



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Identificação de Compostos Fenólicos e teor de Minerais em Pólen

Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar

Marisa Isabel Andrade Serrano

Orientadores

Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Maria Graça Campos

Maio de 2014



Identificação de Compostos Fenólicos e teor de Minerais em Pólen

Marisa Isabel Andrade Serrano

Orientadores

Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Maria Graça Campos

Dissertação apresentada ao 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 da Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos, Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e co-orientação da Doutora Maria Graça Campos Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Maio de 2014

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível de se realizar se não fosse a ajuda de todas as pessoas que colaboraram para este objectivo.

Agradeço à minha orientadora da Escola Superior Agrária de Castelo Branco a Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos pela ajuda preciosa, disponibilidade em qualquer altura, incentivo, orientação e simpatia que sempre demonstrou na realização deste trabalho.

À Doutora Maria Graça Campos Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra minha co-orientadora, por me ter recebido tão bem e por se ter prontificado sempre a me ajudar quando necessitava e pela orientação que me prestou tanto na realização do trabalho prático como na leitura dos resultados.

Agradeço também à Engenheira Graça Diogo do Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco por toda a bondade, apoio e carinho que sempre demonstrou quando eu carecia de ajuda no laboratório.

À Débora Amâncio também ela estagiária da Doutora Maria Graça Campos a desenvolver o seu trabalho em pólen na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por ter sido incansável a me explicar sempre que eu tinha dúvidas e por todo o auxílio que me deu sempre que precisava de apoio e pela paciência inesgotável.

Agradeço ao Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA) por me ter permitido usar as suas instalações nas minhas pesquisas e ao Doutor Paulo Antunes por me ter apoiado no laboratório com tanta disponibilidade e prontidão.

Aos meus pais e avós que mais uma vez fizeram tudo para que conseguisse concluir o mestrado sempre me incentivando a continuar em frente e nunca desistir.

Por último quero agradecer a duas amigas Natacha Vieira e Helena Viegas por sempre me animarem a prosseguir e concluir este trabalho.

A todos o meu grande Obrigada

Identificação de Compostos Fenólicos e teor de Minerais em Pólen

Marisa Isabel Andrade Serrano

Resumo

O pólen corresponde ao material genético masculino das flores que vai ser recolhido pelas abelhas. Este produto é rico em proteínas, aminoácidos livres, hidratos de carbono, lípidos, ácidos gordos, esteróis, vitaminas, minerais e compostos fenólicos, principalmente flavonóides.

Com o presente trabalho pretendeu-se analisar pólen de diferentes espécies vegetais, recolhido directamente nos estames e uma amostra de pólen apícola com vista à identificação de compostos fenólicos e polifenólicos. As espécies analisadas foram: *Acacia dealbata*, *Bignonia* spp., *Carpobrotus edulis*, *Coleostephus myconis*, *Crepis* spp., *Digitalis purpurea*, *Galactites tomentosus*, *Lavatera* spp., *Ligustrum* spp., *Melaleuca* spp., *Olea europaea* L., *Opuntia* spp., *Papaver rhoeas*, *Silybum marianum*, *Tilia* spp. e *Viburnum tinus*. Foi efectuada a acetólise dos diferentes polens para aquisição de imagens e posterior integração na colecção da ESA para identificação.

Após a análise microscópica, foram preparados os extractos das espécies vegetais e das cargas polínicas para determinação dos perfis cromatográficos dos compostos fenólicos e flavonóides através de cromatografia líquida com detector de díodos (HPLC/DAD).

Verificou-se que cada espécie analisada apresentava um perfil característico e diferente de espécie para espécie, como já tinha sido descrito por outros autores. Os compostos identificados para além de flavonas são essencialmente derivados de ácidos fenólicos maioritariamente derivados do cafeico, heterosídicos da quercetina em C3-O, do canferol, da isoramnetina, da herbacitina e da miricitina com o mesmo padrão de substituição em C3, foram ainda detectados derivados da dihidroflavonol e de naringenina-chalcona. Nas espécies *Acacia dealbata* e *Viburnum tinus* foram encontrados compostos ainda não identificados, pelo que serão alvo de estudos posteriores.

A análise do pólen apícola revelou a presença dos mesmos compostos encontrados nas amostras de pólen recolhidos directamente dos estames das flores.

Foi também feita a análise dos minerais Cádmio, Cobre, Crómio, Chumbo, Ferro, Manganês, Zinco e Níquel por espectrometria de emissão do plasma (ICP-OES) às amostras de pólen anteriormente referidas. Verificou-se que o género *Bignonia* spp. apresentava elevados valores de todos os minerais em análise em comparação com as restantes amostras.

O pólen das espécies estudadas é rico em compostos fenólicos tendo de se continuar este estudo para se ter a caracterização de cada espécie e para identificação de alguns compostos que ainda não estão identificados.

Palavras chave

Pólen Apícola, Espécies Vegetais, Compostos Fenólicos, Flavonoides, Minerais

Phenolic Compounds Identification and Mineral content in Pollen

Marisa Isabel Andrade Serrano

Abstract

The pollen corresponds to the male genetic material of the flowers that will be collected by bees. This product is rich in proteins, free aminoacids, carbohydrates, lipids, fatty acids, sterols, vitamins, minerals and phenolic compounds, particularly flavonoids.

The present work was intended to analyze pollen from different plant species, collected directly of stamens and bee pollen for the identification of phenolic and polyphenolic compounds. The species analyzed were: *Acacia dealbata*, *Bignonia* spp., *Carpobrotus edulis*, *Coleostephus myconis*, *Crepis* spp., *Digitalis purpurea*, *Galactites tomentosus*, *Lavatera* spp., *Ligustrum* spp., *Melaleuca* spp., *Olea europaea* L., *Opuntia* spp., *Papaver rhoeas*, *Silybum marianum*, *Tilia* spp. and *Viburnum tinus*. Acetolysis was performed at the various pollens for image acquisition and subsequent integration of the ESA in the collection for identification.

After the microscopic analysis, the extracts of plant species and bee pollen loads for determining the chromatographic profiles of flavonoids and phenolic compounds by liquid chromatography with diode array detector (HPLC/DAD) were prepared.

It was found that each species had a distinctive and different from species to species profile, as already described by other authors. Compounds identified beyond flavones are essentially derived mainly phenolic acids derived from caffeic, of quercetin heterosidics C3-O, of Kaempferol, of isorhamnetin, of herbacitin and miricitin, with the same substitution pattern in C3, was also detected dihydrofavonol and naringenin-chalcone derivatives. In species *Acacia dealbata* and *Viburnum tinus* compounds were found not yet identified, so that will be the target of future studies.

The bee pollen analysis revealed the presence of the same compounds found in pollen samples collected from the stamens of flowers.

The analysis was also made of mineral cadminum, copper, chromium, leas, iron, manganese, zinc and nickel by plasma emission spectrometry (ICP-OES) to pollen samples mentioned above. It was found that gender *Bignonia* spp. elevated levels of all the minerals in question in comparison with the other samples.

The pollen of the studied species is rich in phenolic compounds having to continue this study to have the characteristics of each species and to identify some compounds that are not yet identified.

Keywords

Bee Pollen, Plant Species, Phenolic Compunds Flavonoids, Minerals

Índice geral

Agadecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice Geral	IX
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XIII
1. Introdução	1
2. Pólen	3
2.1. Importância do Pólen	3
2.2. Importância do pólen para as abelhas	4
2.3. Importância do pólen como suplemento alimentar	6
3. Constituintes do Pólen	7
3.1. Flavonóides	7
3.2. A importância na alimentação e saúde	11
4. Material e Métodos	15
4.1. Amostragem	15
4.2. Análise palinológica	19
4.3. Identificação dos compostos por HPLC/DAD	19
4.4. Análise do conteúdo em minerais	20
5. Resultados e Discussão	22
5.1. Recolha do pólen directamente dos estames	22
5.1.1. <i>Acacia dealbata</i>	22
5.1.2. <i>Bignonia</i> spp.	25
5.1.3. <i>Carpobrotus edulis</i>	27
5.1.4. <i>Coleostephus myconis</i>	29
5.1.5. <i>Digitalis purpúrea</i>	31
5.1.6. <i>Galactites tomentosus</i>	32
5.1.7. <i>Lavatera</i> spp.	33
5.1.8. <i>Ligustrum</i> spp.	35
5.1.9. <i>Melaleuca</i> spp.	36
5.1.10. <i>Olea europaea</i> L.	39
5.1.11. <i>Opuntia</i> spp.	40
5.1.12. <i>Papaver rhoeas</i>	42
5.1.13. <i>Silybum marianum</i>	43

5.1.14. <i>Tilia</i> spp.	45
5.1.15. <i>Viburnum tinus</i>	46
5.2. Recolha de pólen apícola da região centro do país	48
5.2.1. Pólen Apícola de <i>Echium</i> spp.	48
5.2.2. Pólen Apícola de <i>Reseda</i> spp.	50
5.2.3. Pólen Apícola de <i>Crepis</i> spp.	51
5.2.4. Pólen Apícola de <i>Olea europea</i> L.	53
5.2.5. Pólen Apícola de <i>Raphanus</i> spp.	55
5.2.6. Pólen Apícola de <i>Trifolium repens</i>	57
5.2.7. Pólen Apícola carga polínica “CZ”	58
5.2.8. Pólen Apícola carga polínica “LC”	60
5.2.9. Pólen Apícola carga polínica “LE”	62
5.2.10. Pólen Apícola da carga polínica “R”	64
5.2.11. Pólen Apícola de <i>Galactites tomentosus</i>	65
5.3. Análise dos Minerais	67
6. Considerações Finais	69
7. Referências Bibliográficas	71

Anexo

Índice de figuras

Figura 1. Representação da estrutura dos grãos de pólen	4
Figura 2. Representação da estrutura básica e do sistema usado para numerar os carbonos do núcleo flavonoide	8
Figura 3. Pólen com estames a secar à temperatura ambiente	15
Figura 4. Recolha do pólen.	16
Figura 5. <i>Eppendorfs</i> com pólen de diferentes espécies vegetais	16
Figura 6. Separação do pólen apícola consoante as cores apresentadas por este	18
Figura 7. Lâminas prontas para serem observadas ao microscópio	19
Figura 8. Cromatograma da <i>Acacia dealbata</i>	23
Figura 9. Cromatograma da <i>Bignonia</i> spp.	25
Figura 10. Cromatograma do <i>Carpobrotus edulis</i>	27
Figura 11. Cromatograma do <i>Coleostephus myconis</i>	29
Figura 12. Cromatograma da <i>Digitalis purpurea</i>	31
Figura 13. Cromatograma da <i>Galactites tomentosus</i>	32
Figura 14. Cromatograma da <i>Lavatera</i> spp.	33
Figura 15. Cromatograma do <i>Ligustrum</i> spp.	35
Figura 16. Cromatograma da <i>Melaleuca</i> spp.	36
Figura 17. Cromatograma da <i>Olea europea</i> L.	39
Figura 18. Cromatograma da <i>Opuntia</i> spp.	40
Figura 19. Cromatograma da <i>Papaver rhoeas</i>	42
Figura 20. Cromatograma da <i>Silybum marianum</i>	43
Figura 21. Cromatograma da <i>Tilia</i> spp.	45
Figura 22. Cromatograma do <i>Viburnum tinus</i>	46
Figura 23. Cromatograma do pólen apícola de <i>Echium</i> spp.	48
Figura 24. Cromatograma do pólen apícola de <i>Reseda</i> spp.	50
Figura 25. Cromatograma do pólen apícola de <i>Crepis</i> spp.	51
Figura 26. Cromatograma do pólen apícola de <i>Olea europea</i> L.	53
Figura 27. Cromatograma do pólen apícola de <i>Raphanus</i> spp.	55
Figura 28. Cromatograma do pólen apícola de <i>Trifolium repens</i>	57
Figura 29. Cromatograma do pólen apícola carga polínica “CZ”	58

Figura 30. Cromatograma do pólen apícola carga polínica “LC”	60
Figura 31. Cromatograma do pólen apícola carga polínica “LE”	62
Figura 32. Cromatograma do pólen apícola da carga polínica “R”	64
Figura 33. Cromatograma do pólen apícola de <i>Galactites tomentosus</i>	65

Lista de tabelas

Tabela 1. Nome científico, imagem e coordenadas das espécies vegetais utilizadas na recolha de pólen	17
Tabela 2. Toma em grama pesada para as 12 amostras e dos 2 duplicados	21
Tabela 3. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Acacia dealbata</i>	23
Tabela 4. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Bignonia</i> spp.	26
Tabela 5. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do <i>Carpobrotus edulis</i>	27
Tabela 6. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do <i>Coleostephus myconis</i>	29
Tabela 7. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Digitalis purpurea</i>	31
Tabela 8. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Galactites tomentosus</i>	33
Tabela 9. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Lavatera</i> spp.	34
Tabela 10. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do <i>Ligustrum</i> spp.	35
Tabela 11. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Melaleuca</i> spp.	37
Tabela 12. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Olea europea</i> L.	40
Tabela 13. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Opuntia</i> spp.	41
Tabela 14. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Papaver rhoeas</i>	42
Tabela 15. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do <i>Silybum marianum</i>	44
Tabela 16. Espetros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da <i>Tilia</i> spp.	45
Tabela 17. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do <i>Viburnum tinus</i>	47

Tabela 18. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola <i>Echium</i> spp.	49
Tabela 19. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da <i>Reseda</i> spp.	51
Tabela 20. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da <i>Crepis</i> spp.	52
Tabela 21. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da <i>Olea europea</i> L.	54
Tabela 22. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da <i>Raphanus</i> spp.	56
Tabela 23. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola de <i>Trifolium repens</i>	57
Tabela 24. Espetros de absorção com os seus respetivos composto/estrutura do pólen apícola carga polínica “CZ”	59
Tabela 25. Espetros de absorção com os seus respetivos composto/estrutura do pólen apícola carga polínica “LC”	61
Tabela 26. Espetros de absorção com os seus respetivos composto/estrutura do pólen apícola carga polínica “LE”	63
Tabela 27. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da carga polínica “R”	64
Tabela 28. Espetros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola de <i>Galactites tomentosus</i>	66
Tabela 29. Limites de quantificação para os metais analisados	67
Tabela 30. Resultados dos minerais da análise elaborada às amostras	67

1. Introdução

O consumo de produtos derivados das plantas é uma prática antiga. Os antigos egípcios descrevem o pólen como “um pó que dá a vida”. Na Grécia antiga os grãos de pólen que as abelhas têm nas corbículas situadas nas patas foram consideradas como sendo feitas de cera. Aristóteles na História da Observação dos animais observa que os grãos de pólen das abelhas se assemelham a cera na dureza mas designava-as como sendo o pão da abelha (Campos *et al*, 2010; Bogdanov, 2012).

Também na Bíblia vem referenciado o consumo de pólen e os pais da medicina ocidental como Hipócrates, Plínio e Pitágoras confiavam nas qualidades curativas do pólen das abelhas, que muitas vezes prescreviam como remédio aos seus pacientes (Campos *et al*, 2010). Algumas das razões que motivou as pessoas nos tempos antigos a usar o pólen das abelhas permanecem os mesmos até hoje (Silva *et al*, 2006).

