira e equipados com uma base que permita a ventilação do produto. Não devem ter uma altura superior a 13 cm, de forma a prevenir fenómenos de fermentação e de coagulação no pólen que é transportado.

Após a recolha do pólen este pode apresentar uma percentagem de humidade superior a 18%, pretendendo-se com a secagem que este teor baixe para valores próximos dos 6%. O pólen seco pode ser armazenado a temperaturas baixas durante um curto período de tempo (FNAP, 2010).

Se for o caso e houver necessidade, tanto o apicultor, como no estabelecimento transformador, podem proceder à congelação do pólen, de modo a aumentar a produtividade e realizarem a secagem apenas uma vez. No entanto no processo de congelação, segundo FNAP (2010) o ideal é que o pólen possa ser colocado em bandejas com capacidade máxima de 2,5 kg durante uma a duas horas, durante as quais deve ser mexido ou agitado, de forma a facilitar o congelamento e evitar a agregação das cargas polínicas. Posteriormente deve ser armazenado em câmaras congeladoras a temperaturas não superiores a -18°C e -20°C .

Segundo Carpes (2008), o pólen apícola deve permanecer congelado no mínimo 48 horas, para destruição de possíveis ácaros, ovos ou larvas de traças de cera e de outros insectos.

Quando se proceder à secagem o pólen deve ser descongelado à temperatura ambiente durante 3 a 4 horas, período após o qual deve ser introduzido no secador (Figura 7), onde permanecerá por um período de 12 a 48 horas.



Figura 7. Exemplo de um tipo de Secador de Pólen (Fonte: FNAP, 2010)

No secador a temperatura não deverá ultrapassar os 40°C e possuir sistema de ar forçado, devendo inclusivamente a sala de processamento estar equipada com um dispositivo capaz de retirar o excesso de humidade do meio ambiente.

Existem vários tipos de secadores, no entanto, o importante é que ao longo da secagem se proceda à rotação/mistura do pólen em vários sectores do secador, de forma a permitir a uma secagem homogénea do pólen, aumentando assim a eficiência do secador como a permitir a salubridade do produto (Carpes, 2008).

Após a secagem, procede-se à limpeza final do mesmo, podendo usar-se para esse efeito peneiras ou ventilação forçada. Esta pode ser manual, mediante o uso de pinças ou mecanizada. Depois de limpo e seleccionado o pólen pode ser embalado em sacos plástico, hermeticamente fechados, de capacidade variável (comércio a grosso), ou em embalagens de vidro de capacidade variável cujo destino será o comércio a retalho. Após esta etapa deverá ser feita a devida rotulagem do produto final (FNAP, 2010).

A preocupação dos consumidores com a qualidade dos alimentos tem vindo a aumentar, de modo a evitar qualquer dano ou risco para a sua saúde.

Um alimento seguro, é um alimento que, além de apresentar as propriedades nutricionais esperadas pelo consumidor, não lhe causa dano à saúde nem lhe tira o prazer que o alimento lhe tem a oferecer, isso pode ser obtido se forem seguidas correctamente as práticas denominadas “Boas Práticas de Fabricação” e pelas normas de HACCP (Análises de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos), estas normas

encontram-se estipuladas na ISO 22000:2005 e *Codex Alimentarius* (Almeida-Muradian *et al*, 2012).

As Boas Práticas de Fabrico são um conjunto de regras normalizadas, ou seja, os cuidados a ter na produção, manipulação e processamento dos produtos alimentares, neste caso do pólen apícola. Estas regras podem ser seguidas, segundo os pré-requisitos presentes na ISO 22000:2005, como referido anteriormente.

O Sistema HACCP é um sistema que avalia, identifica e controla os riscos considerados significativos para a segurança dos alimentos (Norma ISO 22000:2005). Este é um instrumento que auxilia os operadores das empresas do sector alimentar a alcançar padrões mais elevados de segurança dos géneros alimentícios (Reg. 852/2004).

O sistema HACCP pode ser aplicado e implementado desde a produção primária até ao produto final e tal como referido anteriormente é um sistema que tem como objectivo avaliar todas as etapas de processamento de um produto alimentar e identificar possíveis riscos ou perigos que possam colocar em risco a inocuidade do produto alimentar e consequentemente a saúde do consumidor.

Este sistema vai assim identificar possíveis perigos (biológicos, químicos e físicos) que possam ocorrer no processo de produção e da mesma forma encontrar soluções e acções correctivas de forma a minimizá-los a valores aceitáveis ou mesmo a eliminá-los.

A segurança dos géneros alimentícios é resultado de vários factores: a legislação que deve determinar os requisitos mínimos de higiene, os controlos oficiais que devem ser instaurados para verificar a cumprimento por parte dos operadores integrantes de empresas do sector alimentar e o modo de como estes deverão criar e aplicar programas de segurança dos géneros alimentícios e processos baseados nos princípios HACCP (Reg. 852/2004).

Segundo o Decreto-Lei nº 1/2004 de 2 de Janeiro, o mel ou outros produtos apícolas destinados ao consumo humano só podem ser comercializados se forem provenientes de produção primária ou estabelecimento aprovados nos termos do presente Decreto-Lei e nas condições do mesmo estabelecidas. Em relação à rotulagem indica ainda que os produtos finais devem ter o número do registo quando sejam provenientes de produção primária e a marca de identificação de salubridade bem como o país de origem.

Desta forma o apicultor deve ter em atenção determinadas regras aquando da manipulação do pólen. No entanto, para que este seja de qualidade o apicultor deve começar pela sanidade animal, ou seja, deve ter cuidado permanente no tratamento das abelhas contra doenças, nomeadamente varrose, higienização das respectivas colmeias, alimentação dos enxames com produtos seguros e de qualidade, utilização de ceras de qualidade, entre outros.

No que concerne à recolha de pólen, este devia ser colhido diariamente pois esse facto evita a deposição de alguns perigos físicos no pólen, nomeadamente vestígios de

poeiras, restos de abelhas (patas, asas) e vestígios de outros animais gulosos como as formigas.

Ainda para garantir a qualidade do pólen apícola, sempre que este é exposto a dias chuvosos (humidade) devia ser eliminado, deve-se ter em atenção à higienização de todos os instrumentos em contacto com o produto no momento da colheita, luvas de campo e indumentária do apicultor, as embalagens de recolha e transporte do pólen fresco devem ser previamente higienizadas e secas. O tempo de recolha e transporte até à unidade de processamento deve ser suficiente de modo a manter a salubridade do produto (Almeida-Muradian *et al*, 2012).

Portugal carece de legislação referente ao pólen apícola, por isso torna-se importante o conhecimento de padrões referentes à sua composição. Apenas alguns países como o Brasil, Espanha, França, Suíça, Argentina, Uruguai e Bulgária possuem limites para os parâmetros de qualidade e reconhecem legalmente o pólen como um complemento alimentar (Nogueira, 2012 e Campos *et al.*, 2008).

Já foram feitas várias tentativas de projectos de investigação que pudessem depois sugerir uma legislação para este produto em Portugal, mas nenhuma das propostas submetidas chegou a ser financiada, o que tem impedido que se faça uma directiva de legislação consolidada no nosso país.

O conhecimento da composição física e química do pólen contribui para garantir a qualidade do produto final, sendo importante para tudo o que se venha a fazer no futuro para valorizar e regular este produto

Segundo PAN (2010), a produção mundial de pólen situa-se na ordem das 1500 toneladas anuais, sendo que a Espanha é o maior produtor mundial (constituindo a principal origem do pólen comercializado em Portugal), seguida da China, da Austrália e da Argentina. Do ponto de vista do comércio mundial a Espanha, a China, a Argentina e a Hungria são os maiores exportadores mundiais e os EUA, o Reino Unido, a Alemanha, a França e a Itália são os principais importadores mundiais.

2.3.4 Propriedades Funcionais do Pólen Apícola

O pólen apícola apresenta diferentes componentes biológicos, entre os quais derivados de ácidos fenólicos e compostos polifenólicos, glicosídeos principalmente flavonóides. Os flavonóides são metabolitos secundários, que têm diferentes e importantes actividades farmacológicas. Estes possuem diversas propriedades biológicas tais como a antioxidante, a anti-inflamatória, a actividade antitumoral entre outros (Bogdanov, 2011a).

O grupo dos fitosteróis também é muito importante e estão presentes no pólen, sendo a actividade biológica mais importante o efeito redutor do colesterol no sangue bem como as propriedades imunológicas e anti-inflamatórias.

A actividade antibacteriana também aparece por vezes associada ao pólen. Campos *et al.* (2010), isolaram flavonóides de vários pólenes apícolas como, por exemplo, de *Eucalyptus globulus*, *Ranunculus sardous* e *Ulex europeus*, e verificaram que a herbacetina e derivados, tinham um efeito antibiótico sobre a *Pseudomonas aeruginosa*. O mesmo não se verificou em derivados de quercetina presentes no pólen de *Eucalyptus globulus*.

Em estudos realizados com pólen turco sobre 13 bactérias patogénicas diferentes também se analisou um efeito inibidor sobre as bactérias em questão.

De acordo com Bogdanov (2011c), pólenes recolhidos da flora apícola do Brasil, e extraídos com 80% de etanol revelaram actividade antimicrobiana em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp.*

O pólen apresenta propriedades antioxidantes, segundo Campos *et al.* (2010) que estudaram algumas espécies de pólen. Não foi possível provar uma relação entre a bioactividade do pólen e os compostos fenólicos. Verificou-se também que a actividade antioxidante de pólen de abelha é específica da espécie e independente da sua origem geográfica ou ano da colheita. A capacidade de reacção com radicais livres diminui com o armazenamento do pólen à temperatura ambiente e podem perder cerca de 50% do poder antioxidante em 1 ano.

Como referido anteriormente, o pólen tem propriedades antiinflamatórias. Foram testadas a actividade antiinflamatória e antinociceptiva de extractos de pólen de flor de pinheiro em ratinhos, os quais apresentaram resultados positivos (Campos *et al.*, 2010).

A função mais importante do pólen em medicina poderá ir a ser a sua capacidade o nível de doenças da próstata, acaso os benefícios se venham a provar e o risco seja baixo (Campos *et al.*, 2010).

Também para este produto se referenciam a actividade hepatoprotectora e a actividade anti-radiação. Quanto à primeira os ensaios decorreram com ratos intoxicados, e foi verificada a diminuição específica de carbaril e pesticidas, que tinham sido administrados previamente nos animais (Bogdanov, 2011b).

Através de outros estudos realizados verificou-se que o pólen poderá vir a ter um efeito sobre diminuição da anemia. Observou-se que em ratos e camundongos com anemia, após a ingestão por via oral de 10g/Kg/dia de pólen houve a inibição do sistema hematopoiético e a redução de células brancas. A ingestão de pólen de abelhas por ratos induziu um aumento significativo de células vermelhas no sangue. Foram realizados mais testes com ratos saudáveis e ratos com anemia, onde se verificou que o grupo tratado com 10g/Kg/dia de pólen multifloral ganhou peso, aumento dos níveis de hemoglobina e diminuição do número de plaquetas (Campos *et al.*, 2010).

Outros autores estudaram ainda efeitos positivos da ingestão de pólen na redução e prevenção de osteoporose. Num estudo recente, observou-se que o extracto aquoso de pólen de *Cistus ladanifer* tem efeito inibitório sobre a reabsorção óssea em ratos e

tecidos femorais. Este mesmo extracto de pólen também apresentou um efeito estimulante sobre a formação óssea *in vitro* (Campos *et al.*, 2010).

O pólen tem propriedades antialérgicas, apesar do pólen atmosférico ser conhecido por causar reacções alérgicas, existem resultados prometedores de que o pólen poderá vir a ser utilizado para evitar estas alergias. Segundo Campos *et al.* (2010), recentemente foi provado que o pólen de abelha pode dessensibilizar contra a febre dos fenos e reacções alérgicas, apesar de haver alegações sobre este facto desde há muito tempo. Outros estudos têm sido realizados para comprovar o efeito antialérgico do pólen, os quais tem mostrado resultados positivos.

De acordo com FNAP (2010), o pólen é um fortificante natural que possui diferentes indicações terapêuticas, sendo conhecidas algumas propriedades relacionada com o consumo regular deste alimento. Nomeadamente estimula o organismo, podendo prevenir infecções bacterianas, regula as funções fisiológicas, contribuindo para o reequilíbrio do metabolismo, contribui para o fortalecimento de doenças convalescentes, pessoas fatigadas ou debilitadas, enfraquecidas ou intoxicadas, o seu consumo é recomendado em casos de anemia e fadiga intelectual, descalcificação e raquitismo, bom regulador intestinal, e alguns autores referem que poderá contribuir para a redução de estados de impotência sexual e ajudar a combater o envelhecimento prematuro e na prevenção da hipertrofia da próstata.

Porém nenhuma destas actividades está provada e dada a enorme variedade de origens florais de onde provém o pólen (algumas tóxicas) o consumo deve ser sempre muito bem ponderado e se possível acompanhado por um clínico de modo a evitar efeito secundários que daí possam vir a ocorrer em especial se a pessoa estiver doente ou a consumir medicamentos. Interações com estes últimos já foram reportadas e a mistura deve ser avaliada antes de se fazer o uso concomitante de pólen apícola e medicamentos.

2.3.5 Presença de Minerais no Pólen

A quantidade de minerais presentes no pólen depende do tipo de pólen (Campos *et al.* 2008). Estes compostos fazem parte integrante da composição do pólen, no entanto em pequena quantidade. Os principais minerais são o potássio (K), cerca de 60% do total do teor de minerais, o Magnésio (Mg) que constitui cerca de 20%, Sódio (Na) e Cálcio (Ca) que ocupam cerca de 10 % do total do teor de minerais. Os elementos Fósforo (P) e Enxofre (S) também fazem parte dos minerais presentes no pólen, no entanto em menor quantidade (Campos *et al.* 2008 e Arruda, 2009).

Segundo Arruda (2009) encontram-se ainda no pólen alguns vestígios de minerais como o Alumínio (Al), Boro (B), Cloro (Cl), Cobre (Cu), Iodo (I), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Silício (Si), Titânio (Ti) e Zinco (Zn).

Na tabela 1 estão representados alguns minerais presentes no pólen bem como a dose diária recomendada.

Tabela 1. Composição do Pólen em Minerais (DDR- Dose Diária Recomendada)

Minerais	mg em 100g	% DDR/ 15g de pólen	DDR (mg/dia)
Potássio (K)	400-2000	5-27	2000
Fósforo (P)	80-600	2-26	1000
Cálcio (Ca)	20-300	0,5-7	1100
Magnésio (Mg)	20-300	2-23	350
Zinco (Zn)	3-25	10-79	8,5
Manganês (Mn)	2-11	15-85	3,5
Ferro (Fe)	1,1-17	2-37	12,5
Cobre (Cu)	0,2-1,6	4-36	1,2

(Fonte: Adaptado de Campos *et al.*, 2010)

Segundo Araújo (2012), os minerais podem ser classificados de três formas distintas: minerais como o Sódio, Potássio, Cálcio, Ferro, Cobre, Níquel e Magnésio são denominados como elementos essenciais, pois são necessários ao metabolismo biológico de organismos vivos (em miligramas).

Os minerais como o Arsênico, Chumbo, Cádmio, Mercúrio, Alumínio, Titânio, Estanho e Tungstênio são classificados como micro-contaminantes ambientais, tóxicos ou não essenciais, pois não são necessários ao organismo em quantidade nenhuma.

O Crómio, Zinco, Ferro, Cobalto, Manganês e Níquel são designados de elementos essenciais ao organismo mas em pequenas quantidades, visto que, se estas quantidades forem excedidas podem-se tornar tóxicos.

As áreas reservadas à apicultura vão passando por processos de degradação de habitats, levando à exposição de determinados organismos a poluentes atmosféricos provenientes de gases lançados pelos tubos de escape dos automóveis, de chaminés de fábricas, siderurgias, minerações, aterros sanitários entre outros (Magalhães, 2010).

Existem determinadas espécies animais ou vegetais que são consideradas como bioindicadores que nos servem para informar das condições ambientais de um dado local (Magalhães, 2010). As abelhas estão nesse grupo pelo facto de serem extremamente sensíveis a alterações climáticas que se deve ao facto de possuírem um sistema imunitário muito sensível.

Os insectos polinizadores, nomeadamente as abelhas melíferas prestam um serviço ambiental muito importante por serem um dos vectores mais importantes dos serviços de polinização.

As plantas que crescem em zonas contaminadas absorvem parte desses contaminantes que se vão alojar em determinadas partes das plantas, nomeadamente no pólen. Desta forma os contaminantes entram num processo de dispersão e podem vir a ser integrados na cadeia alimentar (Paulo *et al.*, 2010).

O pólen entre outros produtos apícolas são bons exemplos de bioindicadores, sendo estes produtos utilizados para estudos que envolvem monitorização de poluição ambiental (Magalhães, 2010).

A presença destes metais pesados nos produtos das abelhas pode ocorrer devido à origem geográfica e botânica, bem como dos fatores antropogénicos no local das colmeias.

As abelhas na procura de néctar, pólen e própolis dentro do raio de voo entram em contacto com diferentes ambientes, com plantas, água, ar e solo como se pode observar na Figura 8, deste modo onde existe contaminação ambiental as abelhas também se contaminam ou recolhem matéria-prima contaminada que posteriormente levam para a colmeia. Nesse processo os produtos apícolas mudam a sua composição bem como a sua qualidade (Magalhães, 2010).

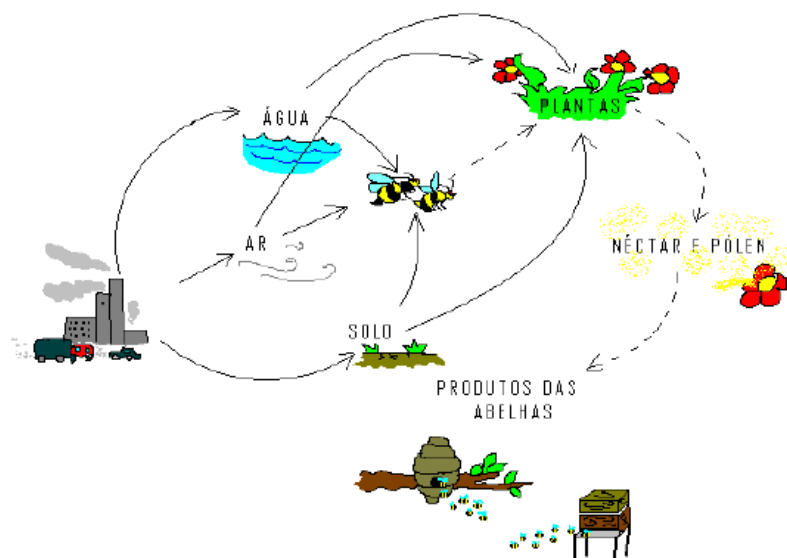


Figura 8. Fontes antropogênicas e naturais de metais pesados nos produtos das abelhas. Fonte: (Magalhães, 2010).

Os metais pesados, presentes nos produtos apícolas, em níveis acima dos estabelecidos pela legislação, representam uma ameaça para os seres humanos em função dos efeitos negativos e cumulativos de tais contaminantes para o organismo (Magalhães, 2010).

Os teores de metais pesados e outros minerais encontrados nas amostras de pólen apícola podem indicar os níveis de poluição ambiental e a origem geográfica do mel (Magalhães, 2010).

O chumbo e cádmio são considerados os principais metais pesados tóxicos e aqueles que são mais frequentemente estudados. O chumbo está presente no ar, proveniente dos tubos de escape dos veículos a motor e consegue contaminar o ar e depois o néctar e pólen. Este metal pesado não é transportado pelas plantas. O cádmio é proveniente das indústrias de metais e incinerações e é transportado do solo para as plantas e depois para o néctar e pólen (Bogdanov, 2006).