A palavra Pólen (palavra latina para farinha ou pó) foi usada pela primeira vez por John Ray na *Historia plantarum* em 1686 (citado em Campos *et al*, 2010 e Bogdanov, 2012) e os primeiros trabalhos sobre o mecanismo do pólen foram realizados por Meehan em 1873 (citado em Bogdanov, 2012).

Ao determinar – se a presença de pólen nos sedimentos do solo foi possível obter informações sobre a história da vegetação na Terra. Contudo a verdadeira importância do pólen começou com estudos ao mel, nomeadamente com a determinação da origem do mel no início do século XX (Bogdanov, 2012).

Mas a utilização em maior escala de pólen para a nutrição humana só começou após a segunda Guerra Mundial, quando as armadilhas de pólen foram desenvolvidas (Campos *et al*, 2010).

Os estudos centrados na composição do pólen têm aumentado, devido ao facto de apresentar propriedades importantes e benéficas ao nível da alimentação e da saúde, e segundo Silva *et al* (2006), até ao momento, nenhuma evidência científica tem sido citada para refutar as propriedades reivindicadas pelo pólen apícola. Devido a este facto vários autores dedicam-se a estudar estas propriedades de forma a criar uma legislação e rotulagem própria para o pólen, bem como provar que pode existir alegações nutricionais e de saúde para este produto da colmeia.

Os antioxidantes naturais e os seus benefícios para a saúde têm sido amplamente estudados no Pólen. Os compostos antioxidantes são considerados possíveis agentes de protecção, que reduzem danos oxidativos em biomoléculas importantes como lipoproteínas e ácido desoxirribonucleico (ADN) (Mărghitas *et al*, 2009).

Há cada vez mais evidências epidemiológicas, *in vivo*, *in vitro* e ensaios clínicos que sugerem que os compostos polifenólicos presentes em alimentos naturais podem reduzir o risco de doenças crónicas como o cancro, doenças anti-inflamatórias, cardiovasculares e doenças neuro-degenerativas. Os compostos fenólicos, como os flavonóides, ácidos fenólicos e taninos são considerados como os principais

contribuintes para o potencial antioxidante dos alimentos (Cabrera *et al*, 2012; Mărghitas *et al*, 2009).

A propriedade mais descrita em quase todos os grupos de flavonóides, predominantes na classe fenólica, presente no pólen apícola, é a capacidade de actuar como antioxidante (Mărghitas *et al*, 2009). Na última década a atenção têm sido focada nesse grupo (Silva *et al*, 2006) e assim, pode-se afirmar que o pólen apícola, além de possuir outros compostos importantes, é constituído por substâncias essenciais para a saúde, como proteínas, lípidos e glúcidos, apresentando um conteúdo importante de minerais, vitaminas e compostos fenólicos, principalmente flavonóides que podem actuar como antioxidantes entre várias outras bioactividades (Kacániová *et al*, 2013; Leja *et al* 2007; Nagai *et al*, 2005; Almaraz-Abarca *et al*, 2004; Kroyer e Hegedus, 2001).

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

Os níveis dos diferentes constituintes no pólen são dependentes de vários factores, incluindo as propriedades genéticas das plantas, a natureza do solo onde a planta vegeta, condições climáticas e o grau de maturidade das plantas durante a colheita. Existem variações regionais nas concentrações de metais até nos mesmos grupos de plantas e vegetais. As variações espaciais podem ser explicadas pelas diferentes estruturas geoquímicas dos solos. Os minerais presentes no pólen, como o ferro, chumbo, cobre, entre outros, têm os seus teores variáveis, devido a factores como a diferença entre as espécies de plantas, a área geográfica de cada planta e más práticas de processo de secagem a que o pólen é submetido (Harmanescu *et al*, 2007).

Dada a importância do pólen, bem como de alguns dos seus constituintes, foi desenvolvido este trabalho de mestrado com o objectivo de traçar o perfil de compostos fenólicos e flavonóides em extractos etanólicos e avaliar o conteúdo em minerais (cádmio, crómio, ferro, zinco, manganés, cobre e chumbo) de amostras seleccionadas de pólen apícola da espécie *Apis mellífera*, e pólen recolhido directamente de algumas espécies vegetais, para se perceber se existem diferenças não só entre plantas como também entre pólen apícola e o pólen que se colhe directamente da flor.

Este trabalho foi desenvolvido em três partes diferentes. Inicialmente procedeu-se à recolha do pólen das espécies vegetais e do pólen apícola. De seguida realizou-se a identificação polínica com recurso a microscopia óptica do pólen apícola bem como à aquisição de imagens do pólen por microscopia óptica, para o banco polínico, das espécies vegetais.

Em seguida foi elaborada a determinação dos compostos fenólicos e flavonóides totais por cromatografia líquida com detector de diodos (HPLC/ DAD) e por fim foi realizada a análise de minerais por espectrometria de emissão de plasma (ICP-OES).

2. Pólen

2.1. Estrutura do Pólen

O pólen é o material genético masculino das flores (Harmanescu *et al*, 2007), encontra-se nas anteras das plantas designadas de superiores. São assim designadas uma vez que são plantas que possuem flores. Os grãos de pólen são incrivelmente complexos e diferentes do tipo de célula para tipo de célula, mas fundamentalmente são iguais (Dafni *et al*, 2000).

Os grãos de pólen formam-se nas anteras a partir das células mães dos mesmos. Estas células possuem um núcleo diplóide volumoso, que por meiose sofrem duas divisões sucessivas, produzindo quatro núcleos, dos quais resultam quatro células com núcleos haplóides, que após citocinese se formam quatro micrósporos que são designados grãos de pólen. Estes encontram-se rodeados por uma parede, a esporoderme, que protege o protoplasto. Esta parede protectora é constituída por duas camadas, interna e externa, chamadas de intina e de exina sucessivamente (Campos, 1997).

A camada interna, a intina, é a camada viva rica em celulose (Bogdanov, 2012), que contacta directamente com o protoplasto polínico. A sua função é a de protecção complementar da exina, principalmente quando esta apresenta fendas ou poros. Tal como o protoplasto a intina desaparece completamente quando é destruída pela acetólise (Campos, 1997).

A acetólise é uma técnica proposta por Erdtman em 1969. É usada para a análise dos grãos de pólen, pois oferece uma excelente visualização da exina, a camada externa do grão de pólen, que contém os principais componentes morfológicos necessários à caracterização dos grãos de pólen. A maior desvantagem desta técnica é que a camada interna do grão de pólen, a intina, é destruída, deformando o grão de pólen (Terradillos *et al*, 1994).

A camada externa, a exina, é composta em grande parte por esporopolenina, (Bogdanov, 2012), um copolímero oxidativo de carotenos e ésteres de carotenos muito resistente aos processos de degradação química não oxidativa. Na sua estrutura a exina é composta por fenóis, que segundo vários autores é dividida por duas subcamadas, a interna designada por endexina que entra em contacto com a intina, e a externa, chamada ectexina (Campos, 1997; Wodehouse, 1928; Clarke *et al*, 1979).

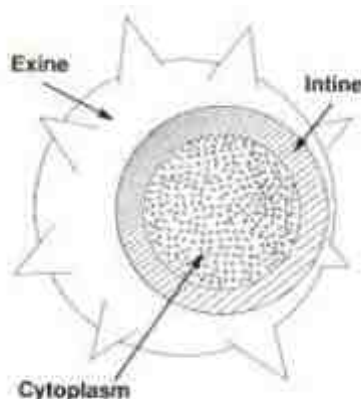


Figura 1 – Representação da estrutura dos grãos de pólen (Bogdanov, 2012).

A esporoderme dos grãos de pólen, normalmente apresenta roturas, que são designadas de aberturas (Campos, 1997). Uma região na parede do pólen que difere significativamente do resto da morfologia e/ou anatomia da parede do grão de pólen, presumindo-se funcionar como o local de germinação (Hesse *et al*, 2009; Kessler e Harley, 2009) pois corresponde às áreas de saída do tubo polínico (Campos, 1997). O número de aberturas nos grãos de pólen varia consoante a espécie de planta, existem grãos de pólen que apresentam uma abertura enquanto outros podem apresentar várias (Kessler e Harley, 2009). Além das variações da esporoderme também a forma, a simetria e o tamanho do grão de pólen são importantes para a sua caracterização. Por exemplo o tamanho do pólen pode ser diverso (Campos, 1997). A maioria dos grãos de pólen apresenta tamanho entre os 20 e os 80 μm (Kessler e Harley, 2009), podendo no entanto existir pólenes mais pequenos que podem ter menos de 2,5 μm , enquanto os maiores podem ser vistos a olho nu (Campos, 1997).

Embora as diferenças nos grãos de pólen não sejam completamente notórias a olho nu é possível observá-las ao microscópio e assim avaliar as características que os grãos de pólen têm de diferente de espécie para espécie de flor. As abelhas do mel, a *Apis mellifera* a partir do pólen recolhido das flores misturado com pequenas quantidades de néctar e secreções salivares, produzem o pão de abelha que vai ser a principal fonte de compostos azotados para as abelhas adultas, as larvas e para a abelha rainha, podendo mesmo levar ao extermínio da colmeia com a sua ausência (Harmanescu *et al* 2007).

2.2. Importância do Pólen para as Abelhas

Os grãos de pólen das plantas são de longe a fonte mais importante de proteínas e aminoácidos livres (Paramás *et al*, 2006), hidratos de carbono (30-55%), lípidos inclusive ácidos gordos e esteróis (1-20%), vitaminas e minerais, carotenóides, flavonóides, fitoesteróis, polifenóis e outros compostos benéficos (Kacániová *et al*,

2013; Leja *et al*, 2007; Nagai *et al*, 2005; Almaraz-Abarca *et al*, 2004; Kroyer e Hegedus, 2001). Estes compostos são essenciais ao normal crescimento e desenvolvimento das abelhas, sendo estes constituintes a fonte principal, dado que as abelhas vão obter as proteínas e lípidos necessários ao seu desenvolvimento a outras fontes de alimento (Dobson e Ying-Shin Peng, 1997).

O pólen vai ser muito importante na manutenção da colmeia uma vez que também promove o desenvolvimento do ovário e dos ovos (Human *et al*, 2007; Human *et al*, 2006). Segundo Human *et al* (2006) isto significa que a quantidade e a qualidade de pólen apanhado pelas abelhas afectam a reprodução, a criação de larvas, a longevidade e a produtividade da colónia.

Para a colheita do pólen, este é apanhado pelas fêmeas adultas (Dobson e Ying-Shin Peng, 1997), que vão abrir, por vezes, as anteras com as mandíbulas e agregar o pólen com o auxílio do néctar. Com o primeiro par de patas a abelha limpa o pólen de toda a parte anterior do corpo e junta-o no açafate das patas traseiras. O pólen é assim agrupado sobre uma escova que se encontra na primeira articulação do tarso das patas posteriores. Com o segundo par de patas recolhe o pólen que se encontra no tórax e na região ventral (Campos, 1997).

Cada recolha de pólen incide quase sempre sobre uma espécie de flores, porém as abelhas, podem misturar diversos pólenes na mesma carga polínica numa fraca proporção de geralmente menos de 1%. As cargas polínicas são por isso consideradas “puras” (Campos, 1997).

Contudo o comportamento da apanha do pólen por parte das abelhas ainda não é muito conhecido, tratando-se de um tópico muito importante na compreensão da polinização. A capacidade que as abelhas têm de avaliar a qualidade do pólen e de aprender quais as flores que não oferecem néctar ainda não foi estudada. As abelhas preferem alimentar-se do pólen de certas espécies de flores, fazendo visitas mais frequentes às plantas que produzem pólen de alta qualidade (Arenas e Farina, 2012). A composição química do pólen têm sido apontada como o factor chave para a avaliação do pólen pelas abelhas adultas, daí a capacidade destas em reconhecer as plantas que produzem o pólen preferido. Segundo testes efectuados à capacidade de decisão das abelhas sobre o pólen a recolher, esta decisão é feita através da avaliação do odor que o pólen emite (Arenas e Farina, 2012; Dobson e Ying-Shin Peng, 1997).

O valor nutritivo do pólen para as abelhas parece depender da composição química do pólen e do órgão digestivo do insecto (Dobson e Ying-Shin Peng, 1997), pois para as abelhas quando o pólen é recolhido vão acrescentar néctar, mudando a estrutura das paredes, a composição nutricional do pólen e ainda hidratando-o. Assim as concentrações de proteína no pólen fresco e no pólen recolhido pelas abelhas variam. Essa diferença encontra-se entre os 2,5% e a massa seca em 60% (Human *et al*, 2007).

2.3. Importância do Pólen como Suplemento Alimentar

O consumo de produtos naturais e de suplementos nutricionais ganhou um maior destaque nas últimas duas décadas.

Entre estes produtos encontra-se o mel e os produtos apícolas em geral, como é o caso do pólen. Estes produtos foram usados durante séculos na medicina tradicional como alimento e suplementos nutricionais devido às suas propriedades nutricionais e fisiológicas, sobretudo no que diz respeito ao equilíbrio entre os seus constituintes e o seu efeito sobre o organismo humano (Kroyer e Hegedus, 2001). Nos nossos dias, o pólen é cada vez mais usado como suplemento alimentar e é actualmente comercializado na Europa e amplamente na Ásia como um tónico, principalmente para os idosos, com o objectivo de minimizar os efeitos do envelhecimento (Graikou *et al*, 2011 e Campos *et al*, 1997). Além disso, tem havido uma tendência crescente para estudar o pólen como um produto natural e de suplementação nutricional, devido à sua alta qualidade nutricional, tornando-se cada vez mais num produto de grande interesse comercial (Di Paola-Naranjo *et al*, 2004).

O consumo de pólen apícola, bem como as suas excelentes propriedades, está amplamente difundido noutros países, mas em Portugal é ainda pouco consumido e pouco divulgado relativamente à importância das suas características.

Apenas em alguns países como o Brasil, Suíça e Argentina, o pólen apícola é legalmente reconhecido como um suplemento alimentar e consequentemente com padrões estabelecidos e limites de qualidade oficiais. É ainda considerado um produto saudável, por isso continua a ser vendido em muitas lojas de produtos dietéticos. Foi em 1994, nos Estados Unidos que o pólen foi definido pela Lei de Saúde e Educação como um suplemento dietético utilizado para complementar a dieta, pois aumenta a ingestão alimentar total (Kroyer e Hegedus, 2001), mas em contrapartida, a Food and Drug Administration (FDA) até aos dias de hoje nunca considerou o pólen como sendo um aditivo alimentar (Almeida-Muradian *et al*, 2005), acontecendo a mesma realidade na Europa com a European Food Safety Authority (EFSA).

Como o pólen apícola não foi reconhecido como aditivo alimentar ou suplemento alimentar pelas autoridades de segurança alimentar FDA e EFSA, este não possui limites de qualidade e normas de composição (Almeida-Muradian *et al*, 2005). Até ao momento não há nenhuma norma internacional que defina os requisitos da composição do pólen. No entanto, o grupo do pólen da *International Honey Commission* - IHC, está a trabalhar a fim de estabelecer uma norma internacional para o pólen apícola, culminando numa revisão da composição do pólen apícola e numa proposta para uma norma (Campos *et al*, 2010).