Em Portugal, não existe ainda legislação em relação à presença de metais pesados no pólen apícola. No entanto, em outros géneros alimentícios, de acordo com o regulamento CE 1881/2006, CE 629/2008 e EU 420/2011 fixam apenas limites máximos para o Cádmio (1,0 mg/kg) e para o Chumbo (1,5 mg/kg).

Segundo Campos (2008), os metais pesados como o Cádmio não deve estar presente no pólen em quantidades superiores a 0,03 mg/Kg, o Chumbo a 0,5 mg/kg e o Mercúrio a 0,01 mg/Kg.

3. Compostos Fenólicos e Polifenólicos

Flavonas e flavonóis são os tipos de flavonóides mais encontrados no pólen. Os flavonoides fazem parte de um grupo particular de metabolitos secundários, os compostos polifenólicos. Os metabolitos secundários são compostos orgânicos produzidos pelos vegetais, aparentemente sem função directa no seu crescimento e desenvolvimento, em processos como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de hidratos de carbono, proteínas e lípidos (Ferreira *et al.*, 2008).

Surgem essencialmente na forma glicosilada ao nível das folhas, flores e frutos e outros tecidos das plantas, como o pólen (Lins *et al.*, 2003).

Os que existem geralmente nos alimentos são os ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas e taninos (Ferreira *et al.*, 2008).

A nível químico podem ser definidos como substâncias simples que possuem pelo menos um anel, contendo um ou mais grupos hidroxilo, ou seus derivados funcionais (Ferreira *et al.*, 2008) ou substâncias poliméricas complexas tais como taninos. A maioria dos polifenóis são conjugados com um ou mais resíduos de açúcar, geralmente a glicose ou a rutinose bem como outros açúcares nomeadamente galactose, ramnose e arabinose. A conjugação com os ácidos orgânicos, lípidos e outros fenóis também se têm verificado (Arruda, 2009).

O composto mais simples é o fenol que está representado na Figura 9.

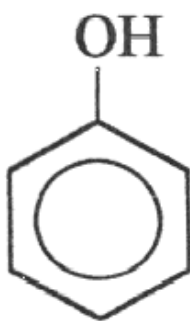


Figura 9. Estrutura química de um fenol simples (Fonte: Cruz, 2008)


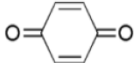
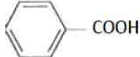
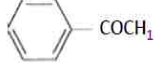
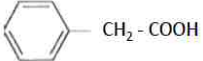
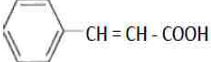
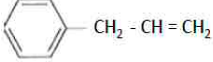
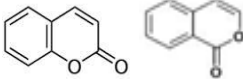
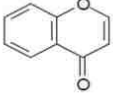
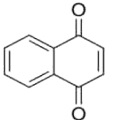
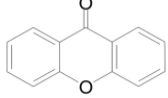
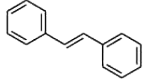
A maior parte dos compostos fenólicos não são encontrados na natureza no seu estado livre, mas sob a forma de heterósídeos, sendo por isso solúveis em água e em solventes orgânicos polares.

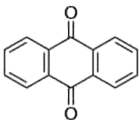
Estes podem formar pontes de hidrogénio sendo por isso tanto intramoleculares quanto intermoleculares.

Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, luz, calor ou em meio alcalino originando o escurecimento de soluções de compostos isolados (Carpes, 2008).

Na Tabela 2 está representada a classificação de compostos fenólicos de acordo com o número de carbonos segundo Harbonne em 1989.

Tabela 2. Classificação dos Compostos Fenólicos


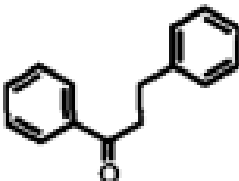

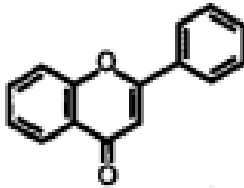
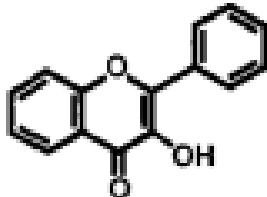
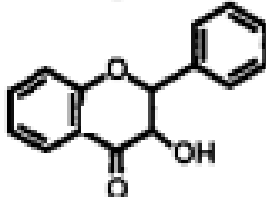
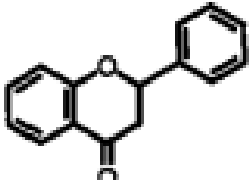
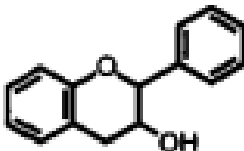
Classe de compostos fenólicos	Esqueleto Básica	Estrutura Básica
Fenóis Simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos Fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Ácido fenilacético	C ₆ -C ₂	
Ácido hidroxicinâmico	C ₆ -C ₃	
Fenilpropeno	C ₆ -C ₃	
Cumarinas, Isocumarinas	C ₆ -C ₃	
Cromonas	C ₆ -C ₃	
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	

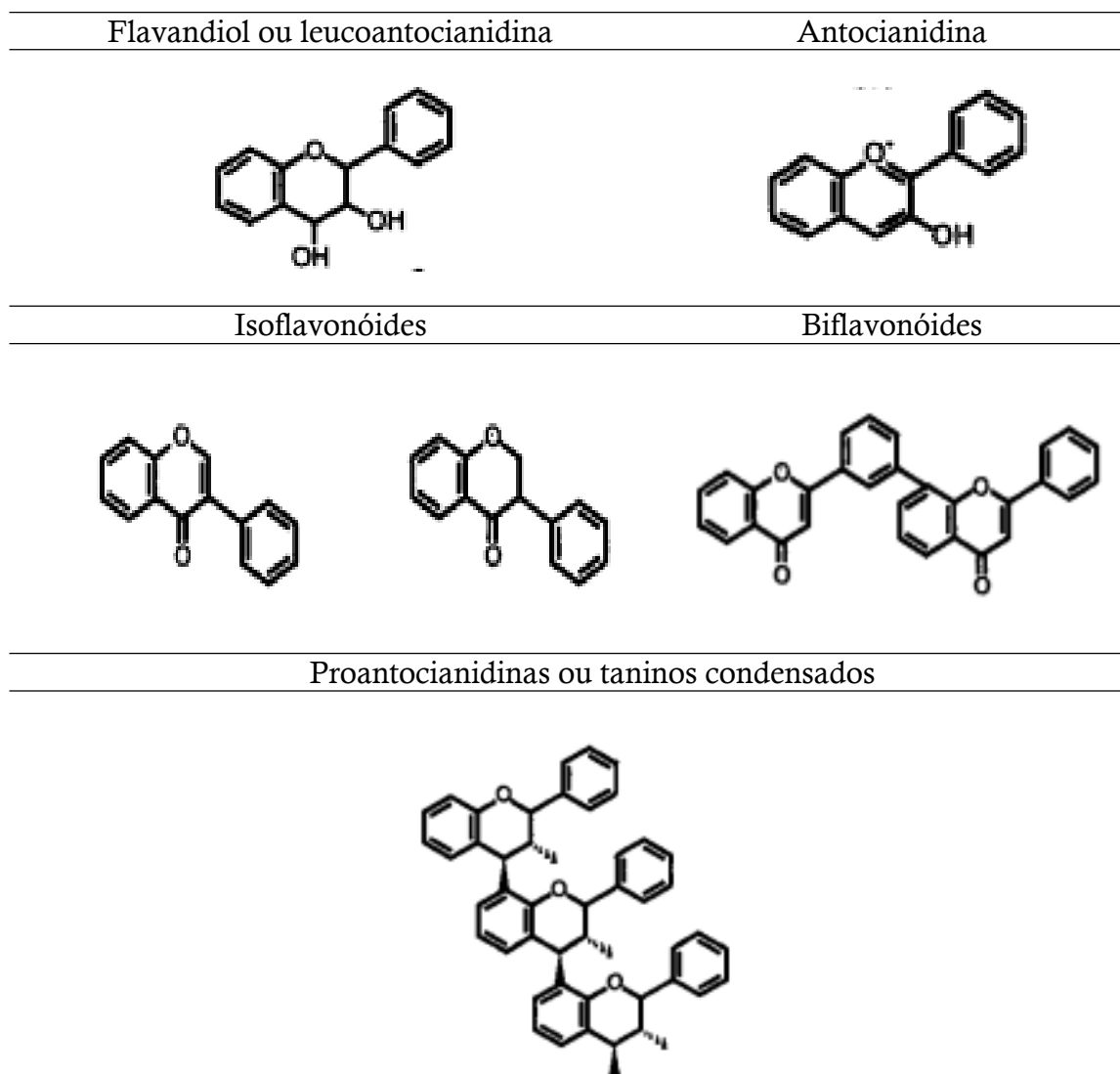
Antroquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonóides	$C_6-C_3-C_6$	Ver tabela 3
Lignanós	$(C_6-C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$	

(Fonte: Bravo, 1998)

De acordo com Bravo (1998), na tabela 3 estão representados compostos polifenólicos presentes nos alimentos em 13 categorias diferentes.

Tabela 3. Classificação dos flavonóides

Chalconas	Di-hidrochalconas
	
Auronas	Flavonas
	
Flavonol	Di-hidroflavonol
	
Flavononas	Flavan-3-ol
	



(Fonte: Bravo, 1998)

3.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos incluem três grupos principais nomeadamente os derivados do ácido benzóico que são constituídos por sete átomos de carbono, sendo estes os mais simples encontrados na Natureza (Lianda, 2009), os derivados do ácido cinâmico constituídos por nove átomos de carbono e por último as cumarinas que são derivados do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral dos ácidos *o*-cumárico (Carpes, 2008), embora raramente se incluam neste grupo e apareçam na maioria da bibliografia como um grupo separado de compostos fenólicos (Cunha e Campos, 2005).

Alguns frutos e vegetais contêm muitos ácidos fenólicos livres, embora eles também possam existir nas sementes são mais frequentes na polpa e na casca. Estes compostos encontram-se na Natureza sob a forma de combinações, do tipo éster ou

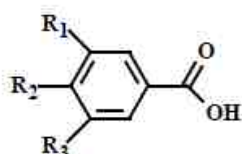
sob a forma de glicósidos. O ácido clorogénico, éster do ácido cafeico e do ácido quinico é a combinação mais frequente (Carpes, 2008).

Como muitas vezes se encontram ligados a outras estruturas químicas, só podem ser libertos ou hidrolisados mediante a hidrólise ácida ou alcalina ou através de enzimas (Tsao, 2010).

No mel, os ácidos fenólicos dominantes são os ácidos gálicos e *p*-cumárico, sendo que o ácido cafeico, ferúlico, elágico e clorogénico, siríngico, vanílico e *p*-hidroxibenzóico são constituintes minoritários (Gomes, 2009). No pólen aparecem derivados de vários destes ácidos fenólicos sendo mais frequentes os do ácido cafeico (Campos, 1997).

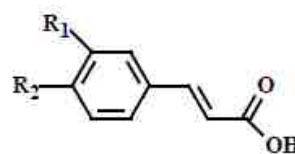
Na Figura 10 estão apresentadas as estruturas químicas de alguns dos principais compostos fenólicos encontrados em alimentos. Devem ser feitas distinções entre os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos. Além dessa diversidade estrutural, os polifenóis podem estar associados ainda, com hidratos de carbono, ácidos orgânicos e com outros fenóis (Lianda, 2009).

ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS



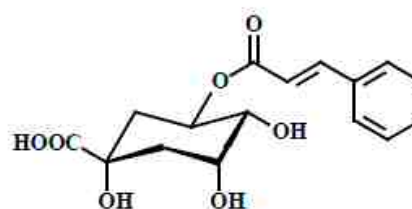
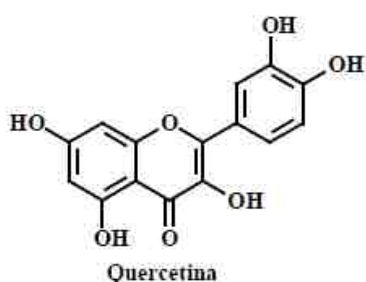
$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$; Ácido protocatecuico
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$; Ácido gálico

ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS



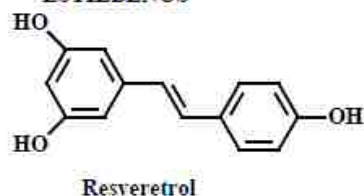
R_1 ou $R_2 = \text{OH}$; Ácido cumárico
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$; Ácido cafeico
 $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}$; Ácido ferúlico

FLAVONOL



Ácido clorogénico

ESTILBENOS



LIGNANAS

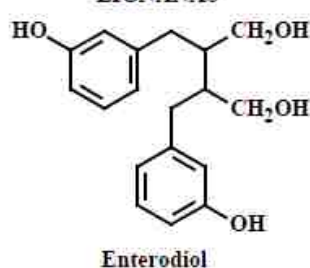


Figura 10. Exemplos de estruturas de polifenóis mais encontrados em alimentos (Fonte: Lianda, 2009)

3.2 Flavonóides

Os flavonóides estão presentes em várias plantas, no entanto, são mais abundantes nas angiospérmicas. Estes encontram-se nas folhas e pétalas e também são frequentemente encontradas nos frutos, raízes e sépalas.

A principal função dos flavonóides nas plantas é atrair insectos para ajudar na polinização e na dispersão de sementes por causa da sua cor brilhante e padrões (Carpes, 2008), por exemplo as antocianinas produzem a cor rosa, vermelho, violeta, lilás e azul das flores, frutas e legumes (Março *et al.*, 2008).

Os flavonóides são o grupo mais importante dos compostos fenólicos nos alimentos.

Já foram identificados mais de 4000 tipos de flavonóides em plantas vasculares, estes podem variar devido às condições e variações de crescimento e maturidade das plantas.

As plantas têm evoluído na produção de flavonóides com o objectivo de se protegerem contra parasitas, fungos, patogénicos e de lesões celulares oxidativas (Cook, 1996).

Os flavonóides são substâncias de baixo peso molecular. A sua estrutura mais comum é o difenil propano ($C_6-C_3-C_6$) que consistem em dois anéis aromáticos interligados por 3 carbonos e um átomo de oxigénio que geralmente formam uma estrutura heterocíclica oxigenada (Bravo, 1998), denominado núcleo flavana (Figura 11).

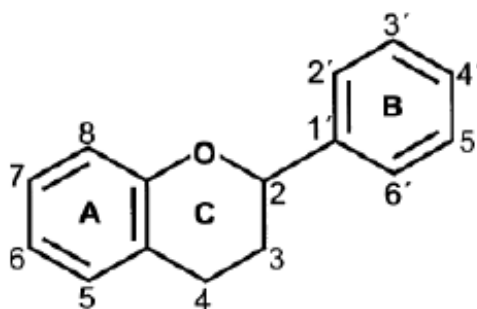


Figura 11. Núcleo Flavana, estrutura genérica dos flavonoides (Fonte: Cruz, 2008)

Como se pode verificar na Figura 11, os três anéis fenólicos são referidos como A, B e C (ou pirano) (Cruz, 2008) e é usado um sistema de numeração para diferenciar as posições dos carbonos ao redor dos flavonóides, utiliza números ordinários para os anéis A e C e para o anel B é usado o número ordinal seguido de um apóstrofo (Carpes, 2008).

Para os flavonóides em que o anel não é formado, a numeração no anel A é seguido de apóstrofo e os carbonos que unem os anéis A e B são denominados α e β em relação ao carbonilo, como se pode verificar na figura 12 (Carpes, 2008).

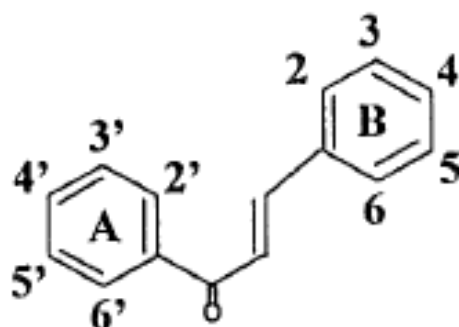


Figura 12. Numeração de um flavonoide sem anel C. (Chalcona) (Fonte: Cook, 1996)

Os flavonóides possuem uma estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6, e são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano. A Figura 13 apresenta a estrutura química dos principais tipos de flavonóides (Março *et al.*, 2008).

As actividades bioquímicas dos flavonóides e dos seus metabólitos dependem das estruturas químicas e da orientação das várias posições da molécula (Março *et al.*, 2008).

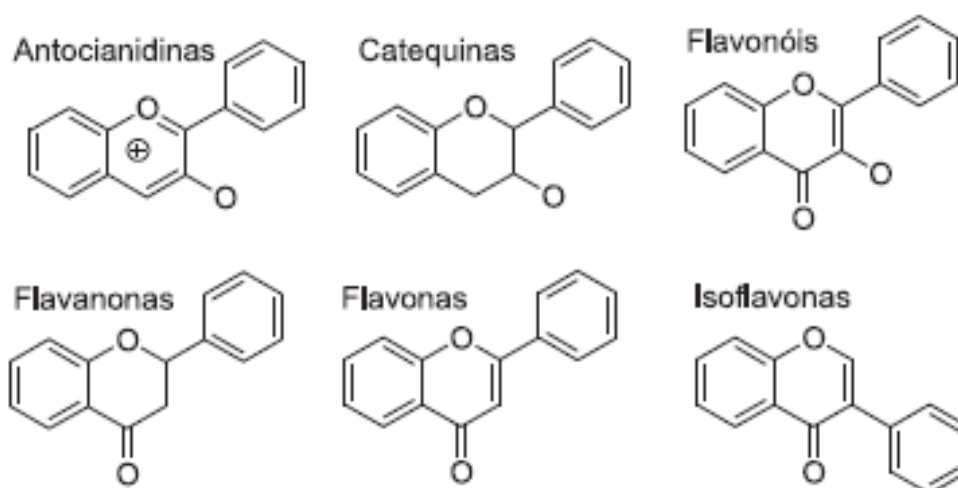


Figura 13. Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (Fonte: Março *et al.*, 2008).

As classes dos flavonóides variam na estrutura característica ao redor do anel C e são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não deste anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxilo a ele ligado (Carpes, 2008).

Segundo Carpes (2008), os flavonóides e os isoflavonóides, de acordo com os pontos de substituição e de insaturação podem formar flavonas, flavanonas, flavonóis, dihidroflavonóis isoflavonóis e compostos a estes relacionados.

Nos flavonóides as estruturas básicas são as agliconas (Tsao, 2010).

As flavonas e flavonóis apresentam na sua estrutura uma dupla ligação entre o C-2 e C-3, sendo ambos diferenciados pela presença ou ausência de um grupo hidroxilo na terceira posição nos flavonóides.

4. Material e Métodos

4.1 Amostragem

O pólen apícola utilizado neste trabalho foi colhido em dois apiários localizados em Dornelas do Zêzere. Esta aldeia está situada no concelho de Pampilhosa da Serra, Distrito de Coimbra (Figura 15). É uma aldeia que se situa geograficamente no limite do Concelho de Pampilhosa da Serra, e ligada ao concelho do Fundão, Distrito de Castelo Branco, pelo que, a flora característica destes apiários está relacionada com a flora melífera das duas regiões (Pampilhosa da Serra e Fundão-Zona do Pinhal) que são muito semelhantes ou mesmo iguais nas zonas limítrofes.