O pólen contém hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, lípidos, gorduras, vitaminas, cinzas, minerais, oligoelementos quantidades significativas de polifenóis,

mais propriamente flavonóides, que são considerados agentes protectores (Šaric' *et al*, 2009 e Kroyer_e Hegedus, 2001).

Segundo Campos (1997) a composição química do pólen apícola compreende cerca de 50% de polissacarídeos, 4-10% de oses, 1-20% de lípidos, 6-28% de proteínas, 6% de aminoácidos, além de uma série de metabolitos secundários como flavonóides, carotenóides, terpenos, etc. Dos carotenóides, os carotenos variam de 50 a 150 mg/kg e de 150 a 400 mg/kg. No entanto, quando a quantidade de carotenóides é pequena são os flavonóides que predominam. Segundo alguns autores os pólenes das plantas anemófilas são mais ricos em carotenóides.

O pólen das Angiospérmicas são mais ricas em vitaminas do grupo B, como a tiamina (B1), riboflavina (B2), nicotinamida (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6) e biotina (B8). Inclui ainda quantidades significativas de sais minerais como potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganésio, cobre, fósforo, silício, enxofre, cloro e fitohormonas (Campos, 1997; Paulo *et al*, 2012).

Tendo em conta as propriedades que o pólen apícola apresenta é amplamente usado na medicina alternativa/complementar e como suplemento alimentar em determinadas dietas. Este produto possui um elevado teor proteico, com valores médios de 35%, sendo que cerca de metade é sob a forma de ácidos aminados livres. Alguns autores indicam que o pólen apícola completa as necessidades mínimas do organismo humano nos aminoácidos essenciais, através de uma dose média/diária de 15 g (Campos, 1997).

Segundo Kroyer e Hegedus (2001) as quantidades significativas de polifenóis, principalmente flavonóides, que são considerados como as substâncias principais do pólen apícola, podem ser usadas como indicadores na criação de padrões de qualidade em relação às propriedades nutricionais, fisiológicas e de controlo de qualidade do produto que é distribuído comercialmente.

3. Constituintes do Pólen

3.1. Flavonóides

Nas últimas décadas os cientistas têm focado a sua atenção na investigação do pólen apícola, nomeadamente na sua origem botânica, composição química e valor nutricional. Os resultados obtidos permitiram estudos continuados sobre os perfis fenólicos (Campos *et al*, 2003), e mais recentemente com o objectivo de estabelecer Padrões Internacionais de Qualidade. Estes são de fundamental importância pois é uma forma de garantir a segurança e também a eficácia do pólen apícola, tendo como base um fundo científico confiável a apoiar a sua comercialização em todo o mundo e claro justificando o porquê do seu uso com potencial terapêutico e ainda como suplemento alimentar. De acordo com a composição do pólen ficou claro que este tem muitas potencialidades de bioactividade (Lopes *et al*, 2010).

Os polifenóis despertaram o interesse nos cientistas porque são essenciais à fisiologia das plantas, contribuindo em várias funções, nomeadamente na protecção dos raios ultravioleta. No pólen, a sua função é mais abrangente e os perfis polifenólicos dos mesmos são espécie-específicos diferindo entre espécies do mesmo género permitindo o seu uso na identificação das mesmas (Campos *et al*, 1997). Assim sendo os polifenóis, tem vindo a ser estudados com propósito taxonómico ou para determinar adulterações em produtos alimentares (Bravo, 1998).

Os polifenóis têm diferentes aplicações industriais, tais como na produção de tintas, papel, cosméticos, agentes de bronzamento e na indústria alimentar como aditivos, isto é, corantes naturais e conservantes. Em comparação, alguns compostos fenólicos, como os flavonóides, têm aplicações em antibióticos, antidiarreicos, anti ulcerosos e agentes anti-inflamatórios, tal como, no tratamento de certas doenças como hipertensão, fragilidade vascular, alergias, hipercolesterolemia e outras (Bravo, 1998; Lopes *et al*, 2011).

Entre os mais comuns e importantes compostos fenólicos de peso molecular baixo estão os derivados fenólicos simples e os flavonóides. Os flavonóides representam o grupo mais comum e amplamente distribuído de compostos fenólicos de plantas. A estrutura mais comum é o difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) e consiste em dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que normalmente formam um heterociclo oxigenado (Bravo, 1998).

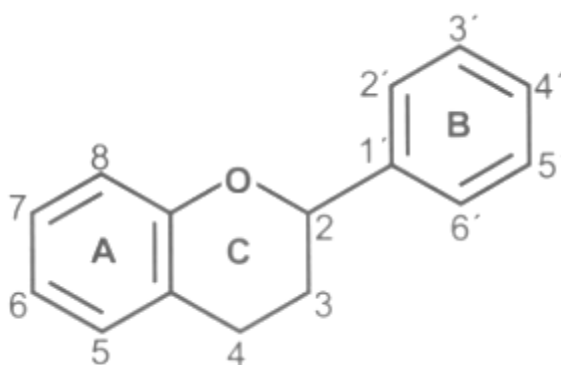


Figura 2 – Representação da estrutura básica e do sistema usado para numerar os carbonos do núcleo flavonóide (Bravo, 1998).

Segundo Cook e Samman (1996) foram identificados mais de 4000 tipos de compostos flavonóides em plantas vasculares e estes variam em tipo e quantidade devido a variações no crescimento da planta, condições e maturidade. Apenas um pequeno número de espécies de plantas tem sido examinado sistematicamente no que concerne ao seu teor de flavonóides e como consequência a identificação e quantificação de todos os tipos de flavonóides consumidos pelos seres humanos ainda é incompleta. As plantas evoluíram para produzir flavonóides de forma a

protegerem-se contra parasitas fúngicos, herbívoros, patogénicos e oxidação das células lesionadas.

Assim, sabendo qual a função dos flavonóides nas plantas é necessário saber qual a sua função dentro do organismo humano, para isso vários cientistas tem estudado os produtos de colmeia, particularmente o pólen apícola que apresenta um conteúdo fenólico muito variável mas espécie-específico com atrás foi referido.

O pólen apícola é um produto com valor acrescentado, que pode trazer vários benefícios à saúde, tal como temos vindo a descrever, devido aos seus principais compostos biologicamente activos, que incluem, também os derivados fenólicos, tais como os flavonóides. Estes compostos apresentam o perfil específico de cada espécie floral, permitindo que seja possível a identificação da origem botânica, sugerindo portanto, que o seu valor terapêutico e as suas propriedades antioxidantes são tão variáveis como o seu conteúdo fenólico. De acordo com o papel desempenhado pelo pólen na reprodução das plantas, este deve dispor de um método eficiente para proteger o ADN, contra as condições ambientais, especialmente à exposição dos raios ultravioleta (Lopes *et al*, 2011). Assim, os ácidos fenólicos e os flavonóides, segundo Lopes *et al* (2011), são encontrados principalmente na superfície da parede do pólen para proteger o protoplasma contra as radiações e danos de agentes microbiológicos e químicos.

Os flavonóides são capazes de exercer as suas propriedades antioxidantes por vários mecanismos de acção, que incluem a capacidade “scavenger” de radicais, propriedades quelantes nos metais, interacções sinérgicas com antioxidantes endógenos, etc. Todos os compostos fenólicos têm um papel importante nas propriedades de bioactividade, dando maior ênfase à capacidade antioxidante do pólen apícola (Lopes *et al*, 2011).

Os flavonóides apresentam ainda a capacidade de proteger contra agentes microbiológicos. Em várias publicações tem sido descrita a capacidade que diferentes flavonóides de várias espécies de plantas que têm actividade antimicrobiana relativamente a, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp* (Carpes, 2007) e propriedades antifúngicas contra diferentes agentes patogénicos (Bogdanov, 2011). Em relação à bioactividade antioxidante do pólen, ficou demonstrado que o stress oxidativo contribui para o desenvolvimento de doenças crónicas e degenerativas, como o cancro, doenças auto-imunes, o envelhecimento, as cataratas, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares e doenças neuro degenerativas (Pham-Huy *et al*, 2008), e que os antioxidantes são moléculas capazes de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas, evitando certas mudanças que podem levar a estas doenças. Em vários estudos foi avaliada a estreita relação entre os compostos fenólicos e a bioactividade antioxidante do pólen (Campos *et al*, 2003), no entanto, a relação entre estes dois parâmetros ainda não é clara. Constatou-se também que esta actividade é específica de cada espécie, independentemente da sua origem geográfica (Campos, 1997; Bogdanov, 2011).

Graças à actividade antioxidante do pólen existe um outro efeito esperado por parte deste, nomeadamente um efeito anti-irradiação (Pham-Huy *et al*, 2008). Ao se expor ratos, que receberam na sua alimentação pólen apícola, a pequenas doses de irradiação (que afectam o fígado), observa-se uma normalização de várias enzimas do fígado. Segundo Bogdanov (2011) os flavonóides presentes no pólen como a quercetina, e derivados de crisina apresentam uma actividade quimio-preventiva, isto significa que estes flavonóides aumentam a apoptose (morte celular), podendo deste modo actuar como prevenção no cancro. Já o ácido hidroxámico com actividade *in vitro* contra algumas linhas celulares tumorais é provavelmente um composto activo do pólen nas espécies florais que constituem o produto Certinina®, que parece ser responsável pelo alívio sintomático em doentes com hiperplasia benigna da próstata. Neste estudo os autores citados por Bogdanov (2011) avaliaram 69 doentes com idades entre os 62 e 89 anos que apresentavam esta doença, e que foram tratados com extracto de pólenes (produto registado), o que resultou num efeito benéfico no volume da próstata e na micção.

A quercetina como anteriormente referida é um dos principais flavonóides do pólen apícola, encontrando-se substituída quase sempre em C3 por cadeias osídicas, para além de poder ser substituída nos hidroxilos do anel B, em C3' e C4', assim como em C7 no anel A. Este composto, muito frequente na natureza, apresenta uma inibição permanente *in vitro* nas células PC-3 de cancro andrógeno-independente com a dose de 100 µM. Em células de cancro da próstata esta actividade é devida à capacidade da quercetina, em bloquear o ciclo celular em várias fases através da inibição da expressão de vários genes específicos. Além dessa capacidade a quercetina também regula a expressão de vários genes que têm a capacidade de suprimir tumores (citado em Bogdanov, 2011). Shoskes (2002), refere que doentes com problemas de próstata que tomavam quercetina (500 mg em 2 horas por dia durante 4 semanas) mostravam uma melhoria significativa nos sintomas de prostatite crónica e que 67% dos doentes a tomar quercetina tinham uma diminuição significativa dos sintomas.

Tal como a quercetina também os seus heterósidos em C3 são componentes do pólen, e alguns já estudados apresentam propriedades anti tumorais semelhantes às da quercetina. Estas substâncias são reconhecidas como já referido por agir facilitando a apoptose (morte celular) e assim, atrasar o crescimento do cancro (Khan *et al*, 2007). Neste estudo de Khan, *et al.*, é citada a rutina enquanto, quercetina-3-O-heterósido. Porém a ligação 1-6 entre as oses que substituem os flavonóides no pólen apenas aparece descrita em artigos cuja identificação dessas estruturas foi feita por co-injecção ou por LC-MS, nenhuma delas sendo eficaz para esta avaliação, Em todos os outros em que os compostos foram isolados e a estrutura determinada por RMN as ligações são 1-2. Assim sendo não se deve assumir a existência de rutina no pólen mas possivelmente do seu similar estrutural em que a ligação em vez de 1-6 poderá ser 1-2, não invalidando nenhum resultado de bioactividade dado que não é dependente desta ligação (Markham et Campos, 1997).

O canferol, outro flavonóide do pólen apícola, causa uma inibição reversível das células PC-3 de cancro em crescimento (Hari *et al*, 2004).

Segundo Medeiros *et al* de 2008, citado por Bogdanov (2011), o pólen que existe no ar, não é polinizado pelas abelhas e pertence a outro grupo de plantas as anemófilas e é conhecido por provocar reacções alérgicas, no entanto existem resultados promissores de que o pólen apícola também pode ser usado como um anti alérgico. Tanto, que existem alegações há muito tempo a indicar que o consumo de pólen apícola combate a febre do feno. No entanto, este consumo deve ser sempre avaliado pelo médico que segue o doente dados os perigos que podem advir de um uso não aconselhado nestes doentes de risco. Esta actividade antialérgica do extracto fenólico do pólen apícola e do flavonóide miricetina foi avaliada em ratos utilizando 200 mg/kg de extracto fenólico do pólen apícola e 5 mg/kg do flavonóide miricetina, e os resultados mostraram inibição das diferentes reacções alérgicas, apoiando a hipótese de que o flavonóide miricetina é um dos flavonóides do extracto fenólico do pólen apícola responsáveis pelo efeito antialérgico e uma potencial ferramenta para o tratamento da alergia.

Segundo a revisão de Bogdanov (2011), como os mastócitos desempenham um papel importante na patogénese de várias doenças alérgicas, o efeito da ingestão do pólen em ratos inibe a activação desses mastócitos, não só na fase inicial da reacção alérgica como também na fase final. Recentemente os cientistas têm preparado vacinas de pólen de onde foram removidos os componentes alérgicos. Actualmente foi relatado e publicado um ensaio clinico bem-sucedido de uma vacina de pólen de *Gramíneas*, com aplicação sublingual, contra a febre dos fenos em seres humanos, tendo apresentado resultados promissores, principalmente para as pessoas dos países desenvolvidos uma vez que a maior incidência da febre dos fenos é nesses países.

Como tem sido mostrado por diversos ensaios os flavonóides do pólen apresentam propriedades benéficas à saúde dos seres humanos, não só como potencial inibidor de alguns tipos de cancro como no tratamento das alergias e também pode contribuir para reforçar a saúde cardiovascular, diminuir distúrbios gastrointestinais e, ainda tem propriedades estimulantes que tornam o pólen num bom candidato para o tratamento de doenças ligadas à idade como é o caso da aterosclerose, fadiga crónica e o próprio envelhecimento. Tudo isto vem demonstrar que o consumo do pólen de plantas específicas, quer retirado directamente de algumas espécies florais quer de pólen apícola, pode trazer vantagens e benefícios aos seres humanos, e o seu custo não é muito elevado.

3.2. A Importância na Alimentação e Saúde

Um dos interesses sobre os compostos polifenólicos, nomeadamente taninos, refere-se ao facto de precipitarem macromoléculas, tais como a proteína dietética,

carboidratos e enzimas digestivas, reduzindo deste modo a digestibilidade. Contudo hoje em dia aumentou o interesse nos compostos fenólicos alimentares ao nível dos antioxidantes e da eliminação dos radicais livres associada a alguns fenóis e os seus potenciais efeitos na saúde humana (Bravo *et al*, 1998). Além disso alguns dos antioxidantes sintéticos amplamente utilizados, tais como o BHT (hidroxitolueno butilado) e o BHA (butil hidroxianisol) são suspeitos de terem efeitos tóxicos e mutagénicos, sendo monitorizados e avaliados pela FDA (Food and Drug Administration).