Figura 14. Localização geográfica dos Apiários

A região de Dornelas do Zêzere apresenta-se confinada por importantes cursos de água, nomeadamente o rio Zêzere entre outros e pelos seus respectivos vales e

encostas íngremes, onde predominam terrenos incultos com uma grande biodiversidade de espécies com elevado potencial apícola, das quais se destacam o medronheiro (*Arbutus unedo*), urze ou queiró (*Calluna vulgaris*), a carqueija (*Chamaespartium tridentatum*), a esteva (*Cistus ladanifer*), o estevão (*Cistus populifolius*), a estevinha (*Cistus salvifolius*), a giesta amarela (*Cytisus striatus*), o trovisco (*Daphne gnidium*), a soagem (*Echium sp.*), as urzes (*Erica umbellata*, *Erica australis*), o eucalipto (*Eucalyptus globulus*), o tojo-molar (*Genista triacanthos*), os sargaços (*Halimium alyssoides* e *Halimium ocymoides*), sempre-viva-do-monte ou capelinhas (*Helichrysum stoechas*), rosmaninho (*Lavandula pedunculata*) espécie melífera por excelência, a azinheira (*Quercus ilex spp. rotundifolia*), a silva (*Rubus ulmifolius*) e o tojo (*Ulex minor*) (Agreste e Bem-Haja, 2003). Além das espécies atrás mencionadas, não podemos esquecer de todas as variedades de árvores de frutas que são cultivadas na região, nomeadamente figueiras, ameixoeiras, macieiras, laranjeiras, cerejeiras, oliveiras, videiras, entre outros. Na Figura 15 pode ver-se uma parte da flora apícola de Dornelas do Zêzere.



Figura 15. Flora apícola em Dornelas do Zêzere: A) *Arbutus unedo*; B) *Cistus ladanifer*; C) *Calluna vulgaris*; D) *Ulex minor*; E) *Erica australis*; F) *Genista triacanthos*; G) *Echium sp.*; H) *Halimium alyssoides*; I) *Daphne gnidium*; J) *Cistus salvifolius*; K) *Cytisus striatus*; L) *Eucalyptus globulus*; M) *Helichrysum stoechas*; N) *Rubus ulmifolius*; O) *Lavandula stoechas*

Foram recolhidas três amostras de pólen de cada apiário, um de Vale Grande (VG) (Figura 16) e outro do Caniçal (C) (Figura 17).



Figura 16. Apiário de Vale Grande



Figura 17. Apiário do Caniçal

As três amostras foram recolhidas em datas diferentes: a primeira colheita em 20 de Maio de 2012, a segunda em 14 de Julho de 2012 e a última em 12 de Setembro de 2012.

Após a recolha, as amostras foram imediatamente congeladas a uma Temperatura de cerca de -20°C e posteriormente secas em estufa a 40°C . A secagem do pólen apícola como referido anteriormente é um processo de extrema importância pela conservação e segurança deste produto que, quando colhido, tem uma humidade relativa entre 25-30%. Segundo Campos *et al.* (2008) valores entre 4 a 8% são considerados adequados, não só para evitar o crescimento de bactérias mas também para manter as características organolépticas adequadas.

Após esta etapa, em cada amostra os grãos de pólen foram separados por cores (Figura 18, 19 e 20) e posteriormente identificados por códigos de acordo com o local de colheita, data e cor do pólen (Tabela 4).



Figura 18. Grãos de pólen separados por cores, 20 Maio 2012: a) Caniçal, b) Vale Grande.



Figura 19. Grãos de pólen separados por cores, 14 Julho 2012: a) Caniçal, b) Vale Grande.



Figura 20. Grãos de pólen separados por cores, 12 Setembro 2012: a) Caniçal, b) Vale Grande.

Tabela 4. Identificação de cada amostra de acordo com o local, data de colheita e cor do pólen

Local	Data da colheita	Cor Pólen	Código
Caniçal	20 Maio 2012	Laranja	C1_1
		Amarelo	C1_a
		Branco	C1_b
Vale Grande	20 Maio 2012	Laranja	VG1_1
		Amarelo escuro	VG1_ae
		Amarelo Claro	VG1_ac
		Amarelo	VG1_a
		Branco	VG1_b
Caniçal	14 Julho 2012	Verde escuro	C2_ve
		Verde Claro	C2_vc
		Amarelo	C2_a
Vale Grande	14 Julho 2012	Verde Escuro	VG2_ve
		Amarelo	VG2_a
Caniçal	12 Setembro 2012	Branco	C3_b
		Laranja	C3_1
Vale Grande	12 Setembro 2012	Branco	VG3_b

4.2 Determinação da Análise Polínica

Para a preparação das amostras para posterior análise polínica procedeu-se da seguinte forma:



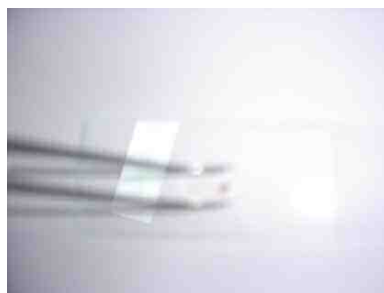
1º- Com um conta-gotas retirou-se umas gotas do preparado de frutose



2º- Colocou-se as gotas numa lâmina



3º- Com uma pinça retirou-se um grão de pólen de cada amostra



4º- Colocou-se o grão de pólen na lâmina e Identificou-se cada lâmina



5º- Com o auxílio de um filete desfez-se o grão de pólen e deixou-se secar



6º- Após a secagem da preparação colocou-se com o auxílio de uma espátula gelatina glicerinada em cada lâmina



7º- Derreteu-se a gelatina com uma placa



8º- Após a gelatina derreter, colocou-se a lamela. Deixou-se secar cada preparação e observou-se cada amostra ao microscópio óptico, em várias ampliações

4.3 Determinação dos Compostos fenólicos por HPLC /DAD (High Pressure Liquid Chromatography / Diode Array Detector)

A técnica do HPLC/DAD tem-se mostrado muito eficaz na identificação da origem floral do pólen recolhido pelas abelhas. Este método foi complementado pela técnica da microscopia e pela cor que apresenta cada grão de pólen e permite a quantificação e identificação do pólen predominante numa amostra multifloral e o nível de pólen individual.

O solvente utilizado foi a solução etanólica a 50% pois segundo Campos (1997) é possível extrair a maioria dos tipos de flavonóides e de derivados de ácidos fenólicos existentes no pólen obtendo-se um perfil completo dos mesmos.

O método de cromatografia líquida de alta pressão utilizado neste trabalho foi aplicado pela primeira vez ao estudo de produtos apícolas em 1990 por Campos *et al* onde se verificou que estes produtos eram ricos em compostos fenólicos especialmente flavonóides (Campos, 1997).

Neste método utiliza-se um cromatografo onde são injectadas as amostras em estudo. Esse equipamento é composto por duas bombas modelo 305 e 306, e um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável, modelo 116. A separação dos flavonóides fez-se com uma coluna Hibar Lichrosorb RP₁₈ 5mm (25x0,5 di) e um gradiente de água destilada, acidificada com ácido orto-fosfórico (pH 2,6 e microfiltrada por filtros Milipore 0,22 µ) e acetonitrilo.

Os resultados obtidos para cada amostra foram analisadas pelo programa Unipoint onde se puderam estudar os perfis cromatográficos que funcionam como impressão digital da planta e os respectivos espectros (Campos, 1997).

Para a preparação dos extractos procedeu-se inicialmente à pesagem dos grãos de pólen, com o auxílio de uma balança (Figura 21a). Pesou-se uma carga polínica de cada amostra de pólen apícola e colocou-se num vial. Após o registo dos pesos adicionou-se a cada amostra uma solução etanólica a 50% numa proporção de 10mg de pólen para 1 ml de solvente (Tabela 5), posteriormente estas foram agitadas no vortex (Figura 21b). As amostras dos diferentes *taxa* foram colocadas em ultra-sons durante 30 minutos (Figura 21c).

Após este tempo os vials foram colocados numa centrífuga a 4800 rpm durante 5 minutos (Figura 21d). Quando se retiraram as amostras verificou-se que cada vial tinha um precipitado e um sobrenadante. Deste modo retiraram-se 180 µl de sobrenadante para vials devidamente identificados. Colocaram-se as amostras no autosampler (Figura 21e).

Os dados recolhidos durante a análise HPLC/DAD foram seguidamente minuciosamente estudados (Figura 21f).

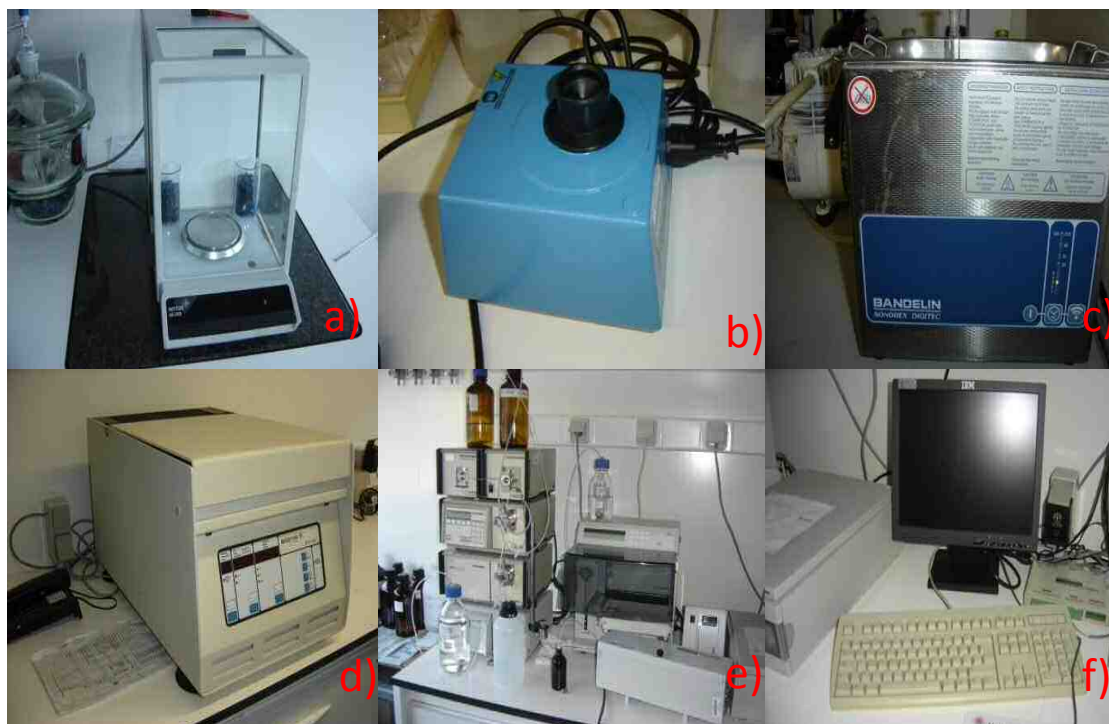


Figura 21. Equipamentos usados para a preparação e análise dos extractos: a) balança; b) agitador; c) ultra-sons; d) centrífuga; e) autosampler e f) computador.

Tabela 5. Peso dos grãos de pólen de cada amostra e quantidade de solução etanólica a 50% adicionada

Amostra	Peso Grão de Pólen (mg)	Solução etanólica a 50% Adicionada (μ l)
C1_1	4,43	443
C1_a	8,80	880
C1_b	4,10	410
VG1_1	7,57	757
VG1_ae	11,28	1128
VG1_ac	4,50	450
VG1_a	9,33	933
VG1_b	6,30	630
C2_ve	3,87	387
C2_vc	10,60	1060
C2_a	4,15	415
VG2_ve	7,92	792
VG2_a	7,70	770
C3_b	6,46	646
C3_1	7,25	725
VG3_b	5,83	583

4.4 Determinação do teor de Minerais

A determinação dos minerais foi realizada no laboratório de físico-química do CATAA (Centro de Apoio Tecnológico Agro - Alimentar) e os custos suportados por Verba CERNAS - centro de estudos de recursos naturais ambiente e sociedade, financiado pela FCT – Fundação para ciência e tecnologia.

Deste modo o método descrito é o utilizado nesse laboratório e apresentado por Paulo *et al*, (2012). Segundo esses autores, para a determinação dos minerais as soluções padrão utilizadas foram preparadas em 0,1% (v/v) de ácido nítrico por diluição dos padrões individuais a uma concentração de 1,000 mg.L⁻¹ (Prolabo, TITRINORM). Para o controlo de qualidade utilizou-se uma solução padrão multi-elementos de 100 mg.L⁻¹ (SCP science). O ácido nítrico a 65% (Merck) e o peróxido de hidrogénio a 30% (Prolabo) utilizados foram de grau analítico adequado.

Cerca de 200 mg de amostra seca foram digeridos com uma mistura de HNO₃ (10% v/v) e H₂O₂ (30% v/v) num bloco de digestão (Digiprep MS) aquecido a 100°C, durante 12 h. A mistura foi aquecida até que a digestão fosse completa. O resíduo final foi diluído para 50 ml com HNO₃ (10% v/v) e posteriormente filtrado. De seguida as amostras foram analisadas utilizando a espectrometria de emissão atómica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES-Activa M, Horiba Jobin Yvon), com potência no plasma de 1000 W, fluxo de gás no plasma 15 L.min⁻¹, fluxo de Ar no nebulizador 0,02 L min⁻¹ e pressão Ar 1,0 bar. Os comprimentos de onda analíticos (nm) utilizados foram os seguintes: Cd (228,802), Cr (205,571), Cu (327,395), Fe (259,940), Mn (257,611), Pb (283,305) e Zn (213,857).

A determinação da concentração dos diferentes metais pesados foi calculada com base na reta de calibração cujos limites de quantificação (LOQ) para cada um dos metais analisados estão referidos na Tabela 6.

Tabela 6. Limite de quantificação para os diferentes metais pesados analisados

Elemento	LOQ (mg/kg)
Cd	0,01
Cr	0,50
Cu	0,10
Fe	1,00
Mn	0,10
Pb	1,00
Zn	1,00

5. Resultados e Discussão dos Resultados

Na colheita realizada a 20 de Maio de 2012 no apiário do Caniçal, verificou-se que após a separação do pólen por cores o lote que apresentava maior quantidade foi o de cor laranja enquanto que os lotes de pólenes de cor amarelo e branco apresentavam-se em menor quantidade. Na amostra do Vale Grande, o lote de pólen de cor laranja era muito superior aos restantes lotes de cor amarelo escuro, amarelo, amarelo claro e branco que surgiram em menor quantidade.


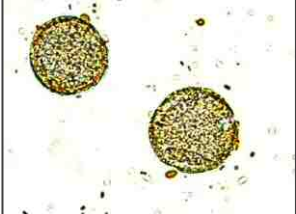


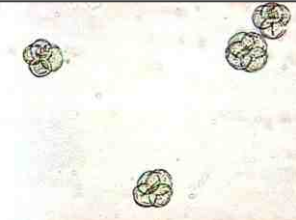







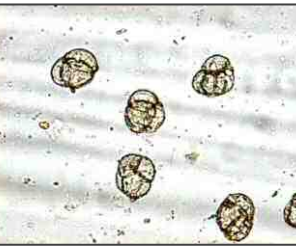




Nas amostras do apiário do Caniçal na segunda colheita, 14 de Julho de 2012, verificou-se que o lote de pólen em maior quantidade foi o de cor verde-escuro e os pólenes verde-claro e amarelo foram minoritários. No Vale Grande a amostra representativa foi a de pólen verde-escuro, sendo um lote inferior a quantidade de pólen de cor amarelo.

Na colheita de 12 de Setembro de 2012, as amostras de pólen após a separação por cores, verificou-se que no apiário do Caniçal a quantidade do lote de pólen branco era muito superior à do lote de cor amarelo e no Apiário do Vale Grande a amostra de pólen era apenas de cor branca.

5.1 Análise Polínica e Determinação da Origem Floral

A determinação dos *taxa* presentes no pólen utilizado neste trabalho foi efectuado através da identificação microscópica dos grãos de pólen e posterior comparação com bibliografia e base de dados de imagens/fotografias de pólenes apícolas e florais reconhecidos por outros autores, bem como a flora apícola dos apiários em questão nas datas de colheita. Na Tabela 7, estão representados os resultados das amostras do Caniçal, nomeadamente a data de colheita, fotografias das amostras de pólen apícola, respectivos resultados obtidos por microscopia óptica e fotografia da flor bem como a sua identificação.

Tabela 7. Amostras do apiário do Caniçal: Fotografias das amostras de pólen apícola; respectivos resultados obtidos por Microscopia óptica; fotografia da flor.

Data colheita	Pólen apícola	Microscopia do pólen apícola (ampliação 200X)	Taxon
20 Maio 2012			 <i>Cistus ladanifer</i> L.
20 Maio 2012			 <i>Erica australis</i>
14 Julho 2012			 <i>Rubus ulmifolius</i>
14 Julho 2012			Não identificado
12 Setembr o 2012			 <i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull
12 Setembr o 2012			 <i>Calendula arvenses</i>

Assim, acordo com a Tabela 7, podemos concluir que as amostras de pólen de coloração amarela e laranja da primeira colheita (20 de Maio de 2012) são ambas da

mesma espécie, ou seja, são pólenes de *Cistus ladanifer* L. e as amostras de pólen de coloração branca são de *Erica australis* L..

A *Cistus ladanifer* L. tem como nome vulgar xara, chara ou esteva, pertence à família *Cistaceae* e é classificada como um arbusto. Apresenta as flores brancas com uma mancha púrpura na base. Encontra-se distribuída por toda a Península Ibérica principalmente em zonas de influência mediterrânica. É uma flor com pouca produção de néctar e muita produção de pólen. O calendário de floração desta espécie é do mês de Fevereiro a Junho (Agreste Lda e Bem-Haja, 2003).

A *Erica australis* L. pertence à família *Ericaceae*, tendo como nome vulgar urze-vermelha, é classificada como um arbusto e apresenta as flores de rosa-avermelhada. Está distribuída por toda a Península Ibérica e noroeste de África e é uma flor produtora de bastante néctar, no entanto pouca produtora de pólen. Esta espécie floresce desde o mês de Dezembro ao mês de Maio (Agreste Lda e Bem-Haja, 2003).

Na colheita de 14 Julho 2012 podemos verificar que a amostra de pólen de cor verde-escuro e verde-claro são da mesma espécie floral, *Rubus ulmifolius*. Além da análise polínica, a afirmação de as amostras serem de *Rubus ulmifolius* confere com a flora apícola maioritária do apiário em questão na data da colheita. Esta variação de cor clara e escura por vezes está apenas relacionada com o teor de humidade presente no pólen, dando um tom mais intenso quando a humidade é menor e uma coloração menos intensa quando a humidade é presente em maior quantidade.

A *Rubus ulmifolius* pertence à família *Rosaceae* e o nome vulgar é silva, silvado ou silveira, a flor é de cor rosada ou branca e é classificada como um arbusto. A sua distribuição é muito ampla, pela Europa central e ocidental. Esta espécie é bastante produtora de néctar e pólen. O calendário de floração é de Maio a Julho (Agreste Lda e Bem-Haja, 2003).

A amostra de pólen de coloração amarela não foi possível de identificar.

Na terceira colheita (12 Setembro de 2012) podemos concluir que as amostras de pólen branco são de *Calluna vulgaris* (L) Hull. Este resultado confere com a flora apícola da região, uma vez, que esta é das poucas zonas onde a espécie cresce e floresce levando a que seja uma das zonas a conseguir fazer duas crestas por ano e produzir mel de magoriço.