Absorção dos polifenóis é entero-hepática e sofre sulfonação ou glucuronação como a maior dos compostos que ingerimos, Além disso os componentes sofrem diversas transformações durante a digestão. Estas reacções afectam a sua disponibilidade, incluindo a absorção, metabolismo, transporte para os órgãos alvo e potenciais efeitos biológicos na activação de moléculas (Šaric' *et al*, 2009).

A absorção e metabolismos dos polifenóis provenientes dos alimentos são determinados pela sua estrutura química, a conjugação com outros polifenóis, o tamanho molecular, o grau de polimerização e solubilidade. A enorme variabilidade deste grupo de substâncias e também a sua complexa mistura que acontece nas plantas, criam grandes dificuldades no estudo da biodisponibilidade e dos efeitos fisiológicos e nutricionais. Quando extractos de plantas são usados é possível recolher informação dos efeitos do constituinte como grupo, mas não é possível sobre o destino digestivo e efeitos individuais específicos dos polifenóis (Bravo *et al*, 1998).

No entanto, segundo Campos *et al* (2010) a composição do pólen pode variar de espécie para espécie, dependendo do seu tipo botânico. Estudos recentes demonstraram que os flavonóides obtidos do pólen apícola de diferentes origens geográficas ou botânica podem conter vários compostos de relevância nutricional.

A composição do pólen tem sido comparada com os requisitos nutricionais para os diferentes componentes, mas foi assumido que, uma colher de sopa cheia de pólen apícola totalmente ingerida corresponde a 15g de pólen apícola. Contudo a contribuição dos principais componentes nutritivos costuma ser pequena, isto deve-se provavelmente à origem botânica do pólen, logo a contribuição de fibra dietética e de proteína pode ser significativa e chegar a 20% dos valores da ingestão diária necessária. Apenas cerca de 3% dos lípidos totais são ácidos gordos livres, cerca de metade deles são ácidos insaturados, como o ácido oleico, ácido linoleico (Omega 6) e ácido linolênico (Omega 3), outros compostos fisiologicamente importantes são os esteróis. Em relação a um contributo nutricional mais significativo são as vitaminas presentes no pólen, como a provitamina A, vitamina E (tocoferol), niacina, tiamina, ácido fólico e biotina, que podem variar consoante o tipo de pólen. Em relação aos minerais, o pólen apícola é uma boa fonte de todos os elementos para os quais existe valores de ingestão diária necessária, com excepção do fósforo e do cálcio. Mais uma vez os valores da composição são variáveis de espécie para espécie (Campos *et al*, 2010).

Como o pólen apresenta uma camada exterior mais rígida é por vezes indicado que a absorção das substâncias internas do pólen pode não ser totalmente digerida. Com base em vários estudos de diferentes artigos, (Franchi *et al*, 1997; Roulston & Cane, 2000; Rimpler, 2003) verificou-se que o pólen é insuficientemente digerido e que se for provocada uma abertura na parede do pólen pode melhorar-se a digestibilidade e a biodisponibilidade do mesmo. Contudo estudos em humanos com pólen apícola inteiro mostram que parte do pólen apícola é digerível e biodisponível. No entanto, a maceração do pólen por várias horas em água ou noutros líquidos é recomendado a fim de melhorar a digestibilidade (Bogdanov, 2011; Campos *et al*, 2010).

As diferenças na formação dos metabolitos dos flavonóides no organismo, podem induzir uma biodisponibilidade mais elevada ou mais baixa que o composto original, resultando também numa mudança da resposta da protecção geral. Portanto, os resultados obtidos em experiências *in vitro* não revelam necessariamente os efeitos dos flavonóides do pólen apícola como em experiências *in vivo* (Šaric' *et al*, 2009).

Segundo Xie *et al* de 1994, citado por Campos *et al* (2010), para saber quais os efeitos nutricionais do pólen, utilizaram em ratos diferentes tipos de pólen, em concentrações crescentes (10% a 50%), misturado com comida normal que consistia em milho, enquanto aos ratos de controlo foi fornecido um suplemento à base de caseína. Foi observado que aos ratos a que foi dado o suplemento com pólen tiveram um rápido ganho de peso, enquanto comiam menos comida do que os ratos de controlo. O mais provável ter acontecido foi que o pólen melhorou a digestibilidade dos alimentos. Ratos alimentados com pólen apícola de diferentes plantas por 6 meses mostraram um aumento na taxa de reprodução, melhorou a nutrição materna sem afectar o desenvolvimento fetal sugerindo que o pólen poderá ser um nutriente favorável durante a gravidez. Todavia, Wang *et al*, (2007), citado por Campos *et al* (2010), demonstrou que frangos alimentados com pólen apícola conduzem a um melhor desenvolvimento de pequenas vilosidades do intestino o que sugere que o pólen promoveu o desenvolvimento do sistema digestivo.

Também existem alegações de que o pólen apícola é um alimento ideal para desportistas. De facto desportistas de competição de alguns países têm usado preparações com pólen apícola ou extractos como suplementos dietéticos no sentido de que podem ter um melhor desempenho.

Em experiências controladas com nadadores verificou-se que os dias perdidos de treino devido a infecções do tracto respiratório foram inferiores no grupo com suplementação à base de pólen apícola. Assim conclui-se que num estudo de maior duração, esses dias de diferença pode levar a um melhor desempenho por parte dos atletas que usam o suplemento à base de pólen apícola, uma vez que o pólen apícola ajudou a tratar das infecções do tracto respiratório. Por outro lado em testes feitos a corredores de longa distância a suplementação com pólen apícola não melhorou o

desempenho ou os valores de hemoglobina no sangue em comparação com os valores do grupo controlo (Bogdanov, 2011).

A nível nutricional o pólen apresenta vantagens, contudo ainda não é possível apresentar completamente quais os seus efeitos quando são ingeridos regularmente numa dieta alimentar. Para isso é preciso realizar mais experiências *in vivo* para tentar perceber qual a quantidade de pólen apropriada para consumo e quais os efeitos no organismo.

Na última década e de acordo com os estudos feitos à composição do pólen, ficou claro que o pólen apícola apresenta bioactividades bastantes promissoras. Os extractos de pólen apícola têm sido utilizados na prostatite crónica, como anti-inflamatório e anti androgénico. Também reduz a fragilidade capilar, a sua ingestão diária é recomendada pois é capaz de regular as funções intestinais, tem efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, a pele e a visão. O pólen é também utilizado na indústria da cosmética em cremes, podendo desta forma contribuir para o organismo com vitaminas (Di Paola-Naranjo *et al*, 2004).

A actividade antioxidante dos polifenóis é principalmente devida às suas propriedades redox que desempenham um papel importante na neutralização dos radicais livres de oxigénio ou peróxidos em decomposição (Mărghitaş *et al*, 2009). Para além dos seus efeitos individuais, os antioxidantes interagem de forma sinérgica podendo proteger contra a destruição oxidativa. Segundo Lopes *et al* (2011), a reactividade biológica dos radicais livres e outras espécies reactivas, juntamente com o seu papel no stress oxidativo, têm estado sob considerável atenção, uma vez que estas espécies, que podem ser produzidas tanto pelo metabolismo normal como por estímulos exógenos, como a luz ultravioleta e a poluição do ar, têm sido implicados em várias lesões celulares. Essas lesões são ao nível da peroxidação da membrana lipídica, da alteração do ADN, danos proteicos e inactivação de enzimas.

Os radicais de oxigénio livres activos foram implicados como agentes causadores de cancro, aterosclerose, isquemia cerebral e cardíaca, doença de Parkinson, distúrbios intestinais e envelhecimento. As células vivas têm uma capacidade limitada para anular a actividade destes radicais livres oxidativos, mas acredita-se que a ingestão exógena de antioxidantes obtidos a partir de alimentos que possuem uma variedade de compostos fenólicos incluindo os flavonóides pode melhorar a protecção dos componentes das células vitais e assim, a sua função fisiológica (Campos *et al*, 2003).

O Conselho Federal Alemão de Saúde reconheceu oficialmente o pólen como um medicamento (Linskens & Jorde 1997). Mais especificamente, a ingestão de pólen apícola por ratos mostrou uma diminuição do nível dos produtos da oxidação lipídica, no malondialdeído que segundo Antunes *et al* (2008) é um importante bio marcador utilizado na avaliação do stress oxidativo e também uma diminuição dos dienos conjugados nos eritrócitos. Os mesmos investigadores demonstraram também um aumento na actividade da imunoestimulação em coelhos alimentados com pólen

apícola por um mês. Os componentes que fornecem estas actividades são conhecidos por antioxidantes dietéticos, flavonóides e outros compostos fenólicos. Estes componentes têm sido investigados extensivamente e demonstrou-se que cada constituinte do pólen floral possui distintamente um perfil de flavonóides/fenóis.

Existem diferentes compostos presentes no pólen que trazem benefícios ao organismo humano, como os minerais. Numa pesquisa nutricional feita por Stanciu *et al* (2010), veio confirmar que os minerais são de vital importância para as actividades do corpo humano. O Zinco e o Ferro podem desempenhar um papel importante na promoção de metabolitos no organismo de forma a fortalecer a capacidade imunológica e no controlo de doenças imunológicas. O cálcio desempenha um papel importante na construção e manutenção dos ossos, dentes, coagulação do sangue e transmissão dos impulsos nervosos. O magnésio regula os nervos da extensão e contracção muscular. Já as funções do potássio são ao nível da manutenção do balanço hídrico e das funções renais e adernais. Tendo em conta a composição nutricional do pólen que se apresenta bastante rico em minerais pode-se considerar que o uso de pólen numa dieta alimentar contribui para um funcionamento equilibrado e harmonioso do corpo (Stanciu *et al*, 2010).

Então o trabalho realizado por vários pesquisadores ao longo deste tempo, tem demonstrado que o consumo de pólen trás diversas vantagens ao organismo não só na prevenção de doenças, como numa alimentação mais saudável. Estes factos só vêm provar a urgência que existe na criação de uma legislação com padrões estabelecidos e limites de qualidade oficiais para o pólen apícola.

4. Material e Métodos

4.1 - Amostragem

As amostras de pólen foram recolhidas directamente dos estames de diferentes espécies recolhidas em Castelo Branco e Lisboa, para recipientes de plástico forrados com folha de alumínio de forma a impedir a perda de pólen e foram levadas para o laboratório da Escola Superior Agrária de Castelo Branco. O material recolhido foi seco à temperatura ambiente de modo a mais facilmente se separar o material polínico das restantes partes das flores.



Figura 3 – Pólen com estames a secar à temperatura ambiente.

Sempre que a separação do material polínico era difícil recorreu-se a uma secagem em estufa a 40 °C. Concluída a secagem foi possível proceder à recolha do pólen, através de um crivo de malha estreita para uma caixa de Petri forrada com papel de alumínio.



Figura 4 – Recolha do pólen.











De seguida o pólen recolhido de cada espécie vegetal foi colocado dentro de *eppendorfs* devidamente identificados com o nome da espécie vegetal, e conservados por congelação.








Figura 5 – *Eppendorfs* com pólen de diferentes espécies vegetais.

As 14 espécies vegetais recolhidas para análise estão identificadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Nome científico, imagem e coordenadas das espécies vegetais utilizadas na recolha de pólen.

Nome científico e Localização	Imagem	Nome científico e Localização	Imagem
<p><i>Acacia dealbata</i></p> <p>40° 8'3.67"N 7°31'26.74"W</p>		<p><i>Bignonia spp.</i></p> <p>39°49'24.03"N 7°27'16.37"W</p>	
<p><i>Carpobrotus edulis</i></p> <p>38°51'48.38"N 9°26'53.91"W</p>		<p><i>Coleostephus myconis</i></p> <p>39°49'20.43"N 7°27'42.90"W</p>	
<p><i>Crepis spp.</i></p> <p>39°49'20.43"N 7°27'42.90"W</p>		<p><i>Digitalis purpúrea</i></p> <p>39°49'15.12"N 7°27'8.61"W</p>	
<p><i>Galactites tomentosus</i></p> <p>39°49'22.02"N 7°27'24.01"W</p>		<p><i>Lavatera spp.</i></p> <p>39° 1'3.51"N 9°10'42.29"W</p>	
<p><i>Ligustrum spp.</i></p> <p>39°49'22.47"N 7°28'1.21"W</p>		<p><i>Melaleuca spp.</i></p> <p>39°49'18.72"N 7°27'39.05"W</p>	

<p><i>Olea europaea</i> L. 39°49'35.01"N 7°27'26.60"W</p>		<p><i>Opuntia</i> spp. 39°49'22.02"N 7°27'24.01"W</p>	
<p><i>Papaver rhoeas</i> 39°49'29.62"N 7°27'15.25"W</p>		<p><i>Silybum marianum</i> 39°49'22.02"N 7°27'24.01"W</p>	
<p><i>Tilia</i> spp. 39°49'21.94"N 7°27'37.63"W</p>		<p><i>Viburnum tinus</i> 39°49'21.59"N 7°27'41.80"W</p>	

Foi ainda analisada uma amostra de pólen apícola recolhida de um apiário da região de Castelo Branco. No laboratório procedeu-se à estabilização do pólen a 40°C, para que a cor variasse o menos possível com a humidade e efectuou-se a separação dos grãos de pólen por cores conforme representado na Figura 6.



Figura 6 — Separação do pólen apícola consoante as cores apresentadas por este.

Com o final da separação o procedimento foi igualmente idêntico ao pólen das espécies vegetais, cada cor foi colocada dentro de *ependorfs* identificados e conservados por congelação.

4.2 - Análise palinológica

Para a identificação de cada espécie de pólen efectuou-se o método de acetólise para ulterior análise microscópica. Este método apresenta excelente visualização da exina, que é a camada externa e que contém os principais componentes morfológicos necessários à caracterização dos grãos de pólen. Para esta técnica coloca-se uma pequena porção de pólen a analisar num tubo de centrífuga com 5 ml de Ácido Acético Glaciar, agita-se no vortex para que o pólen se dissolva completamente no ácido. De seguida coloca-se na centrífuga a 4000 rpm por 5 minutos. Concluída a centrifugação retira-se o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur. Adicionam-se 5 ml de mistura de acetólise previamente preparada com 45 ml de anidrido acético e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado para um balão volumétrico, mais uma vez leva-se ao vortex, coloca-se em banho-maria a 100°C por 3 minutos. Após o banho-maria centrifuga-se e decanta-se o sobrenadante, adiciona-se 5 ml de água destilada, e volta-se a repetir a mesma operação de ir ao vortex, centrifuga e decantação. Por fim adiciona-se mais 5 ml de solução de glicerol, preparada com 25 ml de glicerol e 25 ml de água destilada, outra vez os mesmos passos anteriormente referidos, contudo neste último passo, quando se retira o sobrenadante deve-se deixar o menos possível de líquido tendo o cuidado de não perder o pólen que se encontra depositado no fundo do tubo de centrífuga. Finalizada esta operação os tubos devem ser colocados na estufa a secar por 24 horas.

No fim da secagem o sedimento do tubo de centrifuga é transferido para uma lâmina e por cima do pipetado é colocada uma lamela com um pouco de gelatina glicerinada. Podendo assim ser possível observar ao microscópio e fazer a caracterização dos grãos de pólen.



Figura 7 – Lâminas prontas para serem observadas ao microscópio.

4.3 - Identificação dos compostos por HPLC/DAD

As análises por Cromatografia líquida de alta pressão com detetor de díodos (HPLC/DAD) foram realizadas na Faculdade de Farmácia na Universidade de

Coimbra, onde se procedeu à análise dos compostos flavonóides presentes nas amostras.

Para a injeção das amostras no cromatógrafo foi necessário efectuar a preparação das mesmas de acordo com a metodologia descrita por Campos e Markham (2007).

De cada amostra foi pesada, para um *ependorf*, uma carga polínica, a que corresponde um peso que pode oscilar em média entre 5 mg – 10 mg, dependendo do tamanho. De seguida adiciona-se etanol 50% na porção equivalente ao pesado em pólen mas em microlitros (μL) ou seja, mantendo sempre a proporção de 10mg/mL. O *ependorf* deve ser agitado no vortex por 2 minutos e em seguida vai aos ultra-sons por 30 minutos com o objectivo de extrair intensamente todo o conteúdo dos grãos de pólen. Por fim o *ependorf* com o extracto é colocado na centrífuga a 4000 rpm por 5 minutos a 20°C. Quando se retira da centrífuga é necessário ter o cuidado para não misturar o sobrenadante com o sedimento que está no fundo do *ependorf* pois é preciso retirar 100 μL de sobrenadante para os vials que vão ser colocados no autoinjector do HPLC/DAD.

O volume injectado no HPLC/DAD é de 50 μL embora para as amostras cuja concentração em fenóis e polifenóis seja baixa pode injectar-se 100 μL e neste caso, os vials devem conter 150 μL . No final obtém-se para cada amostra de pólen analisada um cromatograma onde estão representados todos os compostos fenólicos e polifenólicos presentes nas amostras (Lopes *et al*, 2011).

Sempre que possível todos os cromatogramas são obtidos com a mesma concentração de pólen e utilizando o mesmo volume de injeção o que permite, numa primeira abordagem, a comparação entre eles no que concerne à concentração relativa em compostos fenólicos e polifenólicos apenas analisando os cromatogramas obtidos.

4.4 - Análise do conteúdo em Minerais

A análise dos minerais foi efectuada por espectrometria de emissão de plasma (ICP-OES) no laboratório de físico-química do Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA), segundo o método descrito por Paulo *et al* (2012).

As amostras foram previamente secas em estufa a 50°C antes de efectuar a Digestão Húmida. Esta técnica é usada para materiais biológicos, dado que elimina perdas por spray, por volatilização e pela transferência da amostra após a digestão (Lorenz *et al*, 1977). A digestão húmida vai decompor as amostras biológicas, através da adição de ácidos (Moraes e Rabelo, 1986). Na preparação das amostras por digestão húmida pesaram-se aproximadamente 200 mg de cada amostra, em duplicado de duas amostras, para controlo de qualidade. Neste caso as amostras duplicadas foram a espécie *Acacia dealbata* e o pólen apícola “LE”. Depois da pesagem

das 12 amostras mais dos 2 duplicados como está indicado na Tabela 2, cada amostra foi colocada num tubo de digestão húmida.

Estas amostras foram selecionadas com base na quantidade de pólen que havia de cada espécie, ou seja, amostras em que a quantidade de pólen era pouco, não sendo possível pesar a quantidade necessária para proceder à análise dos minerais, não foram utilizadas. Enquanto as amostras que possuíam quantidade suficiente para se proceder à análise foram utilizadas, sendo apresentadas na Tabela em baixo.

Tabela 2 - Toma em grama pesada para as 12 amostras e dos 2 duplicados.

Amostra	Peso em seco (g)
<i>Viburnum tinus</i>	0,1986
<i>Acacia dealbata</i>	0,1800
<i>Papaver rhoeas</i>	0,1354
<i>Silybum marianum</i>	0,1343
<i>Galactites tomentosus</i>	0,1051
<i>Bignonia</i> spp.	0,0931
Apícola "LE"	0,1950
Apícola <i>Crepis</i> spp.	0,1976
Apícola <i>Raphanus</i> spp.	0,1990
<i>Carpobrotus edulis</i>	0,1331
<i>Opuntia</i> spp.	0,1926
<i>Olea europaea</i> L.	0,1676
<i>Acacia dealbata</i> (duplicado)	0,1029
Apícola "LE" (duplicado)	0,1975

Efectuou-se uma solução padrão de multi-elementos de 100 mg/L (SCP science) para o controlo da qualidade.

A todas as amostras, inclusive à solução padrão, adicionou-se 50 ml de ácido nítrico a 10% (v/v). De seguida colocaram-se os tubos das amostras dentro do bloco de digestão durante 30 minutos a 95°C. Enquanto as amostras são digeridas é necessário observar se o ácido nítrico não se evapora completamente e se as amostras se estão a dissolver bem. De seguida, as amostras são colocadas, durante 60 minutos, a 100.°C e se ainda se observarem partículas em suspensão é adicionado 1000 µl de peróxido de hidrogénio, para completa dissolução. Quando as amostras continuam sem apresentar uma coloração límpida é necessário continuar a adicionar o peróxido de hidrogénio até estas ficarem límpidas.

No final deste processo, com a digestão completa deve-se deixar os tubos arrefecerem mas sempre tapados, para evitar a entrada de partículas estranhas que podem influenciar de alguma forma os valores de minerais nas amostras. Os resíduos finais foram diluídos com 50 ml de HNO₃ sendo depois filtrados.

Terminada a fase de preparação de amostras Inicia-se a análise em Espectrometria de Emissão Atómica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES),

com a calibração do aparelho com 13 soluções em que cada uma delas contém os elementos que se pretendem analisar, Cádmio, Cobre, Crómio, Chumbo, Ferro, Manganês, Zinco e Níquel. Para se determinar a concentração dos diferentes elementos calculou-se com base na recta de calibração os limites de quantificação (LOQ) para cada um dos metais analisados (Paulo *et al*, 2012).

Após a calibração deu-se início à análise das amostras em estudo.

5. Resultados e Discussão

Com a identificação microscópica dos pólenes em muitos casos, apenas é possível identificar a família e género da planta e não a espécie. Assim, a técnica de identificação pelo perfil de flavonóides e compostos fenólicos do pólen é muito útil pelo facto de cada espécie ter um perfil distinto e característico (Campos, 1997; Campos *et al*, 2002; Almaraz-Abarca *et al*, 2007; Lopes *et al*, 2011;). A composição fenólica do pólen consiste principalmente em glicosídeos dos flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos (Lopes *et al*, 2011; Almaraz-Abarca *et al*, 2007).

5.1. Pólen recolhido directamente dos estames

Com base nos perfis de HPLC/DAD dos compostos fenólicos obtidos para cada espécie é possível identificar os compostos maioritariamente presentes no pólen. Esses compostos, que estão em maior quantidade na amostra podem ser observados no perfil, com base no tempo de retenção (Tr) e na avaliação das suas estruturas químicas por análise do seu espectro de ultravioleta, com os comprimentos de onda de 260 nm e 340 nm.

5.1.1. *Acacia dealbata*

Na Figura 8 está representado o perfil HPLC/DAD dos compostos fenólicos da espécie vegetal *Acacia dealbata* com identificação dos picos mais representativos desta espécie. Os espetros de absorção no ultravioleta correspondem a cada um dos compostos assinalados na Figura estão representados na Tabela 3.

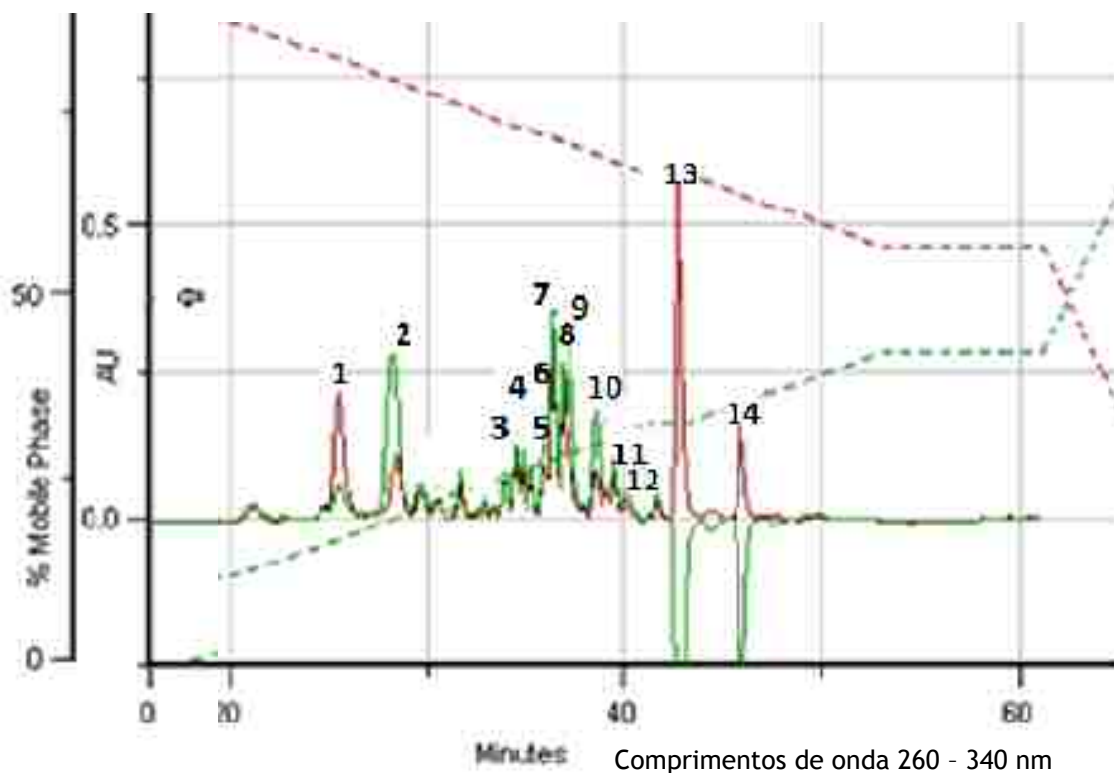
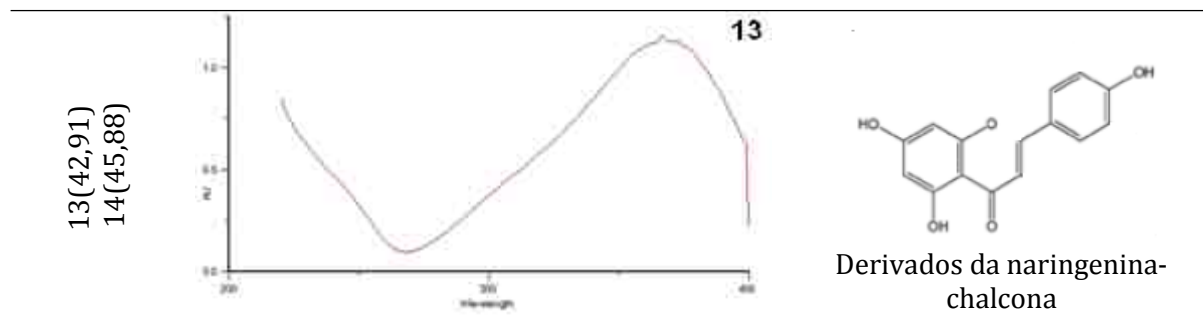


Figura 8 – Cromatograma da *Acacia dealbata*.

Tabela 3 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Acacia dealbata*.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(25,52)		 derivado do ácido fenólico
2(28,37)		Não identificado

<p>3 (34,48) 5 (35,26)</p>			<p>derivado da luteolina -6 ou 8 - <i>O</i>-substituída</p>
<p>4 (34,79) 6 (35,93) 10 (38,58) 11 (39,47)</p>			<p>quercetina-3-<i>O</i>- substituída</p>
<p>7 (36,37)</p>		<p>Não identificado</p>	
<p>8 (36,83)</p>			<p>derivado da luteolina -6 ou 8 - <i>O</i>-substituída</p>
<p>9 (37,18) 12 (40,08)</p>			<p>dihidroflavonol</p>



O perfil do extracto de pólen de *Acacia dealbata* é composto por 14 picos correspondentes a igual número de constituintes fenólicos e polifenólicos. Pode-se observar que os 14 picos apresentam tempos de retenção entre os 20 e os 50 minutos. Cada pico apresenta um espectro de absorção diferente, e quando analisamos a Tabela 3 podemos verificar que o composto maioritariamente presente é o derivado da naringenina-chalcona, sendo representado pelo pico 13, e similar estrutura base de naringenina-chalcona corresponde ao composto número 14 mas com diferente substituinte dado que apresenta tempo de retenção diferente. Os outros compostos que se encontram em minoria mas mesmo assim em quantidade relevante são correspondentes a derivados da luteolina, 6 ou 8 substituída, um dihidroflavonol, e um derivado de um ácido fenólico. Existem dois compostos ainda não identificados que deverão merecer atenção de estudo posterior.

5.1.2. *Bignonia* spp.

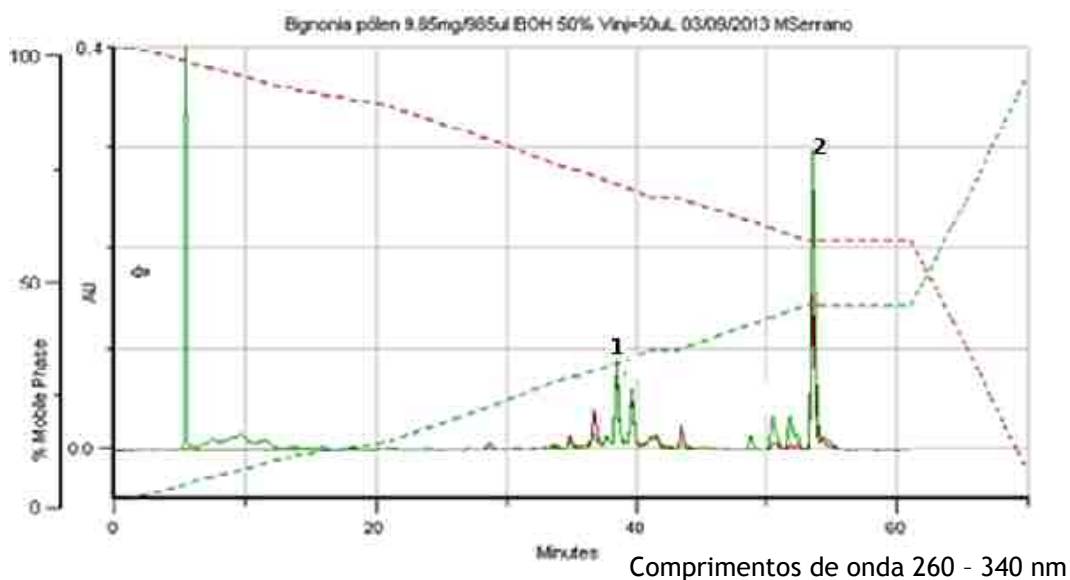
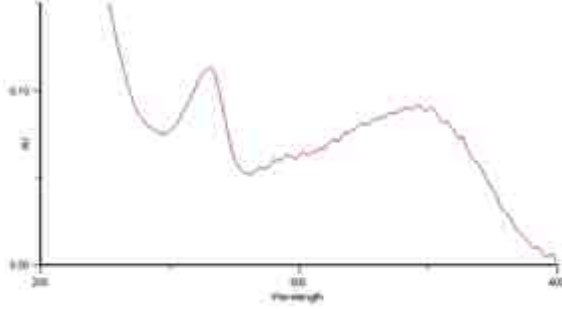
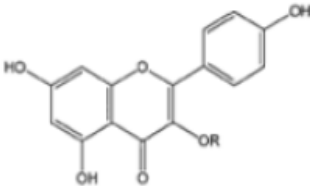
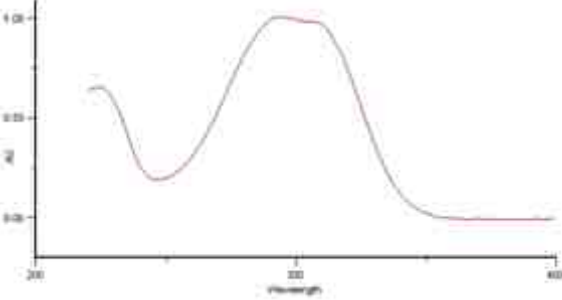
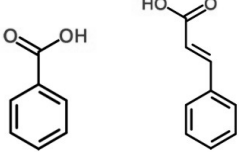


Figura 9 – Cromatograma da *Bignonia* spp.