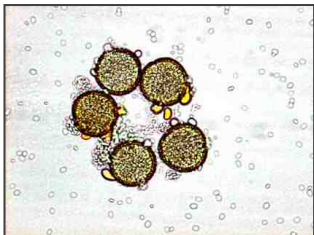





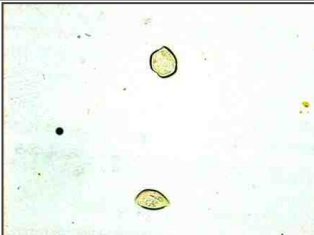

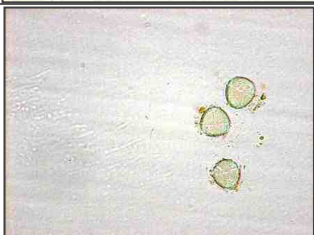


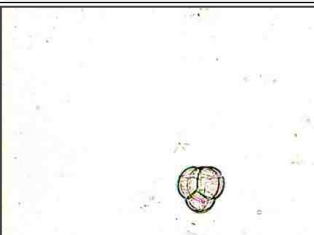

A *Calluna vulgaris* (L) Hull, pertence à família *Ericaceae*, o seu nome vulgar é urze, magoriça, queiró ou torga e a flor é branca, cor-de-rosa ou púrpura e é classificada como um arbusto. Está distribuída pelo norte e ocidente da Península Ibérica e um pouco por todo o lado. Esta espécie é grande produtora de néctar, mas pouco produtora de pólen. Floresce de Setembro a Março (Agreste Lda e Bem-Haja, 2003).









A amostra de pólen laranja é possível que corresponda a *Calendula arvenses*, como se pode verificar nos resultados obtidos por microscopia óptica, este pólen é muito particular deste *taxon*, além disso esta conclusão é reforçada pela flora apícola na data de colheita.

A *Calendula arvenses* pertence à família *Asteraceae*, o seu nome vulgar é calêndula ou maravilhas, a flor é de cor amarelo e é classificada como um arbusto. Está distribuída por toda a Europa e é uma planta anual.

Na Tabela 8, estão representados os resultados das amostras do Vale Grande, nomeadamente a data de colheita, fotografias das amostras de pólen apícola, respectivos resultados obtidos por microscopia óptica e fotografia da flor bem como a sua identificação.

Tabela 8. Amostras do apiário do Vale Grande: Fotografias das amostras de pólen apícola; respectivos resultados obtidos por Microscopia óptica; fotografia da flor.

Data colheita	Pólen apícola	Microscopia do pólen apícola (ampliação 200X)	Taxon
20 Maio 2012			 <i>Cistus ladanifer</i> L.
20 Maio 2012			 <i>Ulex europeaus</i> L.
20 Maio 2012			Não identificado
20 Maio 2012			 <i>Ulex europeaus</i> L.
20 Maio 2012			 <i>Erica autralis</i>

14 Julho 2012			
			<i>Rubus ulmifolius</i>
14 Julho 2012			
			Não Identificado
12 Setembr o 2012			
			<i>Calluna vulgaris</i> (L) Hull

De acordo com a tabela acima apresentada, verifica-se que na colheita realizada a 20 Maio 2012, o pólen de cor laranja é de *Cistus ladanifer* L., o pólen branco é de *Erica australis* enquanto que o pólen amarelo claro e amarelo são de *Ulex europeaus*. Já o pólen de cor amarelo escuro (VG_ae) não foi possível de identificar.

A *Ulex europeaus*, pretence à família *Fabaceae*, o seu nome vulgar é tojo e a flor é amarela é classificada como um arbusto. É espontâneo em todas as províncias do Litoral Atântico e Europa ocidental. Esta espécie é grande produtora de néctar e de pólen. Floresce de Dezembro a Maio (Agreste e Bem-Haja, 2003 e Campos, 1997).

Na segunda colheita pode-se verificar que o pólen verde é de *Rubus ulmifolius*. A amostra designada de VG2_a, ou seja, o pólen de coloração amarelo não foi possível identificar. No entanto, podemos referenciar que a espécie designada de C2_a e a espécie VG2_a, ambas pólenes de cor amarelo são a mesma, uma vez que, através da microscopia óptica (Figura 8) podemos observar que os pólenes com a mesma ampliação apresentam formas, cor e dimensões iguais. Na colheita de 12 Setembro 2012 observa-se que a amostra de pólen branco é de *Calluna vulgaris* (L) Hull.

5.2 Compostos fenólicos

O pólen apícola como referido anteriormente é uma matriz rica em compostos fenólicos, os quais são considerados os maiores responsáveis das várias actividades biológicas do pólen (Campos *et al.*, 2003 e Silva *et al.* 2006).

A determinação e confirmação dos *taxa* presentes nos pólenes utilizados neste trabalho foi realizada, além da microscopia óptica, como atrás mencionado, por análise em HPLC/DAD dos extractos etanólicos, comparando os perfis fenólicos obtidos com os existentes e publicados em trabalhos anteriores.

A identificação das estruturas e dos espectros foi realizada por comparação com bibliografia de outros autores e aplicando as regras teóricas apresentadas na obra de Campos e Markham (2007).

Deste modo os perfis de HPLC/DAD dos compostos fenólicos obtidos nas três colheitas do Caniçal estão a seguir representados.

Na figura 22, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Cistus ladanifer* L. e na Tabela 9, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 23, observam-se os espectros dos compostos encontrados.

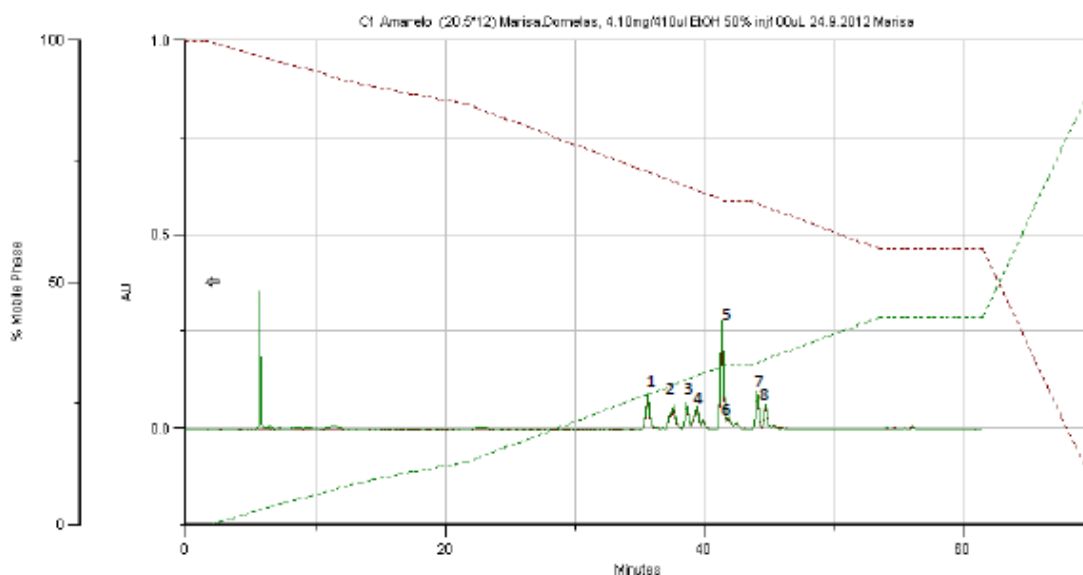


Figura 22. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola *Cistus ladanifer* L. (Caniçal)

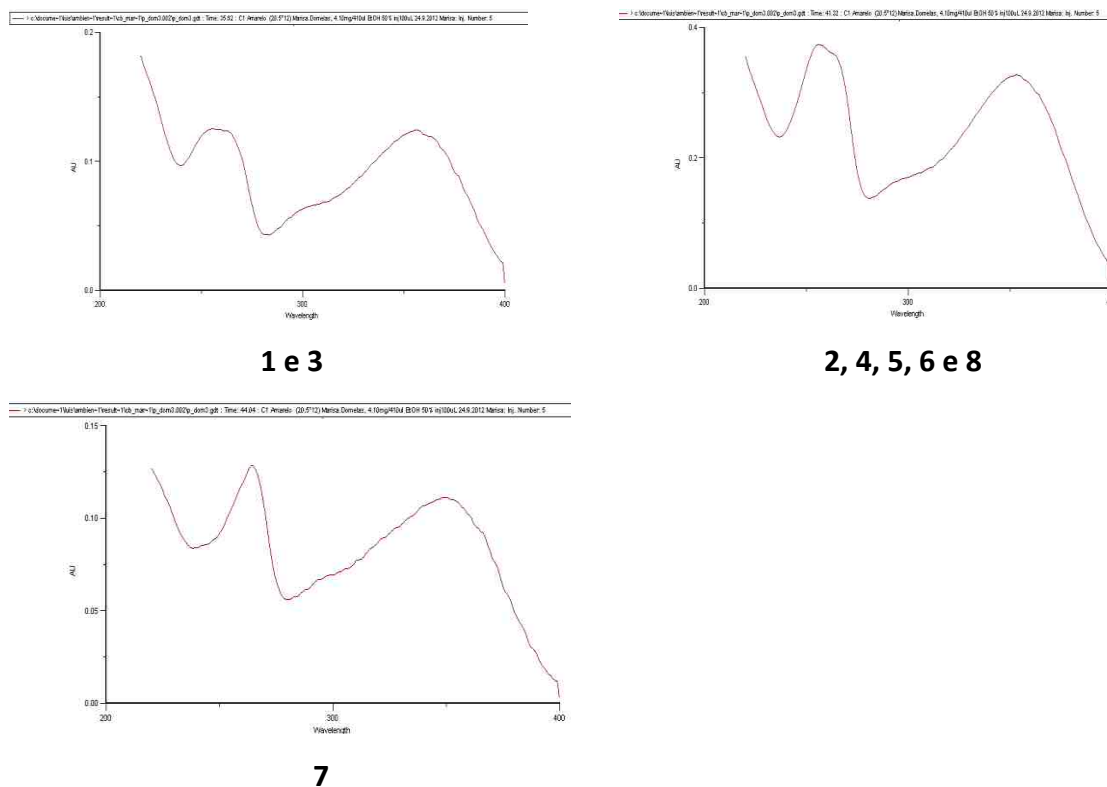


Figura 23. Espectros de DAD dos compostos Fenólicos de *Cistus ladanifer* L.(Caniçal)

Tabela 9. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Cistus ladanifer* L. (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1 e 3	35,62; 38,57	miricetina-3-O- derivados	
2, 4-6 e 8	37,56; 39,37; 41,32; 41,90 e 44,66	quercetina-3-O- derivados	
7	44,04	canferol-3-O-R	

Como se pode ver no perfil de HPLC (Figura 22), este apresenta 8 compostos predominantes correspondentes a 8 flavonóides, sendo o de maior relevância o pico 5 correspondente ao composto maioritário. Como se pode observar na Tabela 9, os compostos 1 e 3 são derivados de miricetina e por isso apresentam o mesmo espectro UV, uma vez que, só mudam nos substituintes em C3 que podem ser açúcares diferentes e daí haver alteração no tempo de retenção e manter-se a absorção. Os compostos 2, 4, 6 e 8 são derivados de quercetina, apresentam o mesmo espectro e diferentes tempos de retenção, estes só mudam nos substituintes em C3. O composto 7 é um canferol-3-*O* também substituído com açúcar ou açúcares em C3.

Após a análise do perfil de HPLC dos compostos fenólicos da Figura 22 com o cromatograma tipo dos compostos fenólicos encontrados na *Cistus ladanifer* L. (Figura 24) de Campos (1997) observam-se semelhanças, tanto no número de picos apresentados como através dos espectros dos compostos.

Desta forma, e com o reforço da microscopia óptica do pólen com ampliação a 200x, podemos concluir que a espécie analisada é de um *Cistus ladanifer* L..

Na tabela 10, estão apresentados outros flavonóides que foram encontrados no estudo realizado por Campos (1997), também eles heterósidos da miricetina, quercetina e canferol.

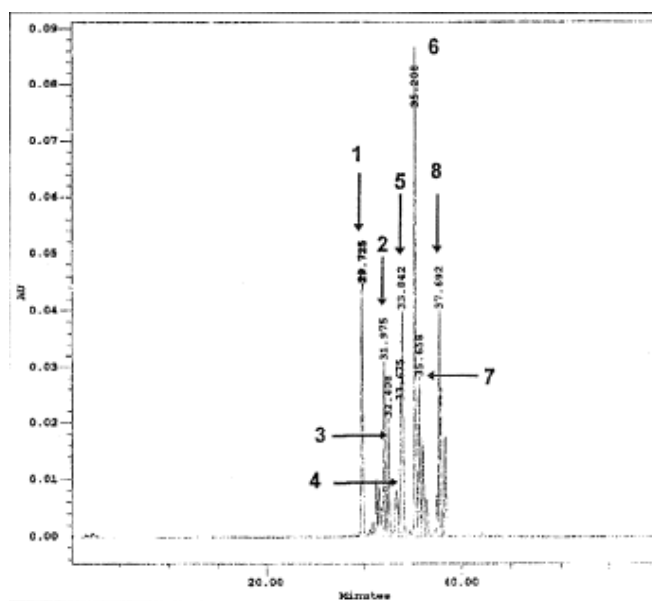


Figura 24. Cromatograma tipo dos compostos fenólicos encontrados na *C. ladanifer* L. (imagens reproduzidas de Campos, 97, com autorização do autor)

Tabela 10. Flavonóides encontrados em *C. ladanifer* L.

Composto n°	Flavonóide	Tempo de retenção (min)
1	Miricetina-3- <i>O</i> -(6- α -L-ramnosil-D-glucósido)	29,6
2	Miricetina-3- <i>O</i> - β -glucósido	31,9
3	Quercetina-3- <i>O</i> -(6- β -D-xilosil-D-glucósido)	32,4
4	Canferol-3- <i>O</i> -(α -L-ramnosil-2- β -glucósido)	33,6
5	Quercetina-3- <i>O</i> - β -glucósido	33,8
6	Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido-7- <i>O</i> -L-ramnósido	35,2
7	Canferol-3- <i>O</i> - β -glucósido	35,9
8	Derivado do canferol -3- <i>O</i> -R (R=arabinósido?)	37,7

(Fonte: Campos et al, 1997)

A *Cistus ladanifer* L. tem um vasto leque de flavonóides, o que não acontece em outros géneros estudados. Entre eles os vários heterósidos da miricetina, da quercetina e do canferol (Campos, 1997), como referido anteriormente.

Os resultados obtidos para o pólen designado por C1_a, lote de pólen de cor amarela, colhida na primeira amostra do apiário do Caniçal foram os mesmos que o pólen acima apresentado, levando a concluir que ambas as espécies são a mesma, um *Cistus ladanifer* L.. Esta conclusão é reforçada pela análise polínica.

Na figura 25, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Erica australis* L. e na Tabela 11, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 26, observam-se os espectros dos compostos.

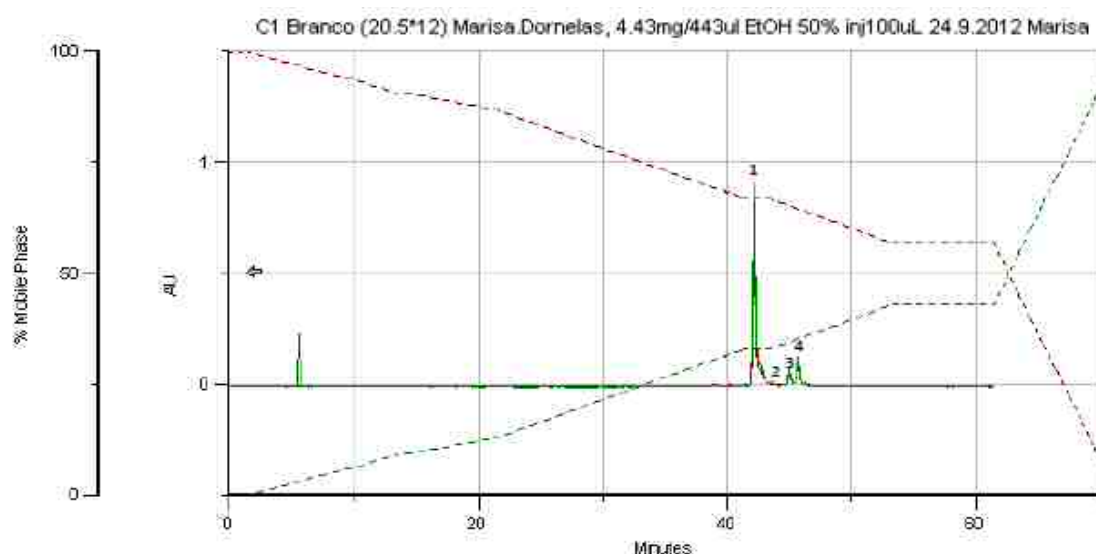


Figura 25. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola *Erica australis* L. (Caniçal)

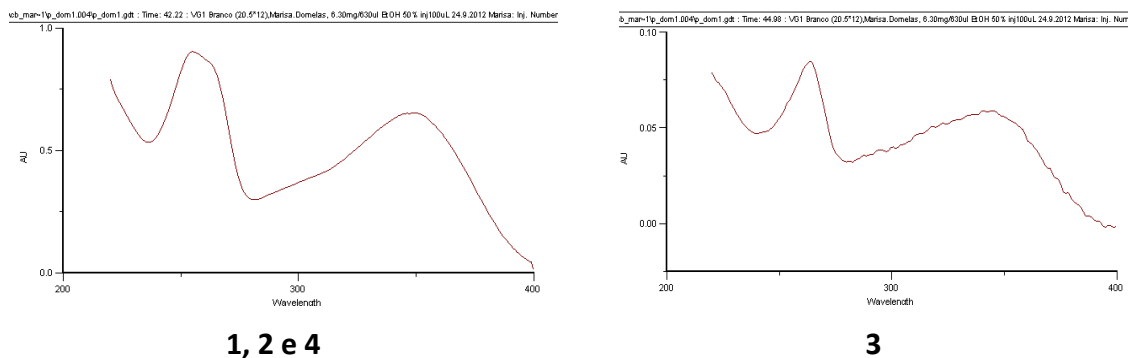


Figura 26. Espectros DAD dos compostos Fenólicos de *Erica australis* L. (Caniçal)

Tabela 11. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Erica australis* L. (Caniçal) com respectivos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1, 2 e 4	42,22; 42,64; 45,67	quercetina-3- <i>O</i> -derivado	
3	44,98	canferol-3- <i>O</i> -derivado	

Após a análise do perfil de HPLC dos compostos fenólicos apresentado na Figura 25, verifica-se que este apresenta quatro picos, sendo o pico 1 o maior, o que sugere a presença deste composto em maior quantidade sendo que os restantes três compostos estão presentes em menor quantidade na espécie analisada.

Através dos espectros presentes na Figura 26 e da Tabela 10, verifica-se que os compostos fenólicos identificados foram derivados de quercetina-3-*O*-R, para os compostos 1, 2 e 4 e o composto 3 identificado como um canferol-3-*O*-derivado.

Desta forma, bem como através da Tabela 7, podemos concluir que a espécie em questão é uma *Erica australis* L.

Segundo o trabalho realizado por Campos (1997), através dos espectros dos compostos fenólicos maioritários de *Erica australis* L., a autora identificou os compostos quercetina, derivado de canferol e um canferol-3-*O*-ramnósido.

Na figura 27, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Rubus ulmifolius* e na Tabela 12, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 28, observam-se os espectros dos compostos.

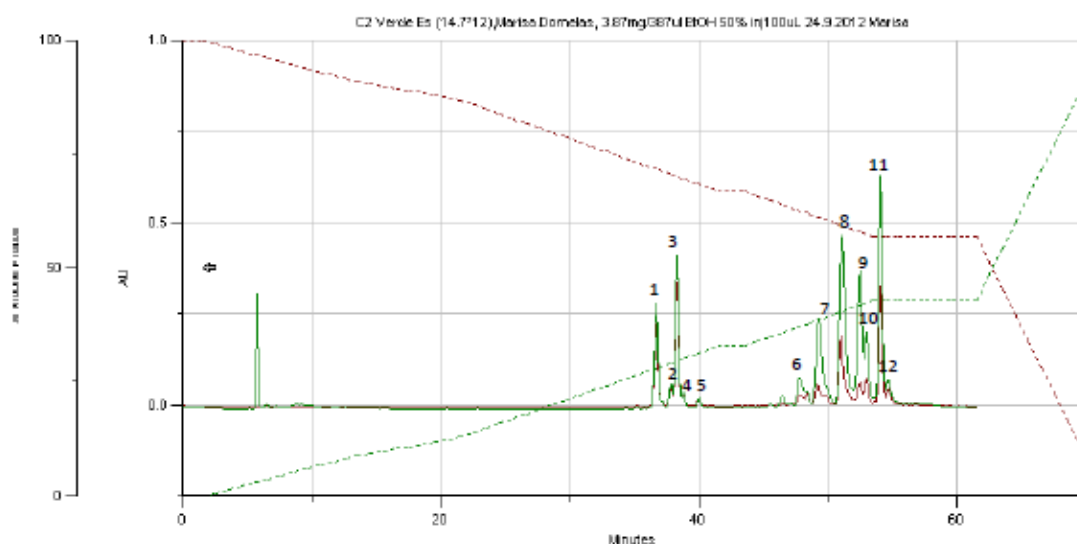


Figura 27. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de *Rubus ulmifolius* (Caniçal)

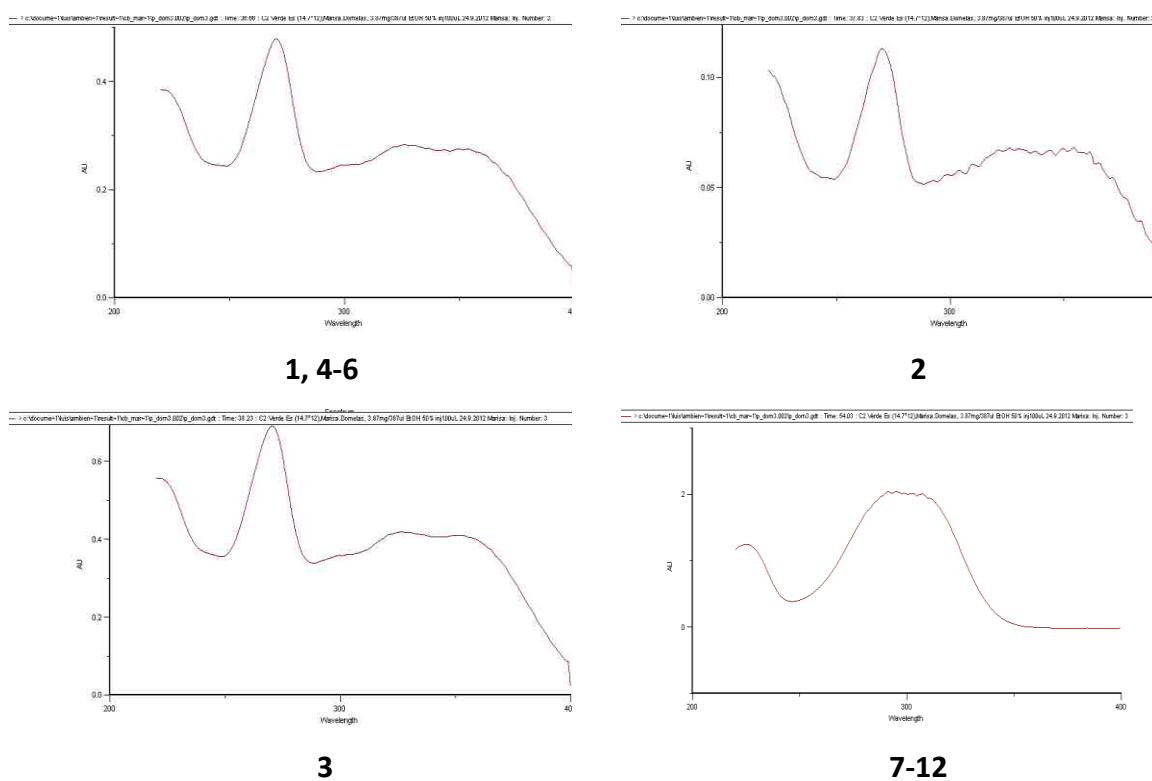
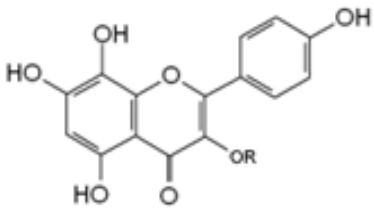


Figura 28. Espectros DAD dos compostos Fenólicos de *Rubus ulmifolius* (Caniçal)

Tabela 12. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Rubus ulmifolius* (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1-6	29,98; 36,66; 37,83; 38,50; 38,91;	herbacetina-3-O- derivado	
7-12	47,80; 49,26; 51,05; 52,44; 52,94; 54,03 e 54,67	Derivados de Ácidos fenólicos	

A partir do perfil de HPLC da Figura 27, podemos identificar 12 picos de maior relevância. Os compostos presentes em maior quantidade no pólen da espécie estudada são o 1, 3, 8, 9, 11 e 12, sendo que os restantes compostos presentes em menor quantidade.

Na figura 28 estão representados os espectros mais representativos dos compostos encontrados, uma vez que, alguns são repetidos e da mesma família. Deste modo, podemos observar que os compostos 1-6 são derivados da herbacetina-3-O-R e os compostos 7-12 são derivados de ácidos fenólicos (Tabela 12).

Através dos compostos fenólicos identificados, da análise polínica e da flora apícola no apiário na data da recolha de pólen, podemos considerar que a espécie analisada é uma *Rubus ulmifolius*.

Segundo Azevedo (2011) a família desta espécie é muito rica em compostos fenólicos, bioativos, destacando-se a presença das antocianinas, cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-ramnose-glucose. Os flavonóis mais presentes são a quercetina e canferol, os flavanóis, catequina e epicatequina e dos ácidos fenólicos, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido elágico e ácido gálico.

Desta forma podemos considerar que alguns ácidos fenólicos encontrados no pólen em estudo são alguns dos acima mencionados.

O perfil cromatográfico da espécie designada por C2_vc apresentou os mesmos resultados descritos anteriormente, levando a afirmar que ambos os pólenes pertencem à mesma espécie, *Rubus ulmifolius*. Os pólenes na amostragem foram designados de forma diferente, uma vez que alguns grãos de pólen apresentavam coloração verde claro e outros grãos de pólen apresentavam uma coloração verde escuro.

A variação de cor clara e escura por vezes está apenas relacionada com o teor de humidade dando um tom mais intenso quando é menor a humidade e um tom mais claro quando a presença de humidade é maior.

Na figura 29, podemos ver o perfil completo de uma amostra de C2_a e na Tabela 13, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 30, observam-se os espectros dos compostos.

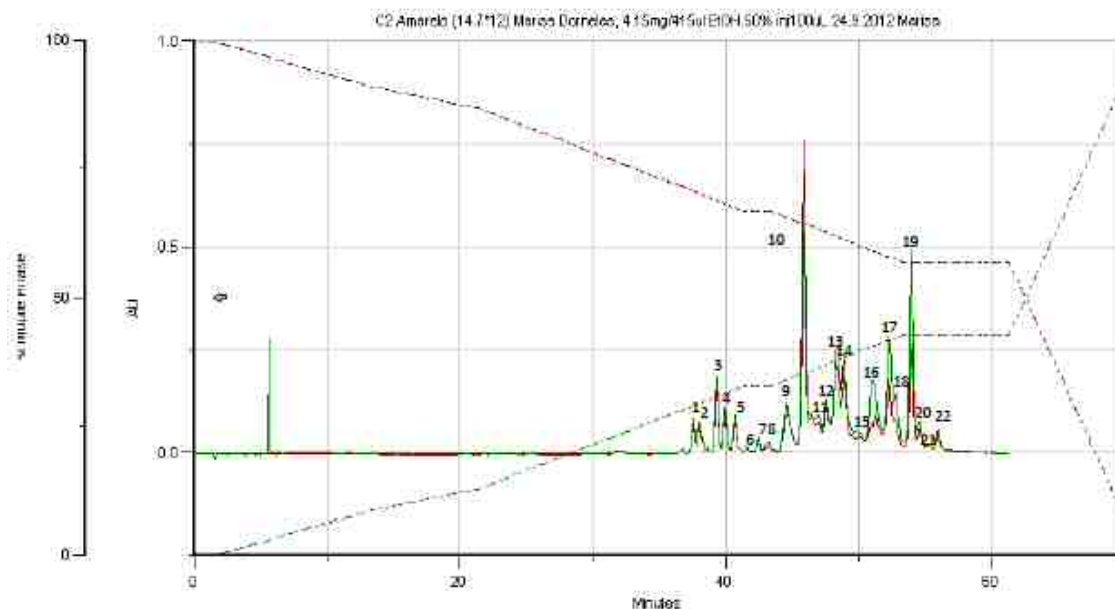


Figura 29. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola C2_a.

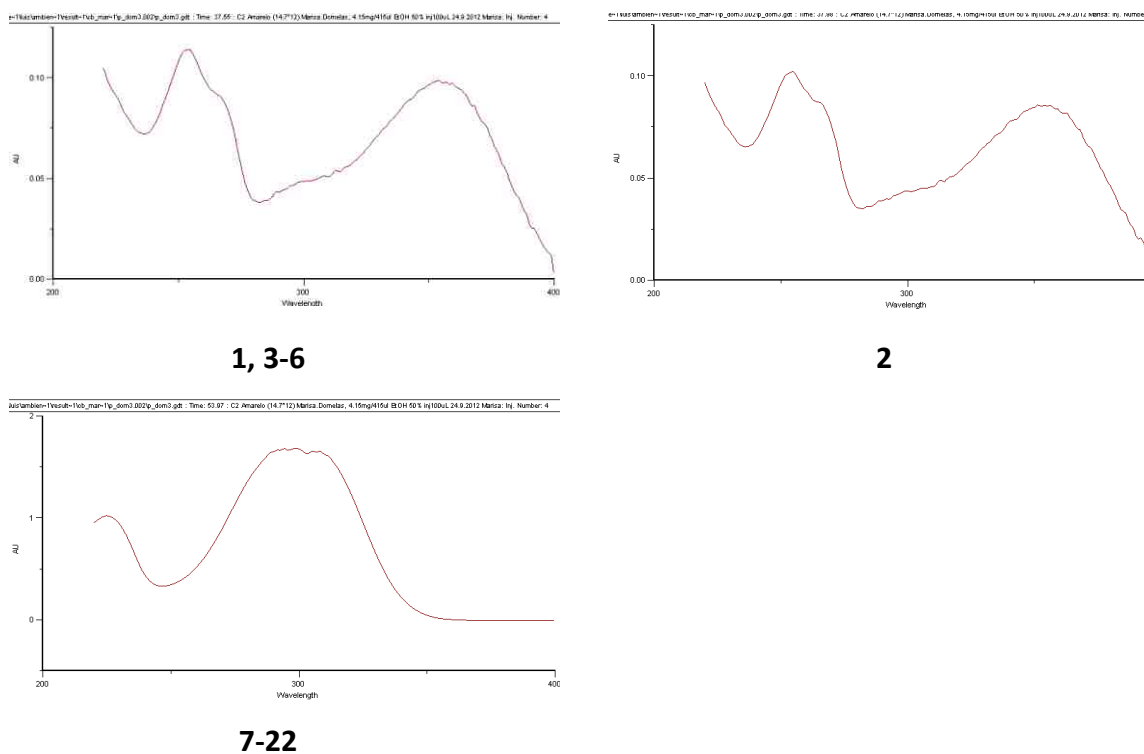


Figura 30. Espectros DAD dos compostos fenólicos da espécie C2_a (Caniçal)

Tabela 13. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen da espécie C2_a (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1-6	37,55; 37,98; 39,34; 39,95; 40,70; 42,47	isorhamnetina-3-O-derivado	
7-22	43,20; 44,57; 45,86; 46,99; 47,51; 48,28; 48,91; 49,90; 49,93; 51,07; 52,32; 52,85; 53,97; 54,58; 55,35; 55,95	Derivado de ácidos fenólicos	

Segundo o cromatograma tipo da figura 29 do pólen apícola de C2_ a podemos observar 22 picos, ou seja, 22 compostos fenólicos.

Como apresentado na figura 30, os espectros mais representativos do perfil cromatográfico, os compostos 1 a 7 são derivados da isorhamnetina-3-O-R e os compostos 7 ao 22 são derivados de ácidos fenólicos. Na tabela 13 está representada a estrutura dos compostos isorhamnetina-3-O-R, bem como os diferentes tempos de retenção de cada composto.

Como foi referido na análise polínica a origem floral desta espécie não foi identificada.

Na figura 31, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Calluna vulgaris* (L) Hull e na Tabela 14, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 32, observam-se os espectros dos compostos.

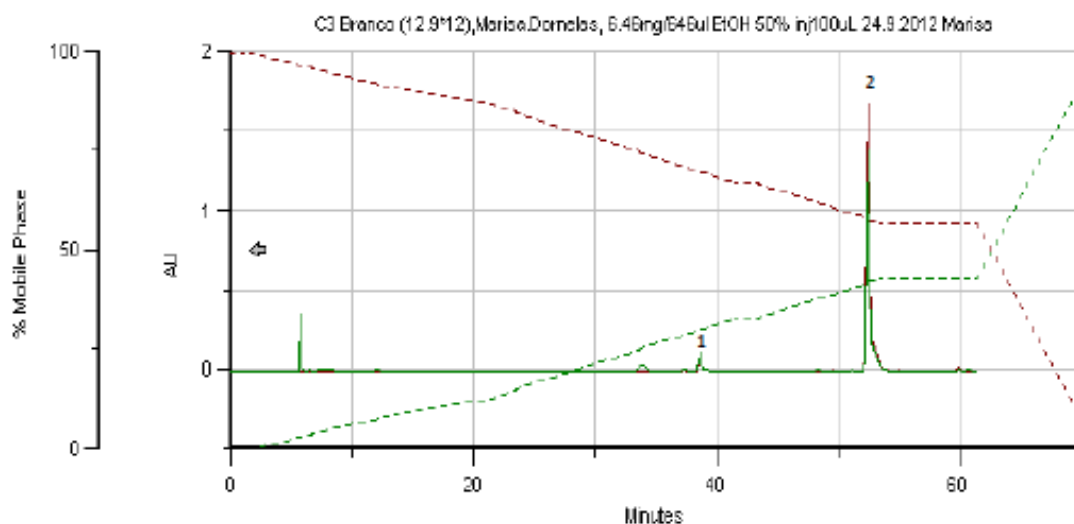


Figura 31. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados do pólen apícola de *Calluna vulgaris* (L) Hull (Caniçal).

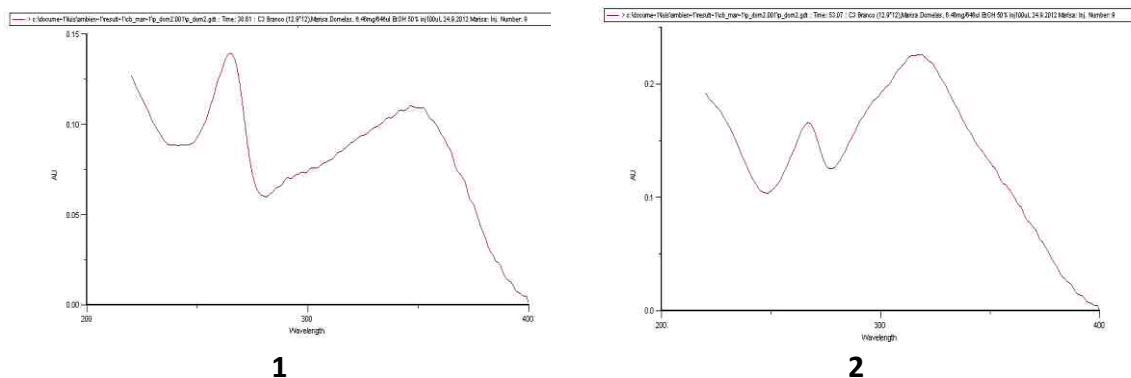
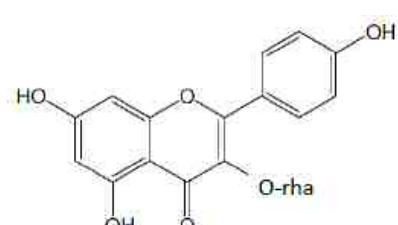


Figura 32. Espectros DAD dos Composto Fenólicos de *Calluna vulgaris* Hull (Caniçal)

Tabela 14. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Calluna vulgaris* (L) Hull (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1	38,50	canferol-3-O-ramnósido	
2	54,61	desconhecido	

Após a análise do cromatograma tipo da Figura 31, verifica-se que esta apresenta dois compostos, sendo o composto 1 presente em maior quantidade. Este composto através da análise do espectro da Figura 32 é um canferol-3-*O*-ramnósido e o composto 2 desconhecido. A estrutura do composto 1 está representada da Tabela 14.

Através destes resultados bem como da análise polínica identificamos esta espécie como *Calluna vulgaris* (L) Hull (Caniçal).

Na figura 33, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Calendula arvenses* e na Tabela 15, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 34, observam-se os espectros dos compostos.

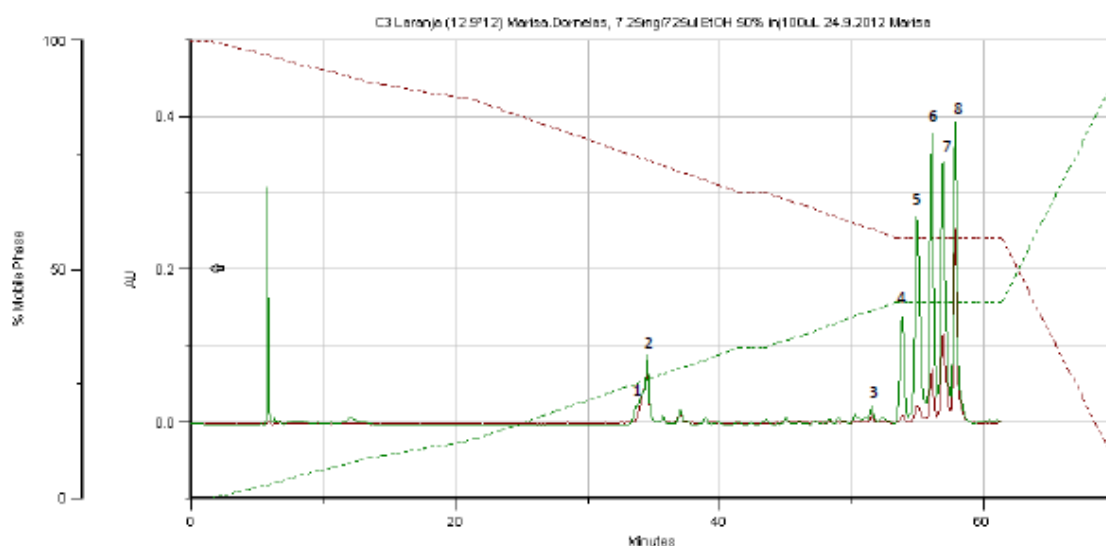
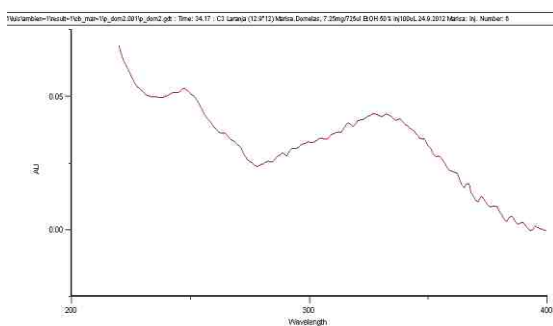
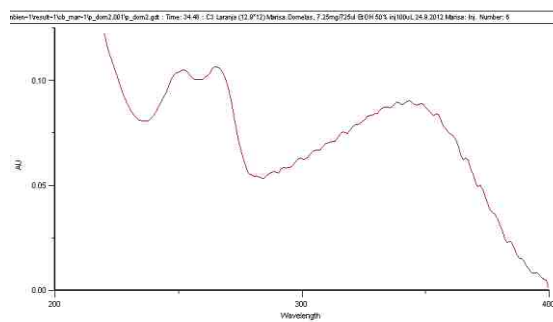


Figura 33. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de *Calendula arvenses* (Caniçal).