O género *Bignonia* spp. representada na Figura 9, possui 2 picos que se destacam em relação aos outros, indicando os compostos presentes em maior quantidade nesta espécie e que estão assinalados com o nº 1 e 2. Ambos bastante dispares entre si uma vez que a concentração do primeiro é mais baixa sendo o seu tempo de retenção

38,37 minutos, enquanto o segundo pico com uma concentração mais elevada ocorre entre os 53,59 minutos. Ao identificar os compostos presentes (Tabela 4), podemos observar que o pico 1 é derivado do Canferol – 3 – *O*- e o pico 2 derivado de um ácido fenólico. Dado o tempo de retenção, este último, deve corresponder a um polímero de vários monómeros desse ácido fenólico.

Tabela 4 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Bignonia* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(38,37)		 <p>derivado do canferol – 3 – <i>O</i>-</p>
2(53,49)		 <p>derivado de ácido fenólico</p>

5.1.3. *Carpobrotus edulis*

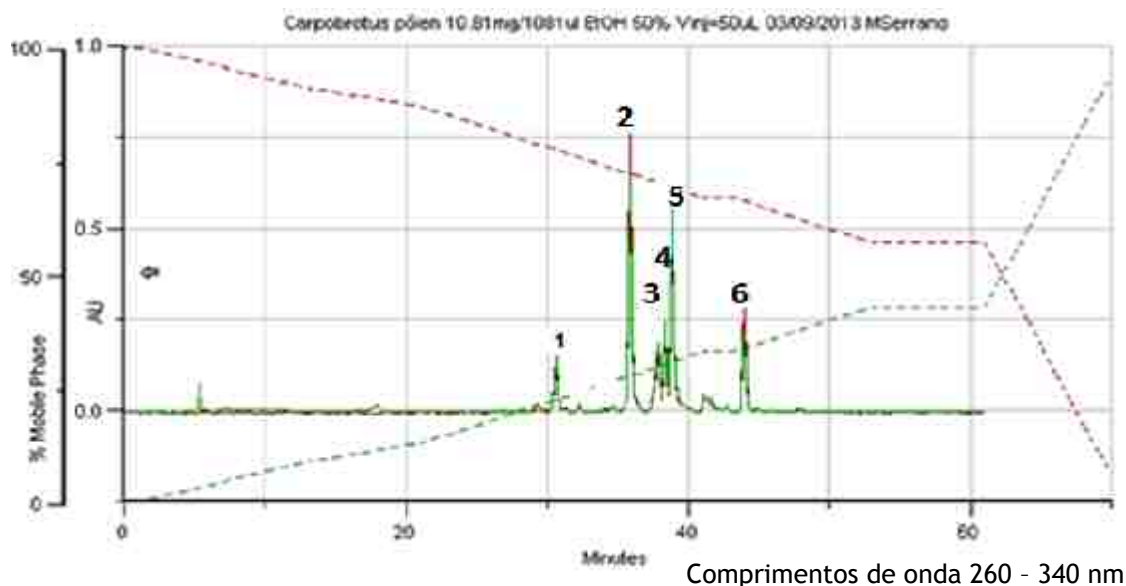


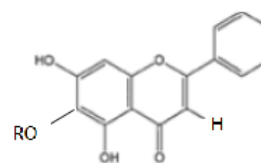
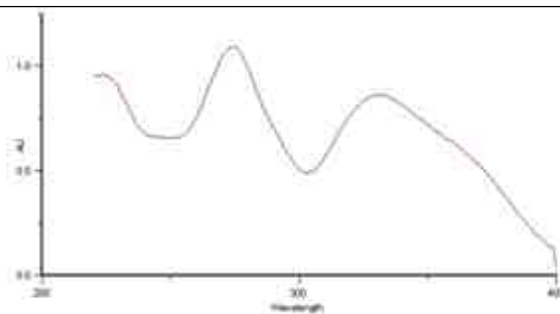
Figura 10— Cromatograma do *Carpobrotus edulis*.

A espécie *Carpobrotus edulis* apresenta 6 picos com maior destaque que os outros. Esses picos têm um tempo de retenção entre os 30 e os 50 minutos. Sendo perto dos 40 minutos que quase todos os compostos são eluídos. O pico 2 e 6 são duas flavonas, ambas correspondentes a possíveis derivadas da baicaleína, enquanto os picos 1, 4 e 5, são derivados do canferol, um flavonol, sendo o pico 1 também 7- substituído. O constituinte correspondente ao restante pico 3 é um derivado da quercetina substituído em C3-O. Este composto está presente em várias espécies estudadas neste trabalho (Tabela 5), o que é normal dada a sua vasta existência na natureza.

Tabela 5 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do *Carpobrotus edulis*.

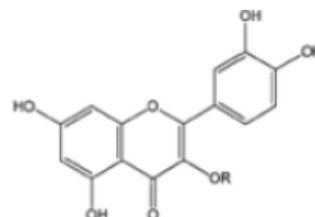
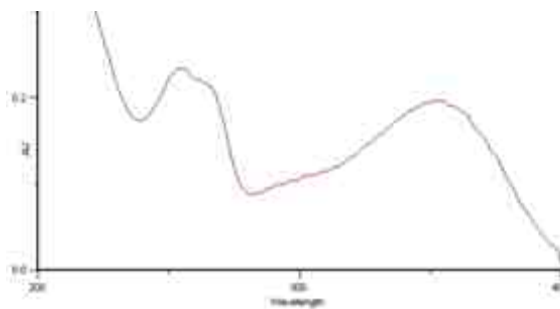
Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(30,64)		<p>derivado do canferol- 3,7 - O-di-substituído</p>

2(35,89)



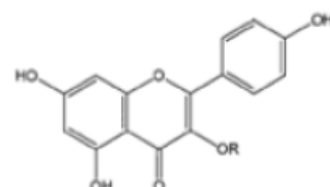
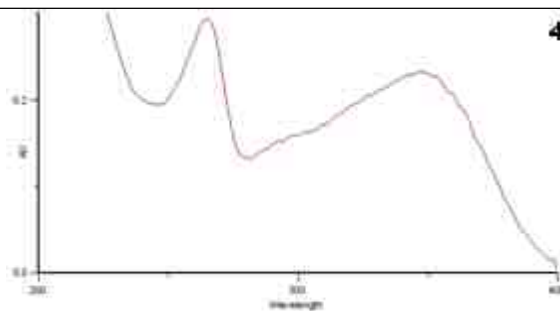
derivado da baicaleína

3(37,85)



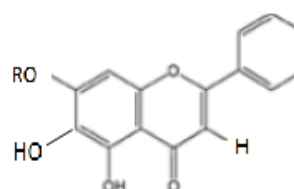
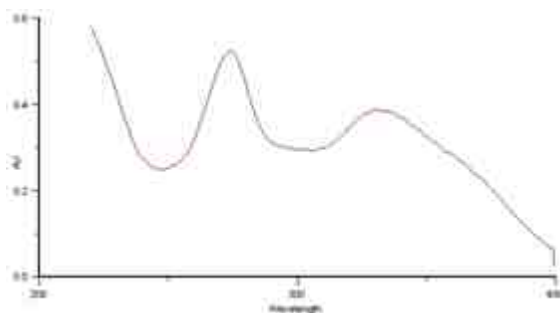
derivado da quercetina - 3 - O-substituída

4(38,38)
5(38,83)



derivados do canferol - 3 - O-substituído

6(43,95)



derivado da baicaleína

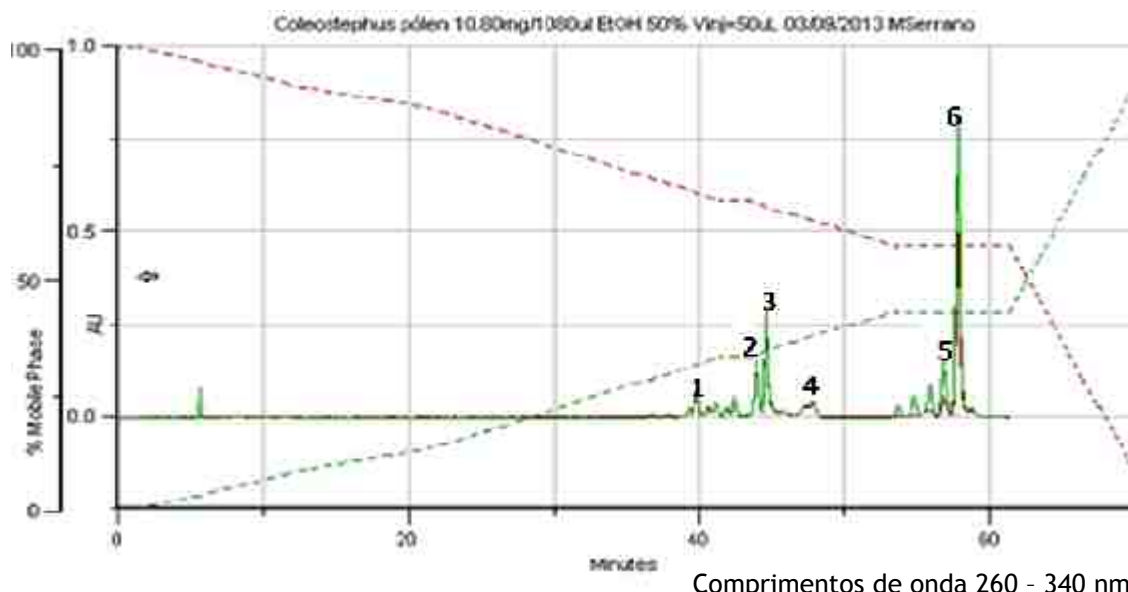
5.1.4. *Coleostephus myconis*

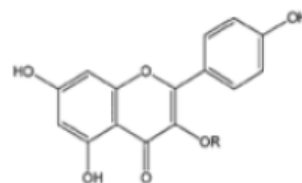
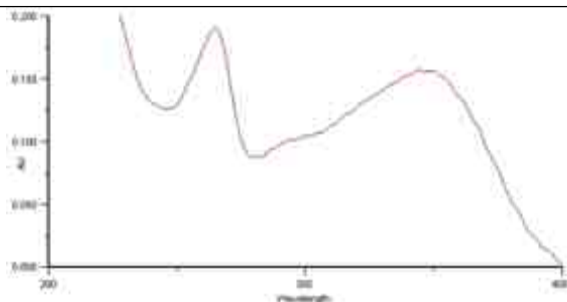
Figura 11 – Cromatograma do *Coleostephus myconis*.

O composto maioritário é representado pelo pico 6 na Figura 11. Este pico, bem como os picos 4 e 5, correspondem a derivados de ácidos fenólicos. O pico 1 e 2 são derivados da quercitina e do canferol respectivamente, ambos substituídos em C3, provavelmente por cadeias osídicas dado não haver qualquer interferência no espectro de absorção no ultravioleta relativamente a estruturas similares. O terceiro composto entre os mais concentrados, é o que corresponde ao pico 3 (o segundo mais abundante) e é um derivado da isoramnetina também este substituído em C3, provavelmente por cadeias osídicas (Tabela 6). Todos os compostos aparecem entre tempos de retenção de 40 a 60 minutos, indicando menos polaridade relativamente a outras que saem com tempo de retenção inferior.

Tabela 6 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do *Coleostephus myconis*.

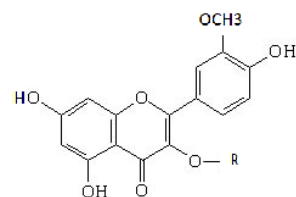
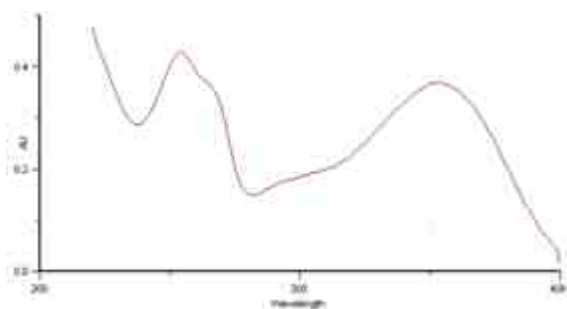
Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1 (39,73)		<p>derivado da quercetina - 3 - O-substituído</p>

2(43,83)



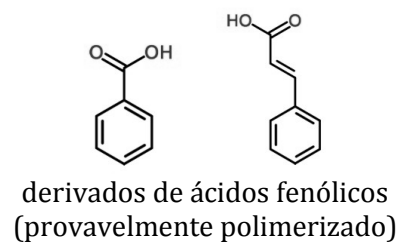
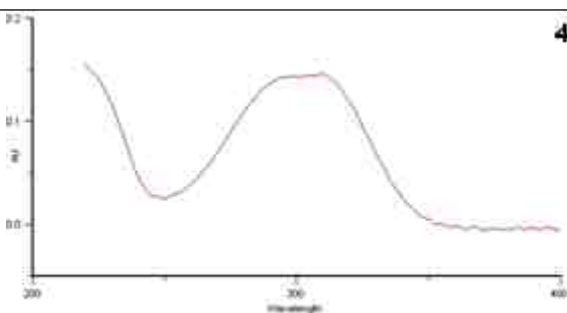
derivado de canferol - 3 - O-substituído

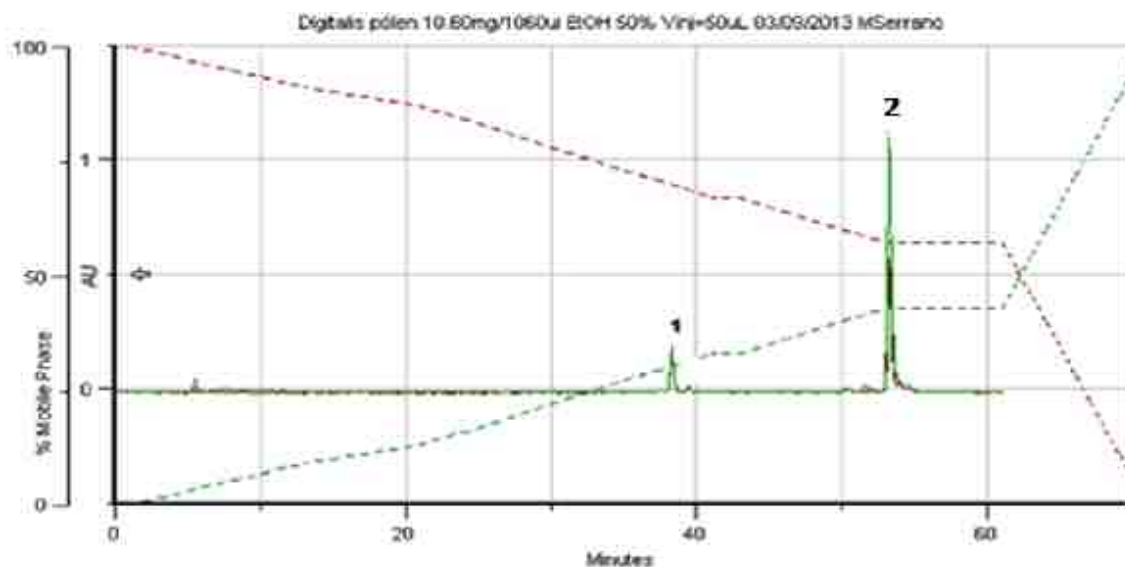
3(44,53)



derivado da isoramnetina-3-O-substituído

4(47,77)
5(56,73)
6(57,51)



5.1.5. *Digitalis purpurea*Figura 12 – Cromatograma da *Digitalis purpurea*.

Comprimentos de onda 260 - 340 nm

No pólen da espécie vegetal *Digitalis purpurea* apenas se observam 2 picos, tendo o segundo um tempo de retenção de 53,06 minutos e aparece em maior quantidade. Esse composto maioritário é um derivado de um ácido fenólico, enquanto o pico 1 que está em menor quantidade e é detectado para um tempo de retenção de 38,28 minutos sendo um derivado do canferol - 3 - *O*-substituído (Tabela 7).

Tabela 7 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Digitalis purpurea*.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1 (38,28)		 derivado do canferol - 3 - <i>O</i> -substituído
2 (53,06)		 derivado de um ácido fenólico (polimerizado dado o tempo de retenção)

5.1.6. *Galactites tomentosus*

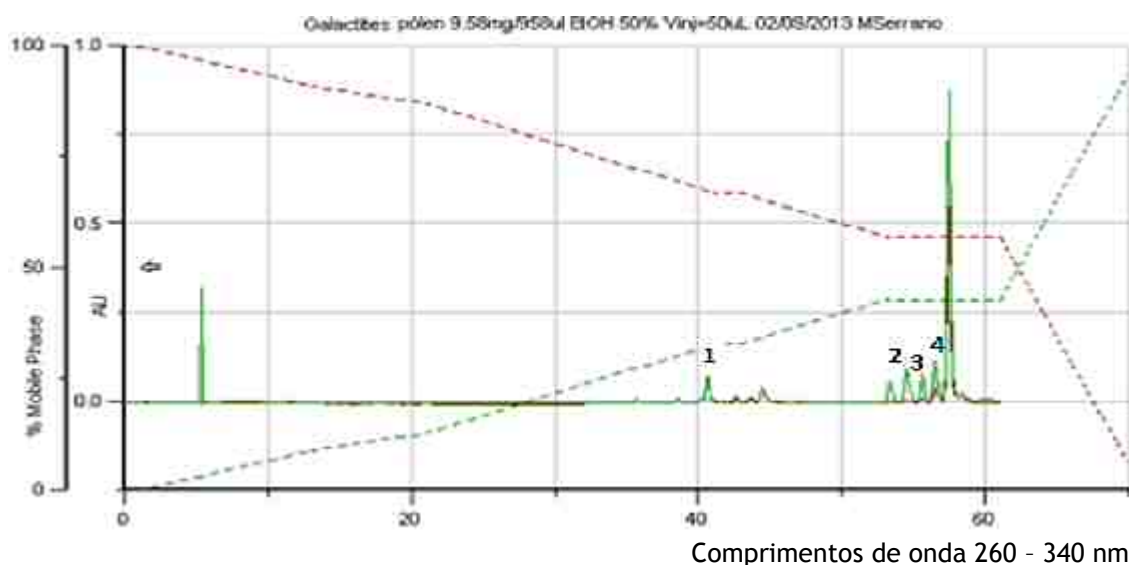
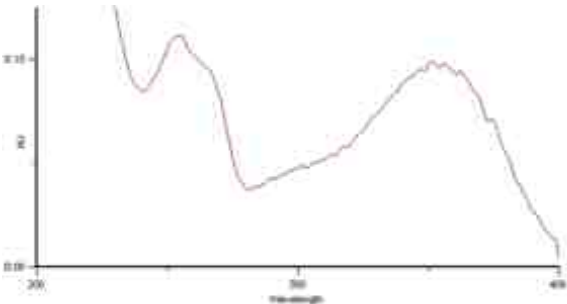
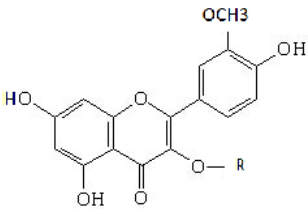
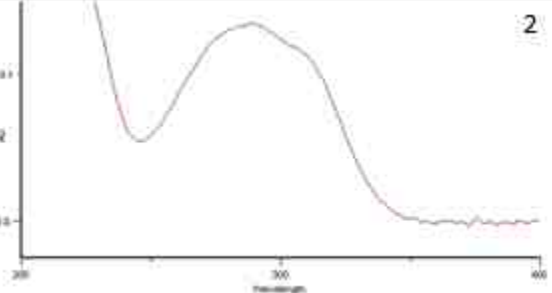
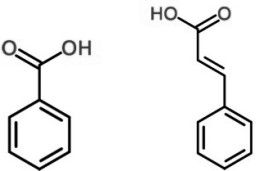


Figura 13 – Cromatograma da *Galactites tomentosus*

A espécie vegetal *Galactites tomentosus* conforme se pode ver na Figura 13 apresenta 9 compostos de onde destacamos apenas 4 como mais relevantes. Esses 4 picos são pequenos o que indica que os compostos presentes não se encontram em concentração elevada. Também se pode observar na Figura 13 um pico elevado que não está contabilizado e esse facto ocorre porque o espectro obtido deste composto não se apresentava bem definido como os restantes picos, impedindo a sua identificação com exactidão. Terão de ser efectuadas mais análises para conseguir identificar correctamente este composto o que não foi possível neste trabalho pelo facto de não haver amostra de pólen suficiente para a sua repetição. O pico 1 com 40,66 minutos de tempo de retenção foi identificado como sendo um derivado da isoramnetina -3-*O*-substituída e os restantes picos são derivados de ácidos fenólicos polimerizados (Tabela 8).

Tabela 8 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Galactites tomentosus*

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1(40,66)		 <p data-bbox="1007 792 1394 857">derivado da isoramnetina-3-O-substituída</p>
2(55,62) 3(56,48) 4(57,62)		 <p data-bbox="1015 1115 1385 1182">derivados de ácidos fenólicos polimerizados</p>

5.1.7. *Lavatera* spp.

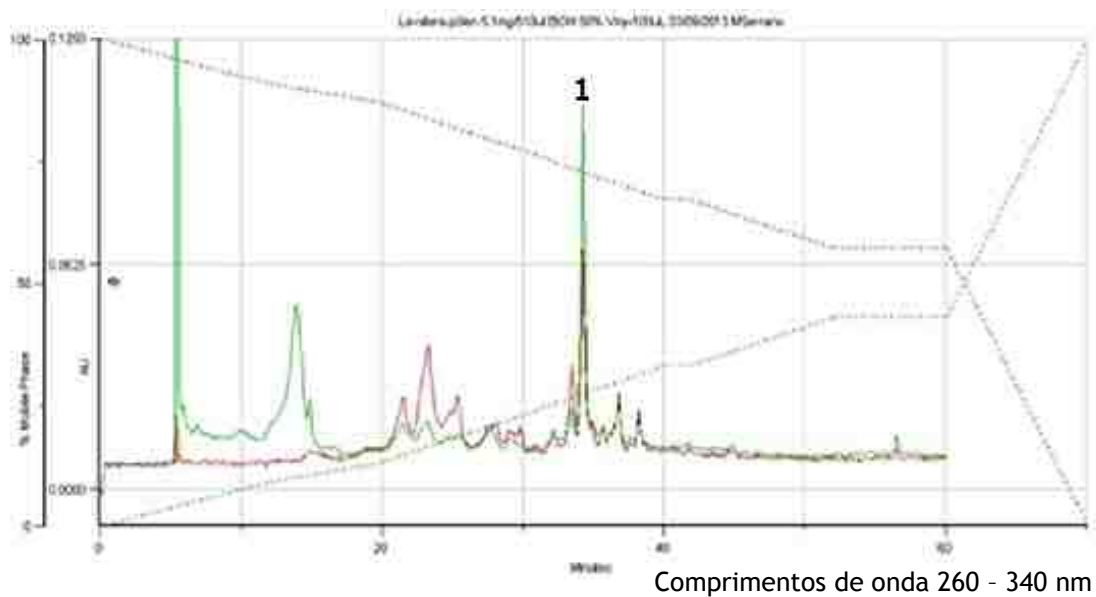


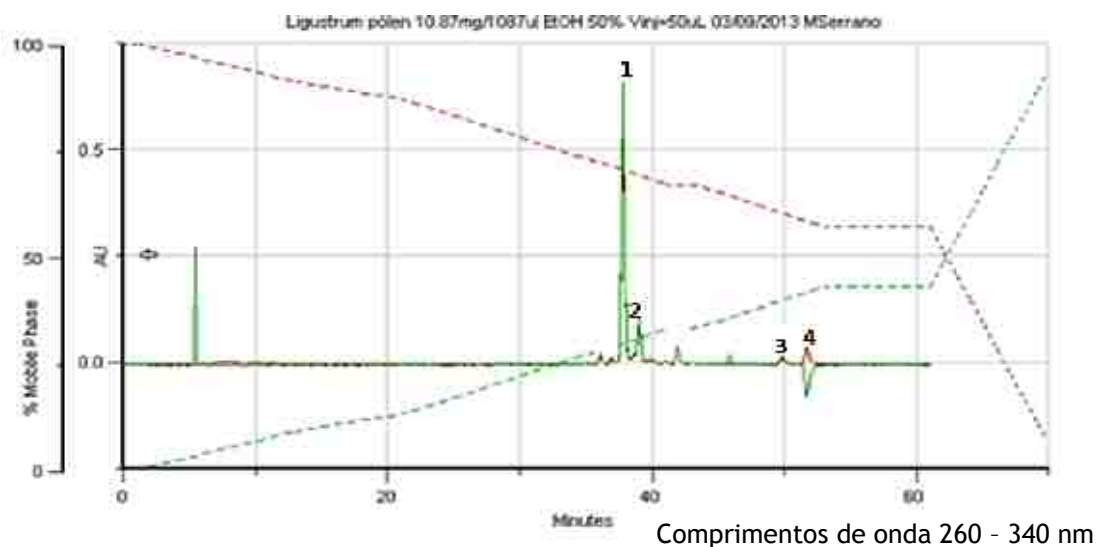
Figura 14 – Cromatograma da *Lavatera* spp.

O cromatograma (Figura 14) do género *Lavatera* spp. apresenta apenas um pico com elevada concentração, com tempo de retenção de 34,25 minutos e que foi identificado como sendo um derivado da quercetina-3, 6 (ou 8), 7-*O*-tri-substituída (Tabela 9). Isto não significa que a quercetina seja o único composto presente na *Lavatera* spp. mas que é o composto com maior relevância, visto que o seu pico possui uma altura muito superior aos outros picos que estão presentes no cromatograma, embora a concentração em compostos fenólicos e polifenólicos seja muito mais baixa que nas outras amostras, o que inviabiliza a análise dos espectros ultravioleta dada a escassez de pontos adquiridos. Como havia pouco material polínico não foi possível realizar nova análise com concentração mais elevada.

Estes espectros não estão representados porque, mais uma vez, os espectros obtidos não tinham uma imagem visível para identificar com certeza os compostos presentes.

Tabela 9 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Lavatera* spp.

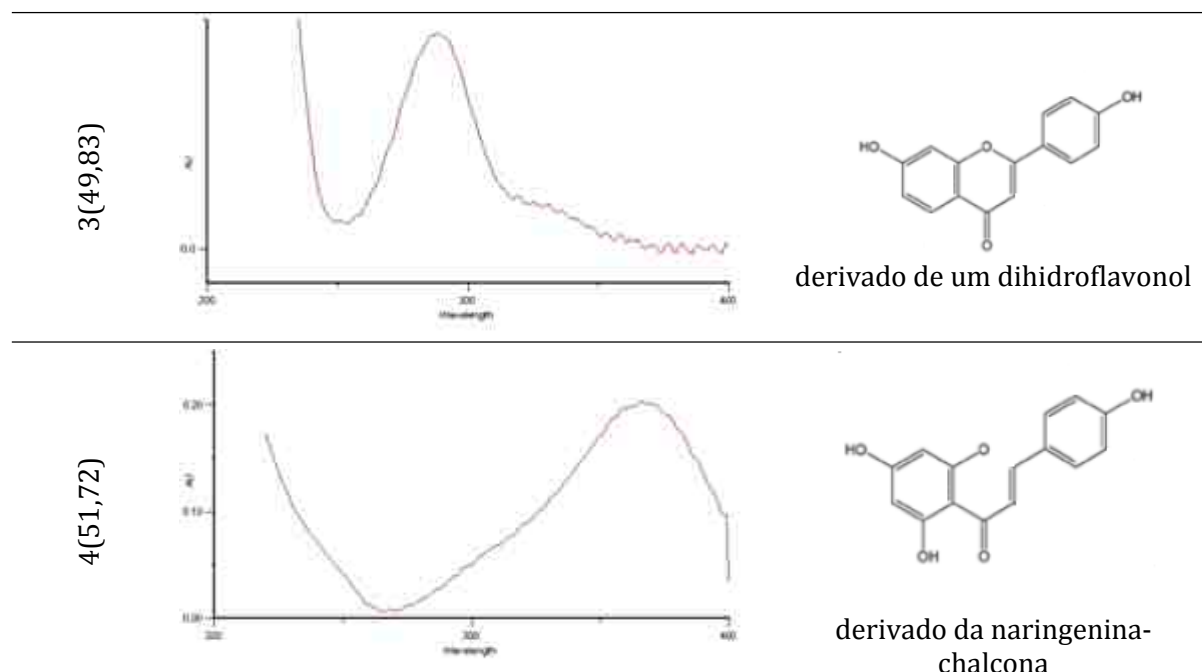
Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(34,25)		<p data-bbox="954 1279 1372 1346">derivado da quercetina – 3, 6 (ou 8), 7- <i>O</i>- tri-substituída</p>

5.1.8. *Ligustrum* spp.Figura 15 – Cromatograma do *Ligustrum* spp.