1



2

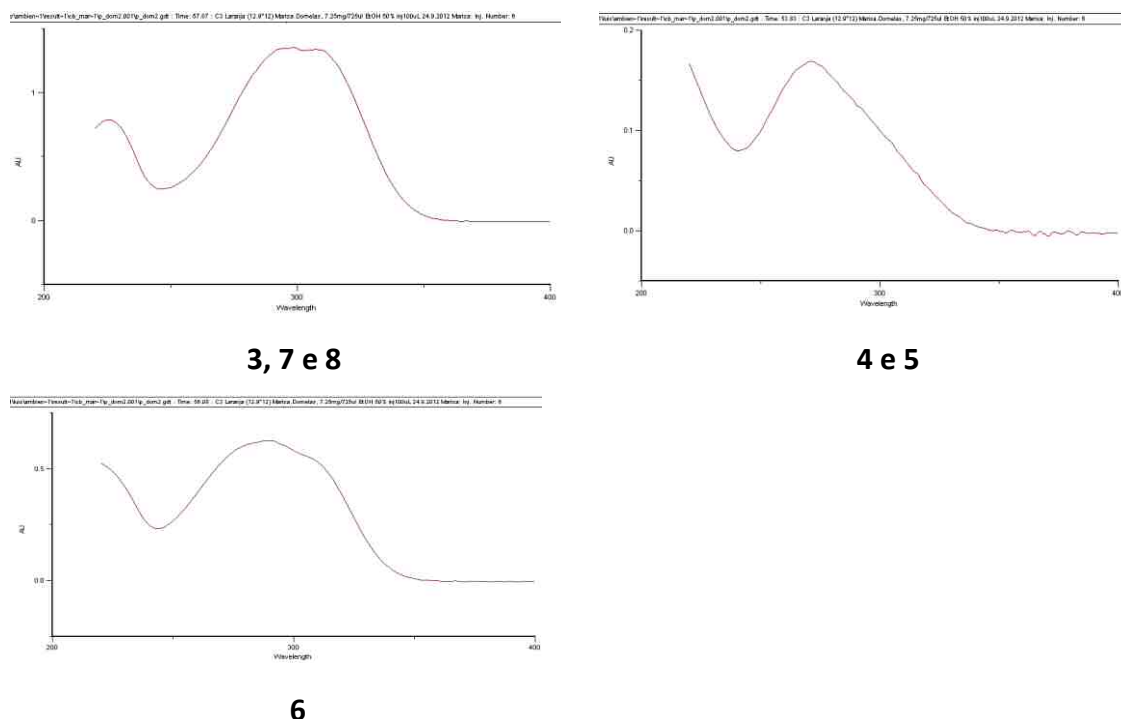


Figura 34. Espectros DAD dos Compostos Fenólicos de *Calendula arvenses* (Caniçal).

Tabela 15. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Calendula arvenses* (Caniçal) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1	34,17	Desconhecido	
2	34,48; 51,52	quercetina-3-O- derivado	
3- 8	53,83; 54,97; 56,03; 56,96; 57,87	Derivados de ácidos fenólicos	

A partir do cromatograma da Figura 33, podemos verificar que este apresenta 8 compostos de maior relevância.

Segundo a Figura 34 e a tabela 15 podemos verificar que o composto 1 é desconhecido, o composto 2 é um derivado de quercetina-3-O, e os compostos 3-8 são derivados de ácidos fenólicos.

Deste modo e após a análise da microscopia polínica, podemos considerar que a espécie floral é a *Calendula arvenses*.

Os perfis de HPLC/DAD dos compostos fenólicos e polifenólicos obtidos nas três colheitas do Vale Grande estão a seguir apresentadas.

Na figura 35, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Cistus ladanifer* L. e na figura 36, observam-se os espectros dos compostos. Na Tabela 16 estão representados as respectivas estruturas dos compostos.

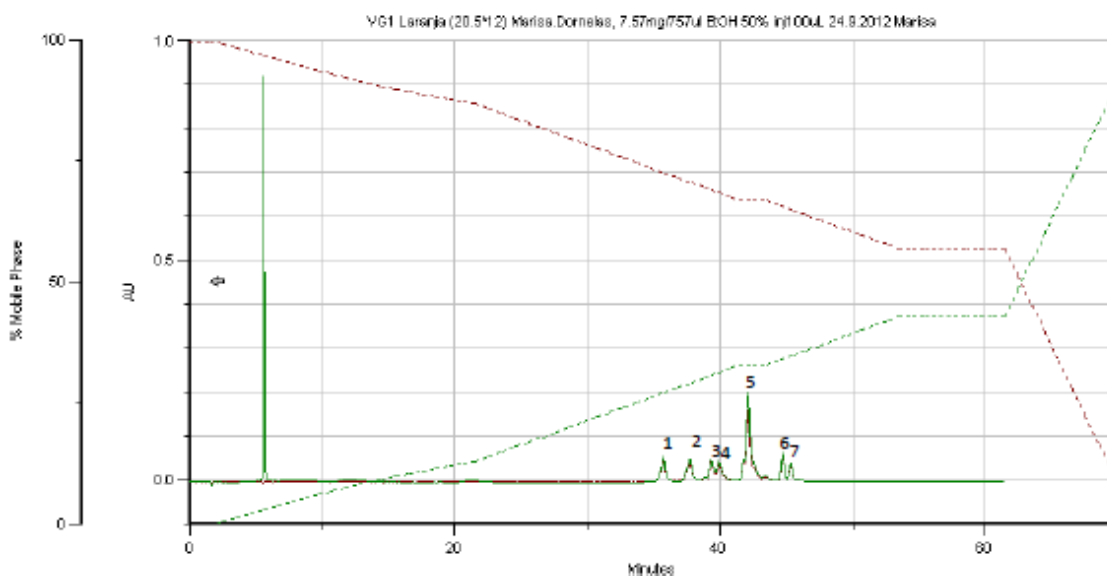


Figura 35. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de *Cistus ladanifer* L. (Vale Grande)

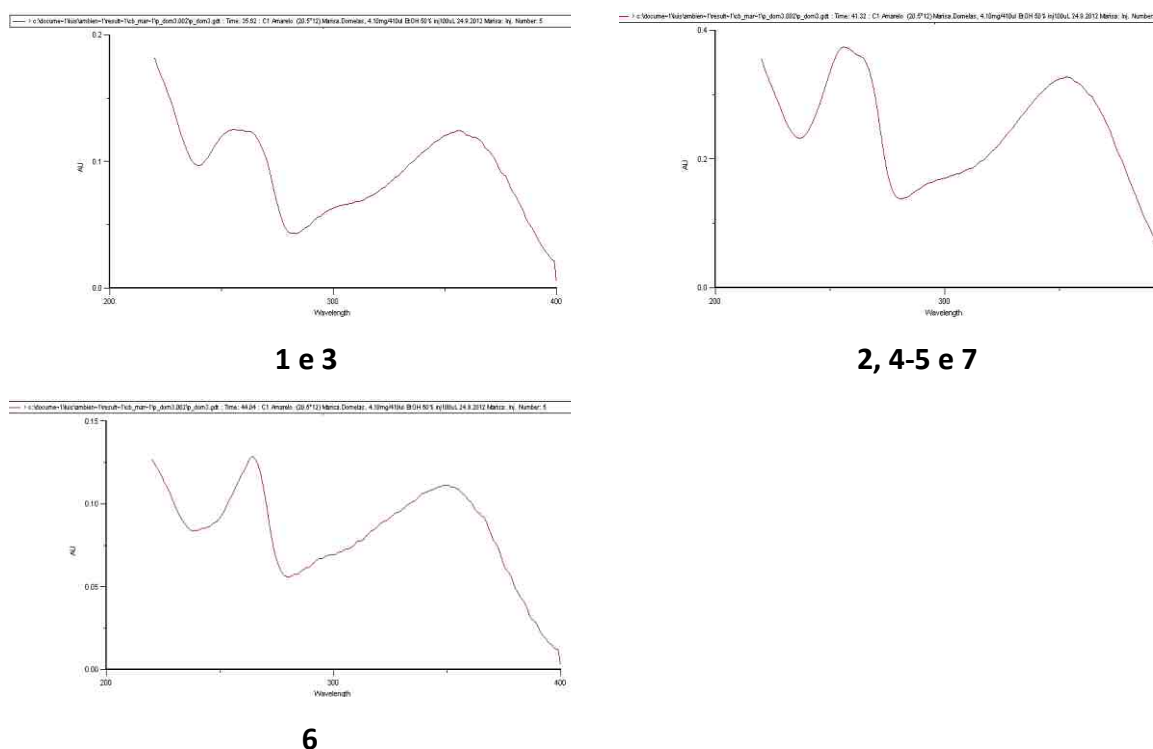
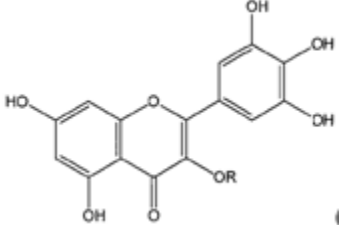
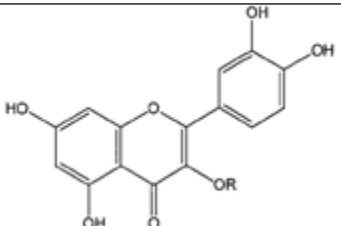
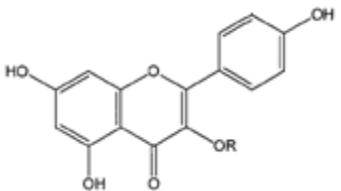


Figura 36. Espectros DAD dos Compostos Fenólicos *Cistus ladanifer* L. (Vale Grande)

Tabela 16. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Cistus ladanifer* L. (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1 e 3	35,82; 39,30	miricetina-3- <i>O</i> -derivados	
2, 4, 5 e 7	37,68; 39,86; 42,14; 45,35	quercetina-3- <i>O</i> -derivados	
6	43,47	canferol-3- <i>O</i> -R	

Como se pode verificar a partir do perfil de HPLC da Figura 35, esta espécie apresenta sete picos, ou seja, sete compostos, nomeadamente os compostos 1 e 3 são derivados da miricetina-3-*O*-R e os 2, 4, 5, 7 são derivados da quercetina-3-*O*-R, sendo o 6 um canferol-3-*O*-R (Figura 36). Através dos espectros dos compostos bem como dos tempos de retenção podemos concluir que a espécie VG1_laranja é a mesma que C1_amarelo (possivelmente com maior teor de água o que torna a cor mais clara, o que por vezes é difícil de verificar a “olho nu” as variantes de uma mesma cor) e C2_laranja, ou seja, uma *Cistus ladanifer* L.. No entanto, e como se pode também ver pelos cromatogramas o perfil mantém-se, demonstrando que a identificação está correcta, porém as concentrações são diferentes, o que pode revelar teores de humidade variáveis.

Na figura 37, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Ulex europaeus* L. e na Tabela 17, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 38, observam-se os espectros dos compostos.

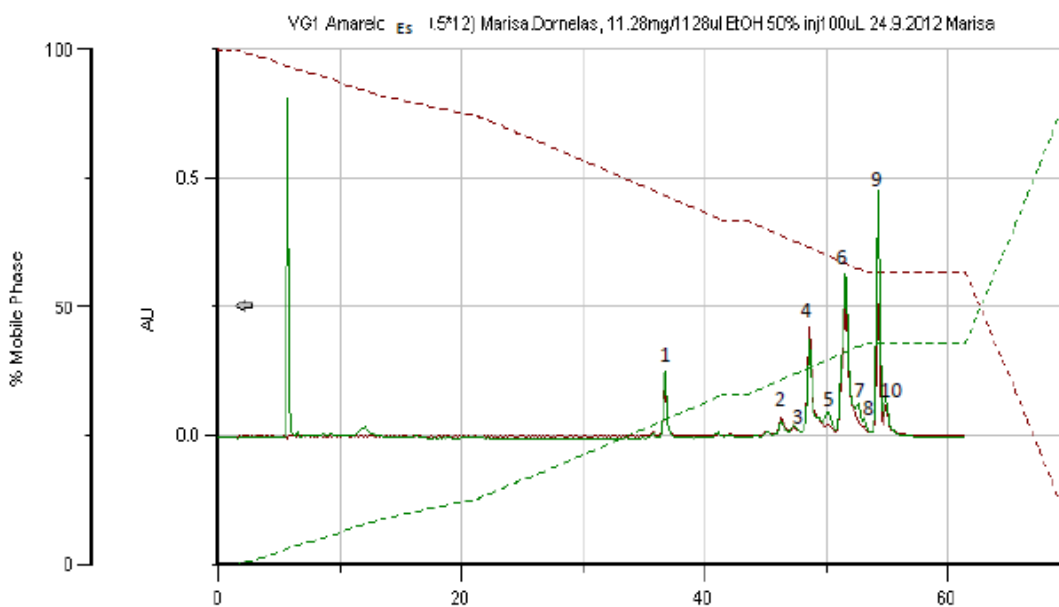


Figura 37. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola de *Ulex europaeus* L. (Vale Grande)

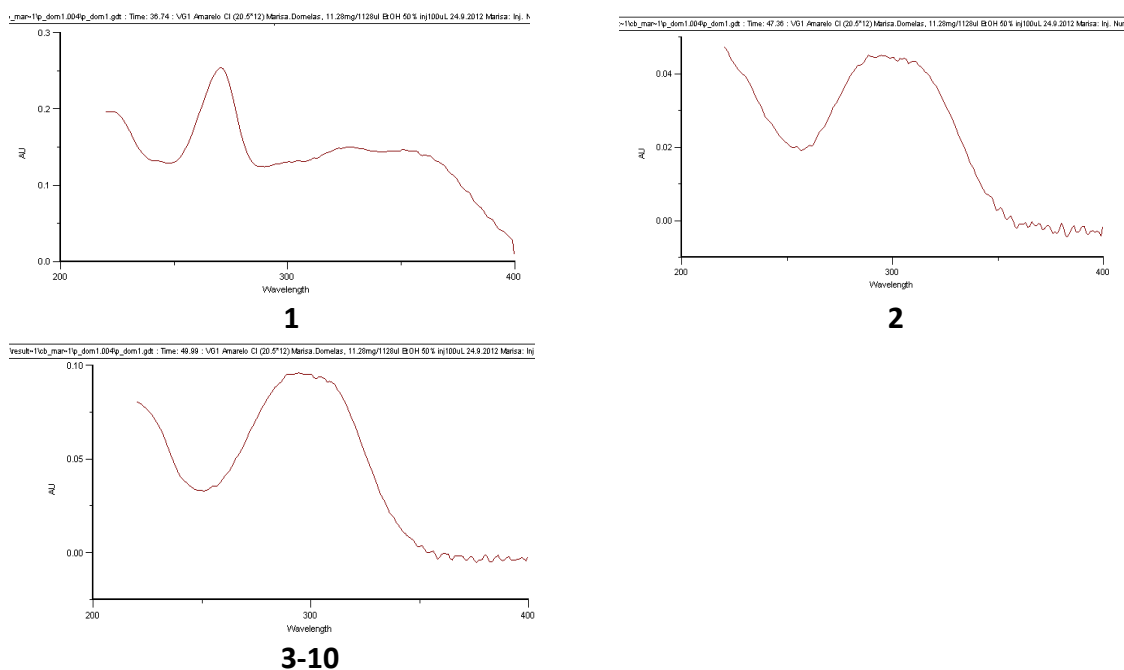
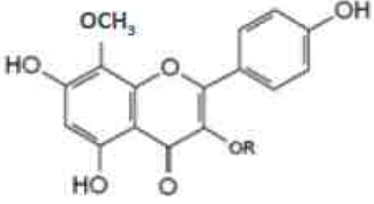


Figura 38. Espectros DAD dos Compostos Fenólicos *Ulex europaeus* L. (Vale Grande)

Tabela 17. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Ulex europeus* L. (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1	36,74	8- <i>O</i> -metil-herbacetina-3- <i>O</i> -soforósido	
2-10	47,36; 48,80; 49,99; 51,33; 51,46; 51,76; 52,74; 54,23 e 54,92	Derivados de ácidos fenólicos	

O cromatograma da espécie VG1 Amarelo_Esc (Figura 37) apresenta dez picos, sendo os picos 1, 4, 6 e 10 os maiores, o que sugere a presença destes compostos em maior quantidade na espécie analisada.

Através dos espectros verifica-se que o composto 1 é um 8-*O*-metil-herbacetina-3-*O*-soforósido e os compostos de 2-10 são derivados de ácidos fenólicos.

Estes compostos também foram encontrados no estudo realizado por Campos (1997), onde é referido ainda que o flavonol 8-*O*-metil-herbacetina-3-*O*-soforósido raramente tem sido mencionado em outros trabalhos, sendo este composto identificado no *taxon Ulex europeus* L. e em outros semelhantes.

Além dos compostos encontrados, após a comparação e análise do cromatograma da Figura 37 com os resultados obtidos por Campos (1997), cromatograma tipo de compostos polifenólicos de *Ulex europeus* L. (Figura 38) verificamos que estes são semelhantes.

Deste modo e através da tabela 8, podemos concluir que a espécie analisada é uma *Ulex europeus* L.

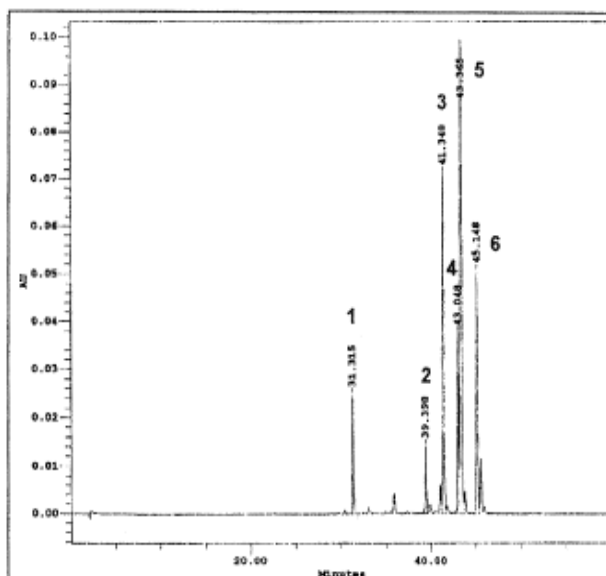


Figura 39. Cromatograma tipo de compostos polifenólicos do pólen de *Ulex europeus* L. (imagens reproduzidas de Campos et al, 1997, com autorização do autor)

Os resultados obtidos para o pólen apícola designado por VG1_a, foram iguais aos descritos anteriormente, desta forma podemos concluir que os pólenes identificados como VG1_a e VG1_ae são ambos da mesma fonte floral, *Ulex europeus* L.. Esta conclusão é reforçada através da análise polínica.

Na figura 40, podemos ver o perfil completo de uma amostra de pólen de VG1_a e na Tabela 18, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 41, observam-se os espectros dos compostos.

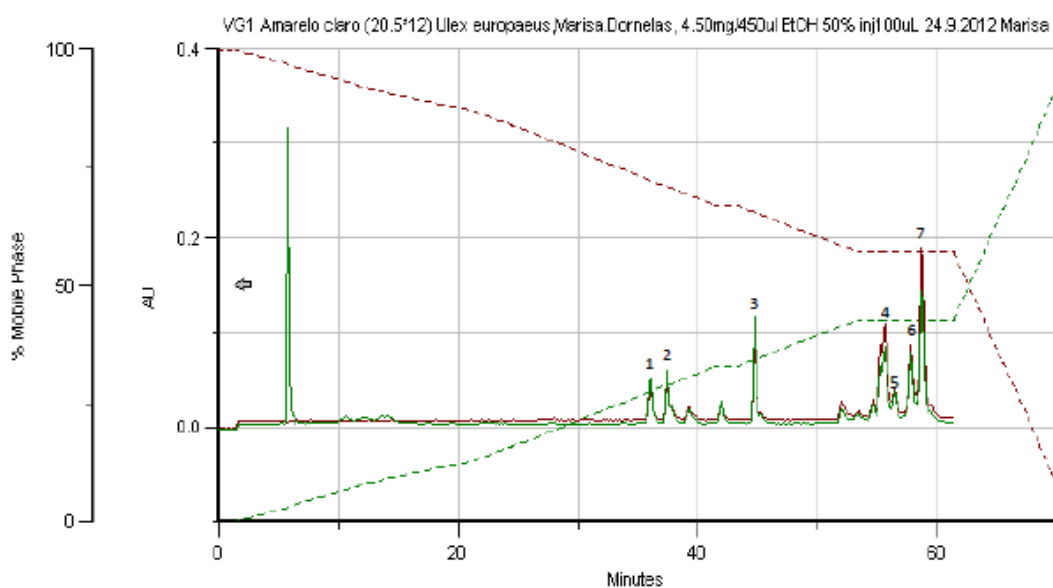


Figura 40. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola VG1_a (Vale Grande)

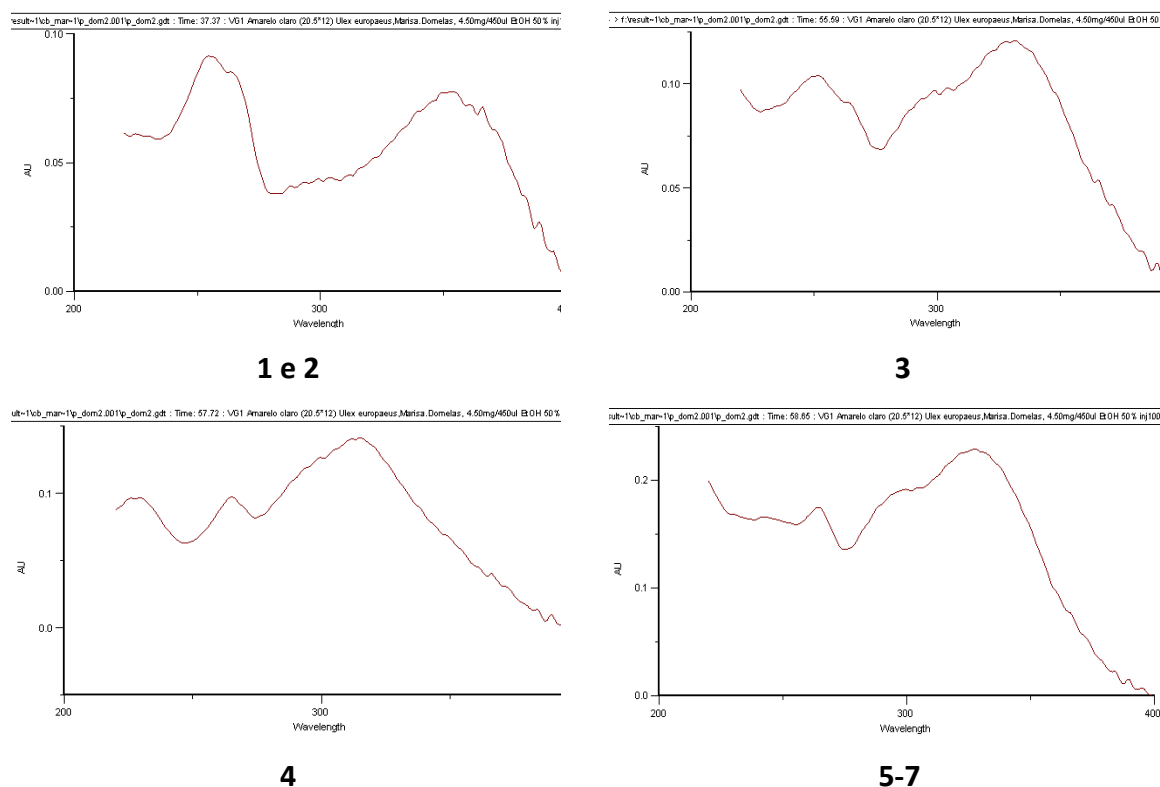


Figura 41. Espectro DAD dos Compostos fenólicos de VG1_a (Vale Grande)

Tabela 18. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de VG1_a (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1 e 2	36,01 e 37,37	quercetina-3-O-derivado	
3-7	55,59; 57,72 58,17; 58,19; 58,65	desconhecido	

O cromatograma apresentado na Figura 40 revela sete compostos, sendo que os presentes em maiores quantidades no pólen são os compostos 3-7. Através dos espectros e Tabela 41 verificaram-se que os compostos 1 e 2 são derivados de quercetina-3-O-R e os compostos 3-7 de estrutura desconhecida mas provavelmente flavonas ou flavonóis substituídos em C3 por ácidos fenólicos. Como referido na análise polínica não foi possível identificar esta espécie.

Na figura 42, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Erica australis* L. e na Tabela 19, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 43, observam-se os espectros dos compostos.

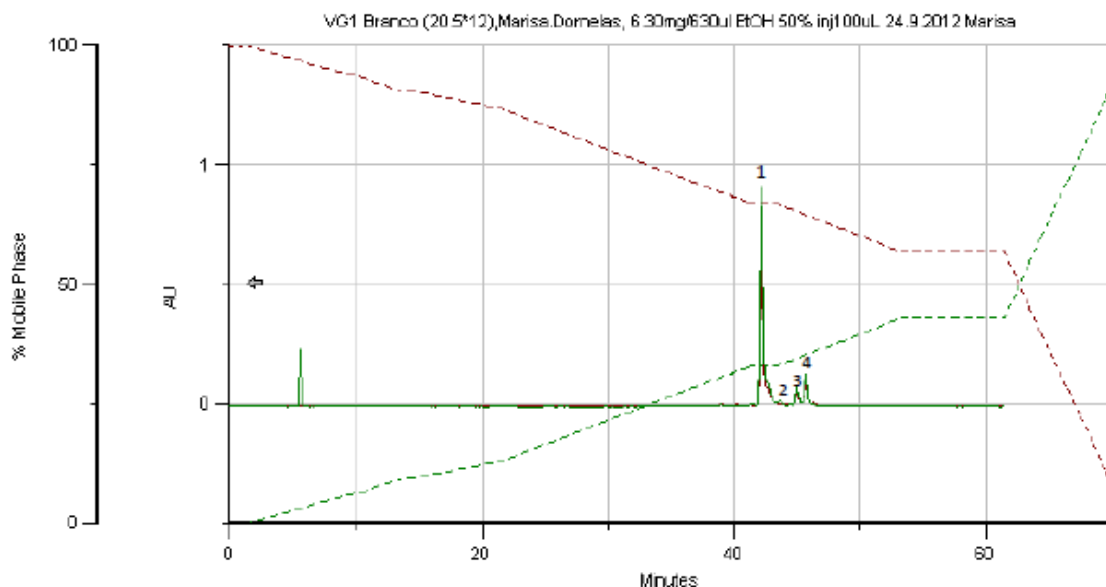


Figura 42. Perfil de HPLC/DAD dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola *Erica australis* L. (Vale Grande)

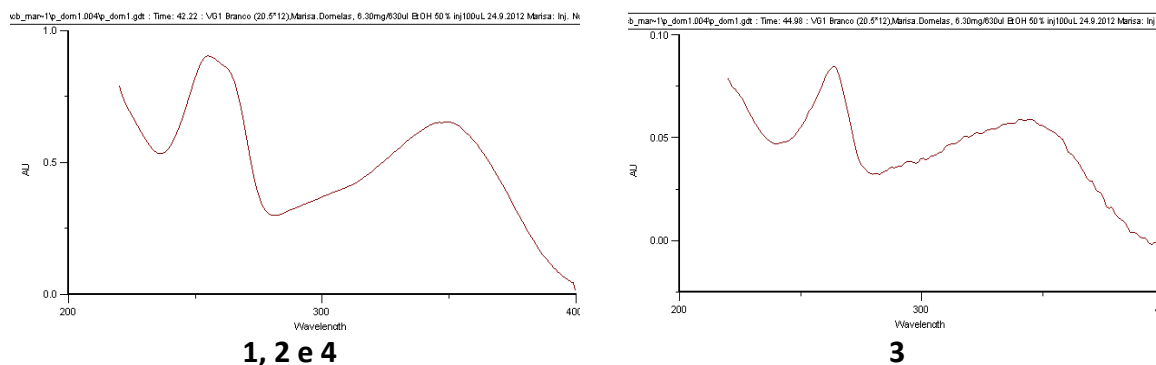
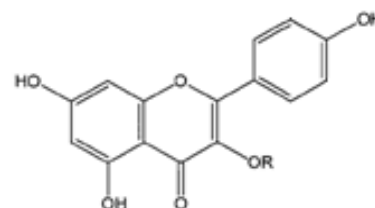


Figura 43. Espectros DAD dos compostos Fenólicos de *Erica australis* L. (Vale grande)

Tabela 19. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Erica australis* (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1, 2 e 4	42,22; 42,64; 45,60	quercetina-3-O-derivado	

3 44,98 canferol-3-O- derivado



Como se pode verificar através do cromatograma da Figura 42, este apresenta quatro picos, ou seja, quatro compostos. Através dos espectros da Figura 43 verificam-se que os compostos fenólicos 1, 2 e 4 são derivados de quercetina-3-O-R e o composto 3 é um derivado de canferol-3-O-R (Tabela 18).

Através dos espectros dos compostos bem como dos tempos de retenção podemos concluir que a espécie VG1_b é a mesma que C1_b, ou seja, uma *Erica australis* L. apresentada anteriormente. No entanto, e como se pode também ver pelos cromatogramas o perfil mantém-se, demonstrando que a identificação está correcta, porém as concentrações são diferentes.

Na figura 44, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Rubus ulmifolius* e na Tabela 20, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 24, observam-se os espectros dos compostos.

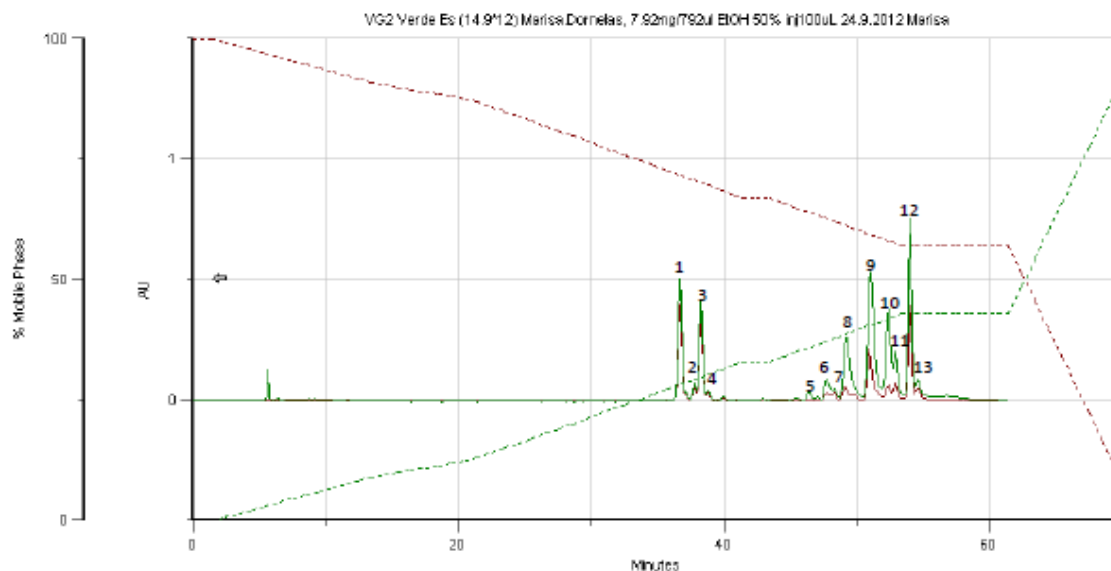


Figura 44. Perfil de HPLC/DAD dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola *Rubus ulmifolius* (Vale Grande)

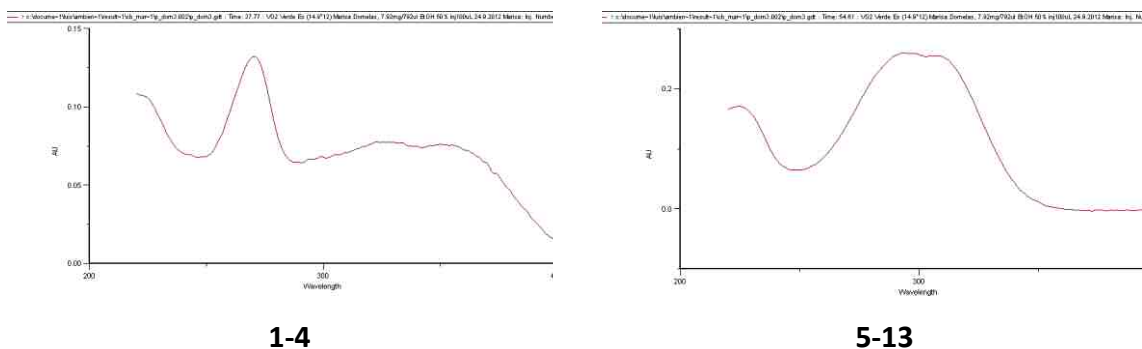


Figura 45. Espectros DAD dos Compostos Fenólicos de *Rubus ulmifolius* (Vale Grande)

Tabela 20. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Rubus ulmifolius* (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1-4	36,67; 37,77; 38,50; 38,50	herbacetina-3-O-derivado	
5-13	46,39; 47,71; 48,32; 49,18; 51,00; 52,34; 52,87; 53,96 e 54,61	Derivados de Ácidos fenólicos	

De acordo com o perfil HPLC dos compostos fenólicos representado na Figura 44, identificamos 13 compostos, sendo os compostos 1, 2, 3 e 4 derivados de herbacetina-3-O-R e os restantes derivados de ácidos fenólicos.

Após a análise dos espectros dos compostos, perfis de HPLC e tempos de retenção das amostras de pólen do apiário do Caniçal designadas de C2_ve e C2_vc, ambos pólenes de cor verde, podemos concluir que são todos pólenes da mesma espécie, ou seja, uma *Rubus ulmifolius*.

No entanto, e como se pode também ver pelos cromatogramas o perfil mantém-se, demonstrando que a identificação está correcta, porém as concentrações são diferentes, o que é facilmente perceptível dado que as concentrações de humidade podem ser diferentes.

Na figura 46, podemos ver o perfil completo de uma amostra de GV2_a e na Tabela 21, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 47, observam-se os espectros dos compostos.

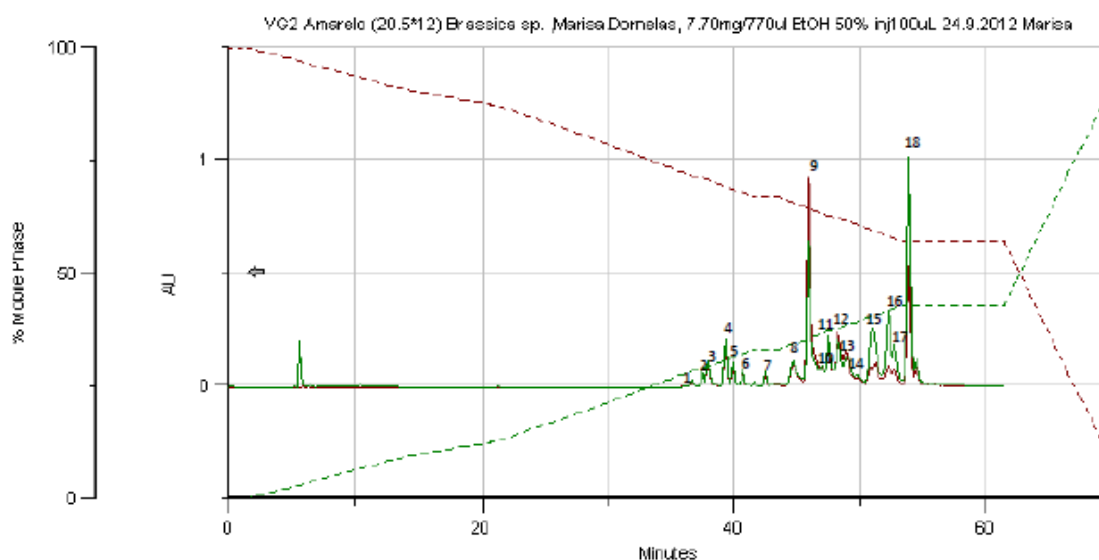


Figura 46. Perfil de HPLC/DAD dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola VG2_a (Vale Grande)

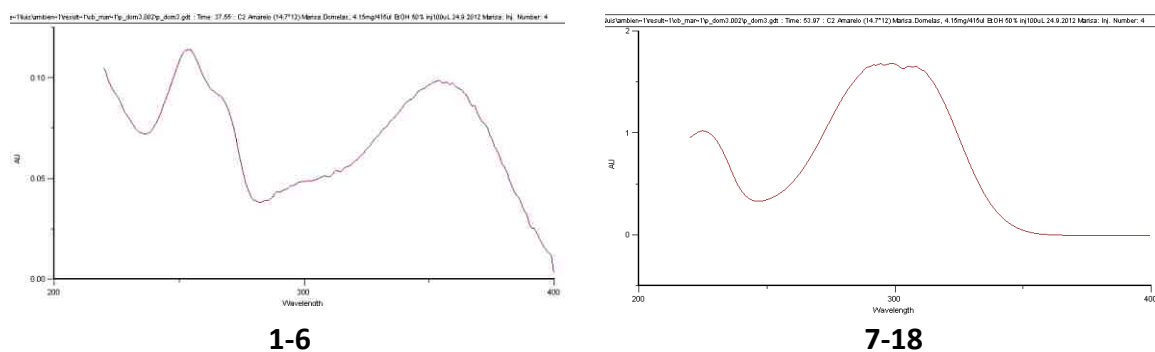


Figura 47. Espectros DAD dos Compostos Fenólicos de VG2_a (Vale Grande)

Tabela 21. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de VG2_a com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr(min)	Composto	Estrutura
1-6	36,70; 37,91; 37,47; 39,31; 39,97; 40,66	isorhamenetina-3-O-derivado	

7-18	42,44; 45,90; 46,38; 47,03; 47,50; 48,28; 48,99; 49,80; 50,95; 52,24; 52,73 e 54,40	Derivado de um ácido fenólico
------	--	----------------------------------

O perfil de HPLC da Figura 46, apresenta 18 compostos predominantes correspondentes a 18 flavonóides, sendo o de maior relevância os picos 9 e 18 correspondentes aos compostos maioritários. Estes compostos como se pode observar na Tabela 20 são derivados de um ácido fenólico, bem como os compostos 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17.

Os compostos 1-6 foram identificados como derivados da isorhamenetina-3-O-R (Tabela 20).

Como foi referido na análise polínica não foi possível identificar esta espécie. No entanto, através dos espectros dos compostos bem como dos tempos de retenção podemos concluir que a espécie C2_a e VG2_a são a mesma que espécie. Isso também se verifica pelos cromatogramas correspondentes em que o perfil mantém-se, demonstrando que a identificação está correcta, porém as concentrações são diferentes.

Na figura 47, podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Calluna vulgaris* (L) Hull e na Tabela 22, os compostos maioritários especificados com os respectivos tempos de retenção (Tr) em minutos e a sua estrutura. Na figura 48, observam-se os espectros dos compostos.

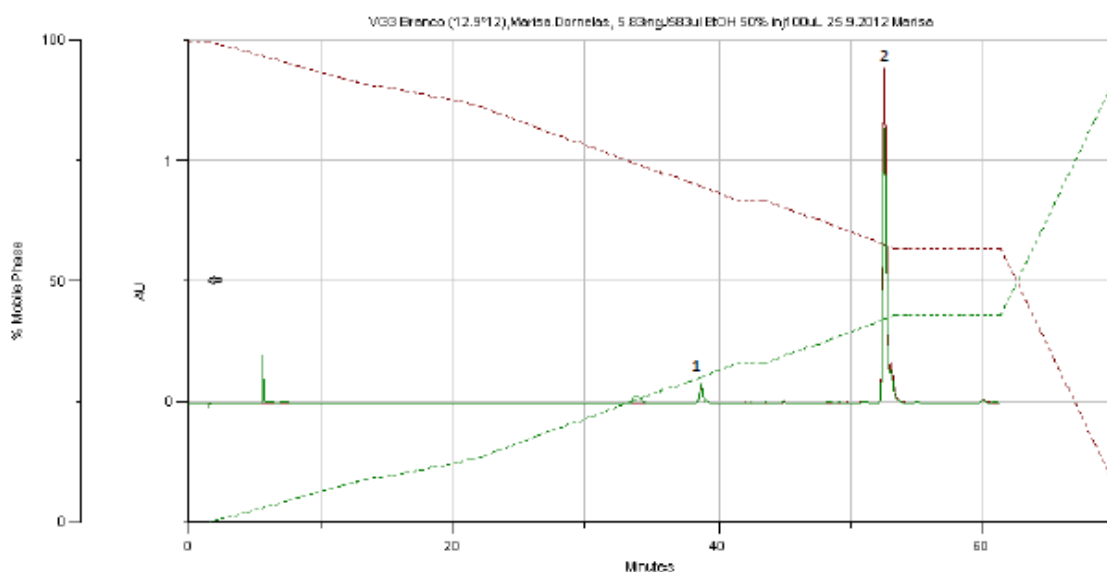


Figura 48. Perfil de HPLC dos compostos fenólicos encontrados no pólen apícola *Calluna vulgaris* (L) Hull. (Vale Grande)

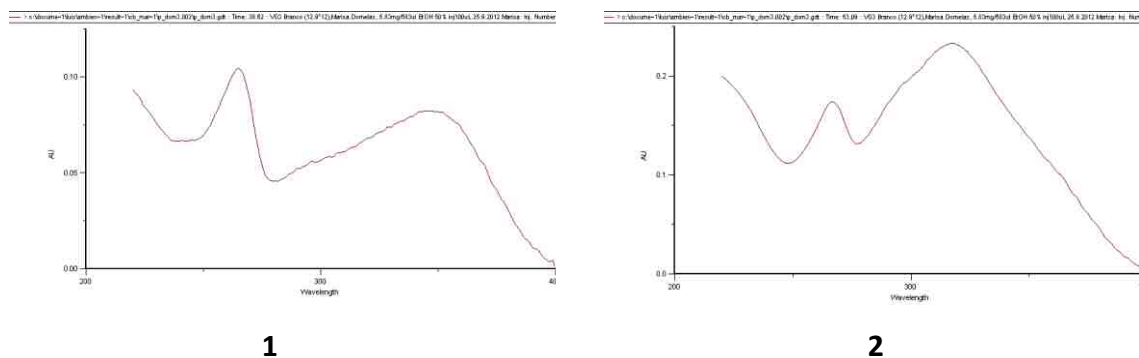


Figura 49. Espectros DAD dos compostos Fenólicos de *Calluna vulgaris* (L) Hull (Vale Grande)

Tabela 22. Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Calluna vulgaris* (L) Hull (Vale Grande) com relativos tempos de retenção e estruturas

Pico	Tr (min)	Composto	Estrutura
1	38,50	canferol-3-O-ramnósido	
2	54,61	desconhecido	

Segundo o cromatograma tipo da Figura 47, verifica-se que este apresenta dois picos, ou seja, dois compostos, sendo o composto 1 presente em maior quantidade. Através da análise dos respectivos espectros da Figura 48, podemos verificar que este composto é um canferol-3-O-ramnósido e o composto 2 desconhecido. A estrutura do composto 1 está apresentada na Tabela 22.

Através da análise do cromatograma, dos compostos identificados e da análise polínica, podemos concluir que a espécie analisada é a *Calluna vulgaris* L. Além disso através dos espectros dos compostos bem como dos tempos de retenção podemos concluir que a espécie C3_b e VG3_b são a mesma, verifica-se que nos cromatogramas o perfil se mantém, demonstrando que a identificação está correcta, porém as concentrações são diferentes.

5.3 Análise dos Minerais

Os resultados das análises aos minerais estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Valor de Concentração média dos minerais analisados no pólen em mg/Kg peso seco

Amostras	Concentração de Minerais nas Amostras de Pólen						
	Cu	Fe	Mn	Zn	Cd	Cr	Pb
<i>Cistus ladanifer</i> L. (Caniçal-1ª Colheita)	7,4	40,7	8,6	63,0	<LQ (0,1)	2,9	<1,4
<i>Rubus ulmifolius</i> (Caniçal -2ª Colheita)	12,7	80,5	203,0	47,0	<LQ (0,1)	<LQ (0,4)	<1,4
<i>Calluna vulgaris</i> (Caniçal -3ª Colheita)	8,8	123,4	266,0	36,0	<LQ (0,1)	<LQ (0,4)	<1,4
<i>Ulex europeus</i> L. (Vale Grande-1ª Colheita)	8,3	44,0	13,8	46,0	0,267	1,80	<1,4
<i>Cistus ladanifer</i> L. (Vale Grande -1ª Colheita)	7,4	39,8	9,0	46,0	<LQ (0,1)	2,60	<1,4
<i>Rubus ulmifolius</i> (Vale Grande-2ª Colheita)	13,2	83,2	197,0	48,0	<LQ (0,1)	<LQ (0,4)	<1,4
<i>Calluna vulgaris</i> (Vale Grande-3ª Colheita)	8,6	124,7	250,0	32,0	<LQ (0,1)	0,800	<1,4
VR	2-16	11-170	20-110	30-250	-	-	-

VR - Valores de referência (Campos *et al.*, 2008)

Pela análise da Tabela 23, podemos verificar que em termos globais o pólen que apresenta maior concentração de minerais é da espécie *Calluna vulgaris* (L) Hull. Estes valores elevados em minerais referem-se às concentrações registadas de manganês, 266,0 e 250,0, respectivamente pólen colhido no Caniçal e pólen colhido no Vale Grande, que são superiores aos valores de referência (20-110).

De acordo com o Regulamento CE 1881/2006, CE 629/2008 e UE 420/2011 que fixamos teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios apenas são indicados limites máximos (dentro dos metais analisados) para o cádmio (1,0 mg/kg) e para o Chumbo (1,5 mg/kg), no entanto nenhuma referência é efectuada ao pólen apícola. Pode-se ainda verificar que todas as amostras de pólen apresentam concentrações de chumbo inferior ao limite de quantificação. O mesmo se verifica em relação à quantidade de cádmio, onde se verifica que apenas o pólen de *Ulex europeus* L., apresentou um valor superior ao limite de quantificação.

O pólen de *Cistus ladanifer* L. das amostras dos dois apiários foi a que apresentou maior quantidade de crómio com 2,9 mg/kg (pólen Caniçal) e 2,60 mg/kg (pólen Vale Grande).

A presença de minerais como o cobre, ferro e zinco de acordo com os valores de referência, estão dentro dos parâmetros indicados, o mesmo não acontece com o manganês como foi acima mencionado.

A existência dos elevados conteúdos em metais apresentados na tabela pode mesmo ser uma necessidade absoluta da planta para poder resistir à poluição ambiental.

Existem enzimas antioxidantes, nomeadamente a superóxido dismutase (SOD) que necessitam destes metais. A SOD1 depende do Cobre e do Zinco e a SOD2 do manganês (Paulo, 2012).

6. Considerações Finais

Em relação à origem botânica dos pólenes recolhidos pelas abelhas nos períodos de estudo, foram encontrados seis tipos polínicos nas três colheitas no apiário de Caniçal, das quais cinco foram possíveis de identificar e sete tipos polínicos nas três colheitas de Vale Grande, das quais cinco foram devidamente identificadas.

Na colheita realizada em 20 Maio de 2012, pode-se verificar que no apiário de Caniçal os pólenes colhidos em maior quantidade foram de *Cistus ladanifer* L. e de *Erica australis*. Já na mesma data no apiário de vale Grande os pólenes colhidos em maior quantidade foram de *Cistus ladanifer* L. e *Ulex europeus* L.. Estas quantidades estão relacionadas com a preferência das abelhas *Apis mellifera* por estas espécies florais e da composição florística disponível na área circundante aos apiários. Por outro lado este resultado comprova o facto de as abelhas, sempre que encontram uma espécie da sua preferência, comunicam entre si e recolhem maioritariamente pólen e néctar dessa mesma espécie.

Na colheita de 14 de Julho de 2012, o pólen predominante nas amostras dos dois apiários foram de *Rubus ulmifolius*, o que conferiu com a flora apícola da região nessa data.

Na última colheita, realizada a 12 de Setembro, os pólenes identificados no apiário de Caniçal foram de *Calluna vulgaris* (L) Hull e *Calendula arvenses*, sendo que a primeira em maior quantidade e a última em pouca quantidade. Já no Apiário de Vale Grande foi apenas identificado pólen de *Calluna vulgaris* (L) Hull.

Observou-se ainda na amostragem, na separação do pólen por cores, que alguns pólenes tinham cor semelhante que posteriormente através do perfil cromatográfico se revelaram como sendo a mesma espécie floral. Tal facto deve-se à dificuldade da uniformização da secagem do pólen, que não deve ultrapassar temperaturas superiores a 40°C, e conseqüentemente confere aos grãos de pólen humidades ligeiramente diferentes e conseqüentemente tonalidades diferentes.

Ao longo do trabalho, através da análise dos perfis cromatográficos por HPLC/DAD dos extratos de pólen bem como através dos espectros correspondentes, pode concluir-se que:

- Na espécie *Cistus ladanifer* L. estão presentes flavonóides como a miricetina-3-O-R, a quercetina-3-O-R e o canferol-3-O-R;
- Na espécie *Erica australis* estão presentes flavonóides como a quercetina-3-O-R e o canferol-3-O-derivados;
- Na espécie *Ulex europeus* L. encontramos flavonóides como 8-O-metil-herbacetina-3-O-soforósido e derivados de ácido cafeico e cumárico;
- Na espécie *Rubus ulmifolius* encontramos flavonóides como herbacetina-3-O-R, herbacetina, herbacetina-3-O-derivados e outros ácidos fenólicos;

- Na espécie *Calluna vulgaris* (L) Hull está presente um flavonóide como o canferol-3-*O*-ramnósido e outros desconhecidos;
- Na espécie *Calendula arvenses* estão presentes flavonóides como a quercetina-3-*O*-R e derivados de ácido cafeico, gálico e siríngico.

No entanto, há que referir e salientar que além dos compostos fenólicos encontrados através dos perfis cromatográficos as espécies acima mencionadas apresentam outros compostos fenólicos, dos quais alguns já detectados e devidamente isolados e identificados por outros autores.

Podemos concluir através da análise anterior que de facto o pólen apícola é muito rico em diferentes compostos fenólicos. E que os perfis encontrados variam claramente de espécie para espécie o que os torna uma ferramenta importante de classificação e separação de tipos botânicos.

Verificou-se que algumas amostras de pólen apresentam quantidades elevadas de minerais. Estes valores podem depender da espécie vegetal e da sua fisiologia, uma vez que os apiários em questão não se encontram próximos de qualquer fonte de contaminação. No entanto, os poluentes apresentam, em alguns casos, boas propriedades de migração pelo que se deveriam complementar estas análises com análises ao solo e às águas circundantes.

Deste trabalho ressalta ainda a importância de ser definida para o pólen apícola legislação em Portugal para a sua composição e respetivos limites legais de alguns constituintes.

Por outro lado, e dada a sua composição, deveria apostar-se numa forte campanha de divulgação dos benefícios, bem como da sua produção e como comercialização.

Ao longo da realização deste trabalho verificou-se ainda a deficiência e dificuldade que existe em Portugal em conseguir definir recolher e projectar dados reais sobre a produção de pólen apícola.

7. Referências Bibliográficas

- Agreste Lda., Bem Haja A. 2003. Flora Melífera Zona do Pinhal – Concelho do Fundão. Pinus Verde. Assec - SIM- Sistemas de Informação e Multimédia, Lda.
- Almeida D, Marchini LC, Sodré GS,  vila M, Arruda CM. 2003. Plantas visitadas por Abelhas e Poliniza o. Série Produtor Rural. Edi o especial. Piracicaba
- Almeida D. 2007. Recursos Alimentares, desenvolvimento das col nias e características Físico-Químicas, Microbiológicas e Polínicas de mel e cargas pólen de Melipon neos do Município de Piracicaba, Estado de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Lu z de Queiroz. Piracicaba
- Almeida-Muradian L, Arruda AS, Barreto L. 2012. Manual de controlo de Qualidade do Pólen Apícola. APACAME. São Paulo.
- Araújo D. 2012. Mel de Abelhas *Apis mellifera L.* como ferramenta para bioindica o de polui o ambiental. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Lu z de Queiroz. Piracicaba.
- Arruda V. 2009. Estabilidade de vitaminas do complexo B em pólen apícola. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Bogdanof S. 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37:1–18.
- Bogdanov S. 2011a. The Bee Pollen Book. The Pollen Book Chapter 1. Bee Product Science. Switzerland. www.bee-hexagon.net, Bee Product Science, 8 May 2011
- Bogdanov S. 2011b. The Bee Pollen Book Chapter 2- Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health. Bee Product Science. Switzerland. www.bee-hexagon.net, Bee Product Science, 13 June 2011
- Bogdanov S. 2011(c). Functional and Biological Properties of the Bee Products: a Review. Bee Products Science. www.bee-hexagon.net, Bee Product Science, 1.February 2011.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, metabolism and nutritional significance *Nutritional Reviews*, 56(11): 317-333
- Campos MG. 1997. Caracteriza o do P len Apícola pelo seu Perfil em Compostos Fenólicos e Pesquisa de Algumas Actividades Biológicas. Faculdade de Farmácia Universidade de Coimbra. Coimbra
- Campos MG, Marklam KR, Mitchel KA, Cunha AP. 1997. Na Aprox to the characterisation of bee pollens via their flavonoid/fhenolic profiles. *Phytochemical Analysis*. (8):181-185.
- Campos MG, Webby PF, Marklam KR, Mitchel KA, Cunha AP. 2003. Age-Induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(3):742-745.
- Campos MG, Marklam KR.2007. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Campos MG, Almeida-Muradian L, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferreira F. 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. *Journal of Apicultural and Bee World* 47 (2); 156-163.
- Campos MG, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S. 2010. What is the future of Bee-Pollen?. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2(4): 13 –144.

Carpes S. 2008. Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas do Pólen Apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

Cook NC, Samman S. 1996. Flavonoids – Chemistry, metabolism cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. 7:66-76.

Cruz APG. 2008. Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do Açaí sobre sua composição e actividade antioxidante. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Cunha A, Campos MG. 2010. Cumarinas e Furanocumarinas. In *Farmacognosia e Fitoquímica*, Edição A. Proença da Cunha. Fundação Calouste Gulbenkian, 225-235 ISBN 972-31-1142-X 3ª edição.

Decreto-Lei n.º 1/2007 de 2 de Janeiro relativo aos processos, de registo ou de aprovação do processamento do mel e produtos apícolas.

Fernandinho J. 2002. *Tratado Prático de Apicultura*. Litema Editora. Lisboa-Porto.

Ferreira C. 2008. *Caracterização de Méis da Serra do Caramulo*. Universidade de Aveiro. Aveiro.

Ferreira MM, Oliveira AHC, Santos NS. 2008. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. *Revista Agro@mbiente On-line*, 2 (2):57-60.

FNAP, 2010. *Manual de produção de pólen e própolis*. FNAP. Lisboa.

GAP, 2010. Disponível em: http://www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN_2011_13.pdf. Consulta em: 18-08-2013.

Gomes S. 2009. *Caracterização e Avaliação Biológica de Méis Comerciais*. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança.

Hesse M, Halbritter H, Weber M, Buchner R, Frosch-Radivo A, Ulrich S. 2009. *Pollen terminology. An illustrated handbook*. SpringerWienNewYork.

Lianda R. 2009. *Perfil de Substâncias Fenólicas de Méis Brasileiros Por cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Lins ACS, Silva TMS, Câmara CA, Silva EMS, Freitas BM. 2003. Flavonóides isolados do pólen coletado pela abelha *Scaptotrigona bipunctata* (canudo). *Revista Brasileira Farmacognosia*, 13(supl 2):40-41.

Louredo P. 2013. Disponível em: <http://educador.brasilecola.com/estrategias-ensino/observacao-graos-polen.htm>. Consulta em: 16-07-2013.

Magalhães MS. 2010. *Mel e Pólen de abelhas *Apis mellifera* como bioindicadores de poluição ambiental por metais pesados*. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto.

Março, PH, Poppi RJ, Scarminio S. 2008. Procedimentos Analíticos para Identificação de Antocianinas Presentes em Extratos Naturais. *Quim. Nova*, 31(5):1218-1223.

Morais M, Moreira L, Feás X, Estevinho LM. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol*. 49(5):1096-101.

Nogueira C. 2012. *Estudo do pólen apícola comercial*. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança.

Paulo L, Antunes P, Campos MG, Anjos, O. 2012. Utilização do Teor em Metais Pesados no Pólen Como Marcador Ambiental - Estudo Preliminar. II Congresso Ibérico de Apicultura, 18-20 Setembro, Guadalajara, Espanha, p:75-76.

Ramalho M. s/d. Analisando o grão de pólen.

REGULAMENTO (CE) N.º 1881/2006 DA COMISSÃO de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

REGULAMENTO (CE) N.º 629/2008 DA COMISSÃO de 2 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

REGULAMENTO (CE) N.º 852/2004 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios.

REGULAMENTO (CE) N.º 853/2004 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.

REGULAMENTO (UE) N.º 420/2011 DA COMISSÃO de 29 de Abril de 2011 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

REGULAMENTO (UE) N.º 420/2011 DA COMISSÃO de 29 de Abril de 2011 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

Ribeiro JG, Silva RA. 2007. Estudo comparativo da qualidade de pólen apícola fresco, recém processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas. Gerência de Ensino Tecnológico – CEFET-PI.

Silva TMS, Câmara CA, Lins ACS, Filho JMB, Silva SEMF. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Comp & Analysis*. 19 (6/7) 507-511

Silva, CM. 2009. Influência do tamanho do alvéolo de cria no peso ao nascer e no comportamento de forrageamento das operárias de abelhas *Apis mellifera*. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Spurgin A. 1996. Apicultura – Coleção Habitat. Editorial Presença. Lisboa.

Vit P. 2005. *Melissopalynology Venezuela*. APIBA-CDCHT, Universidad de los Andes. Faculty of Pharmacy and Bionalysis. Food Science Department. Mérida.