No género *Ligustrum* spp. pode observar-se no cromatograma da Figura 15 grandes diferenças entre os 4 picos presentes. O pico 1 é o que apresenta uma concentração mais elevada em comparação com os restantes picos. O tempo de retenção entre os 4 picos também apresenta diferenças, visto que os dois primeiros estão muito juntos ocorrendo perto dos 40 minutos enquanto os dois últimos estão ambos a ocorrer aproximadamente nos 50 minutos com um tempo de retenção muito semelhante. Assim nas identificações feitas aos espectros pode-se observar (Tabela 10), que os dois primeiros picos são ambos derivados do canferol, o terceiro pico é um dihidroflavonol e o quarto pico um derivado da naringenina-chalcona.

Tabela 10 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do *Ligustrum* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(37,82) 2(39,07)		<p>derivado do canferol – 3-<i>O</i>-substituído</p>



5.1.9. *Melaleuca* spp.

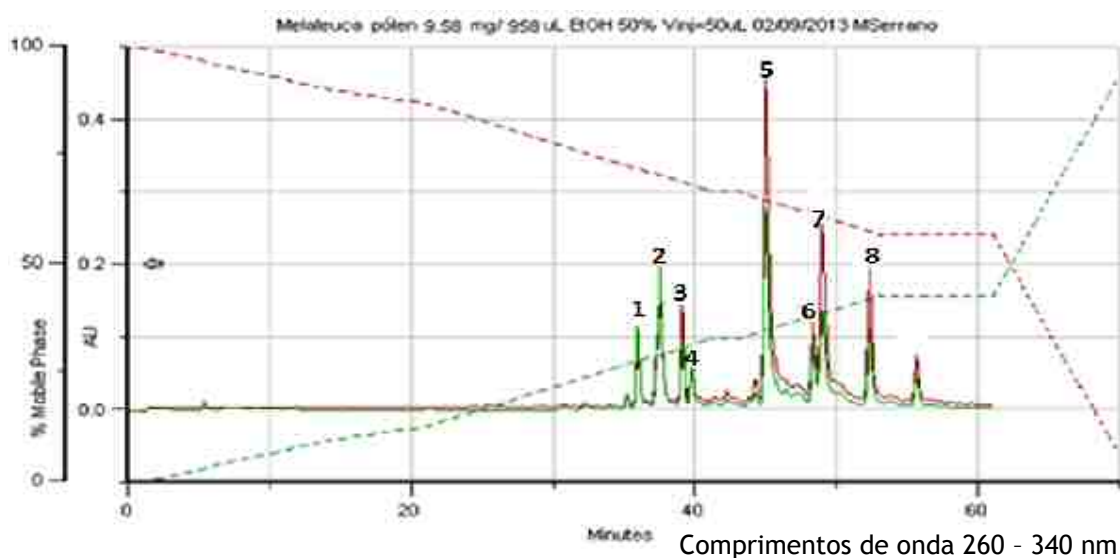
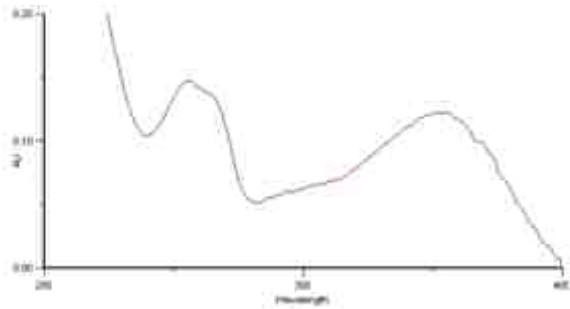
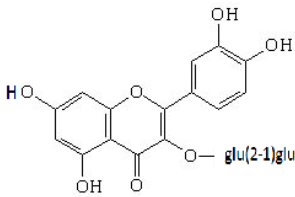
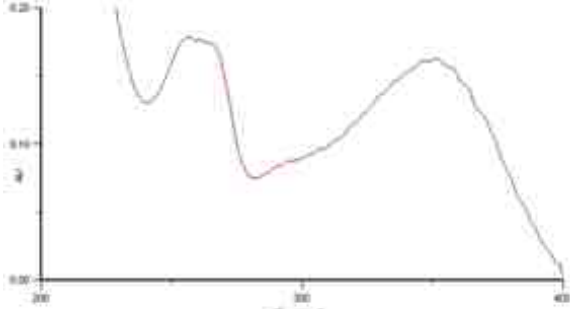
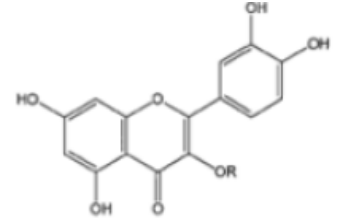
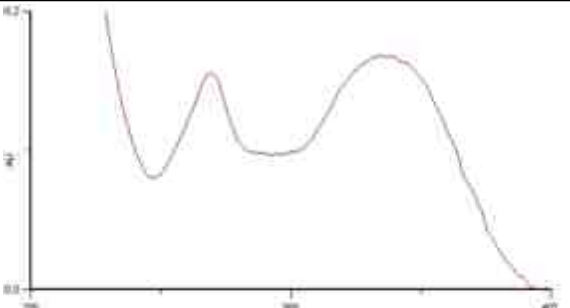
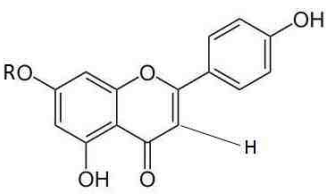


Figura 16 – Cromatograma da *Melaleuca* spp.

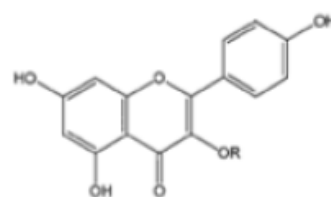
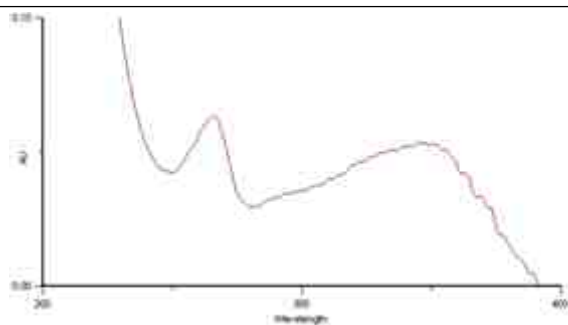
O cromatograma do género *Melaleuca* spp. como pode ser observado na Figura 16 mostra que este género têm cerca de 10 constituintes fenólicos e polifenólicos dos quais destacamos 8, correspondentes aos picos que estão identificados na Tabela 11. Numa observação rápida verifica-se que estão quase todos na mesma concentração no pólen deste género, e que o pico 5, mais elevado, com um tempo de retenção entre os 45,08 minutos corresponde a uma flavona, rara na natureza que se designa tricetina e é marcadora dos pólenes de Myrtaceae (Campos *et al*, 2002). Os três últimos picos 6 - 8 também em concentrações significativas foram identificados como sendo derivados do ácido cafeico, provavelmente sobe a forma de polímeros como se tem

referido para espectros similares em outras espécies, dados os tempos de retenção. Os constituintes que aparecem nos picos 1 e 2 são ambos derivados da quercetina substituídos em C3, mas tendo em conta a diferença de concentração e do tempo de retenção entre os dois pode-se dizer que existem diferenças na cadeia osídica. O pico 1 que apresenta alguma concentração significativa identifica-se como podendo ser quercitina -3-O-soforósido, já identificado em espécies similares e por último o pico 3 trata-se de uma flavona, apigenina (monohidroxilada no anel B) substituída em C7. Contudo conforme podemos ver na estrutura presente na Tabela 11, esta é diferente da outra flavona que elui cerca de 6 minutos mais tarde, tricetina (pico 5), e que é trihidroxilada no anel B. O composto 4 é um canferol -3-O-substituído similar a outros encontrados em cromatogramas anteriores.

Tabela 11 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Melaleuca* spp.

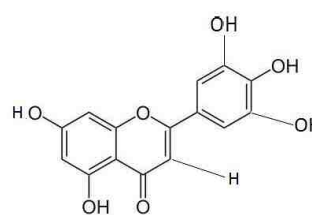
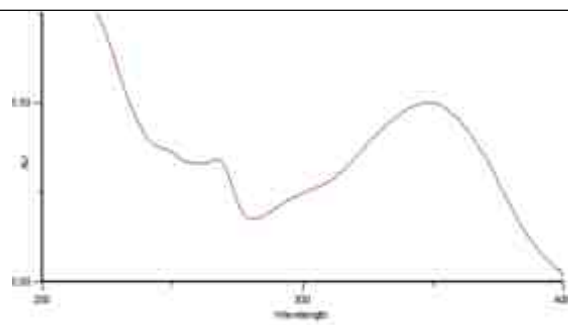
Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1 (35,95)		 <p data-bbox="1046 1249 1398 1283">quercetina -3-O-soforósido</p>
2 (37,51)		 <p data-bbox="1046 1532 1410 1592">derivado da quercetina -3-O-substituída</p>
3 (39,12)		 <p data-bbox="1054 1935 1382 1968">apigenina-7-O-substituída</p>

4(39,71)



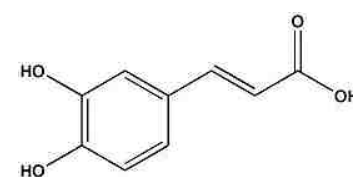
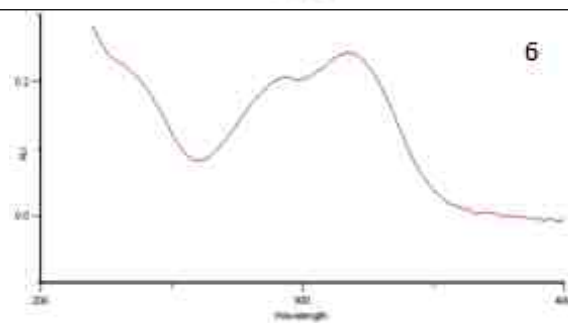
derivado do canferol-3-O-substituído

5(45,08)



tricetina

6(48,35)
7(48,99)
8(52,33)



derivados do ácido cafeico

5.1.10. *Olea europea* L.

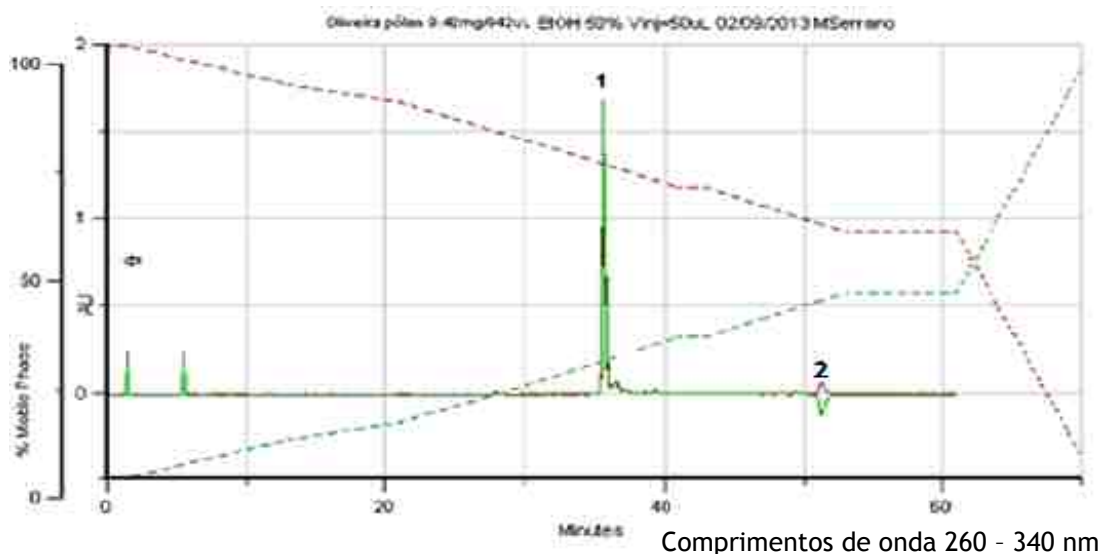
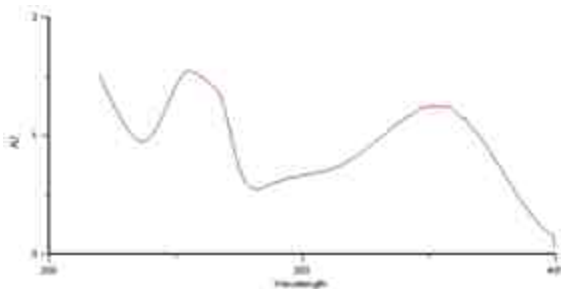
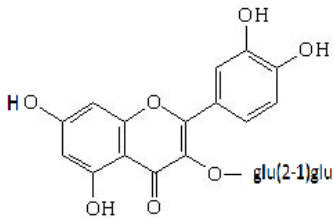
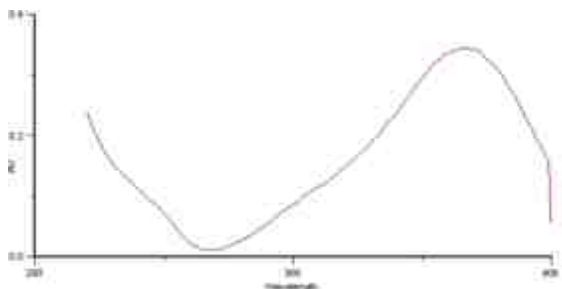
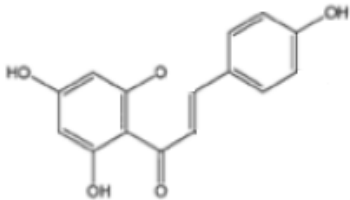


Figura 17— Cromatograma da *Olea europea* L.

A espécie *Olea europea* L. no seu cromatograma apresenta apenas dois picos muito diferentes um do outro. O pico 1 tem uma concentração extremamente elevada com um tempo de retenção entre os 35,78 minutos, enquanto o pico 2 tem uma concentração extremamente baixa com o tempo de retenção ocorrendo aos 51,36 minutos. Estes dois compostos são ambos flavonóides, como está na Tabela 12. Sendo que o pico 1 pode corresponde à quercetina -3-*O*-soforósido, porque co-elui no mesmo tempo e foi isolado e identificado por RMN em várias cultivares desta espécie por Costa (2011), já o pico 2 é a naringenina-chalcona. É possível identificar compostos muito similares em algumas amostras anteriores como é o caso da *Acacia dealbata* mas que tendo um tempo de retenção inferior a este. Isto pode acontecer porque estará provavelmente substituída com oses que lhe aumentam a polaridade sem alterar o espectro ultravioleta. Enquanto no *Ligustrum* spp a diferença é de mais meio minuto devendo-se num futuro ensaio verificar se existe significado para esta eluição uma vez que o pico 1 se for a quercetina-3-*O*-soforósido também elui com uma pequena diferença de tempo de retenção. Esta diferença pode dever-se a alguma diferença de pressão na coluna que se reflectiu na eluição dos compostos.

Tabela 12 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Olea europaea* L.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(35,78)		 quercetina - 3 - O - sofrósido
2(51,36)		 naringenina-chalcona

5.1.12. *Opuntia* spp.

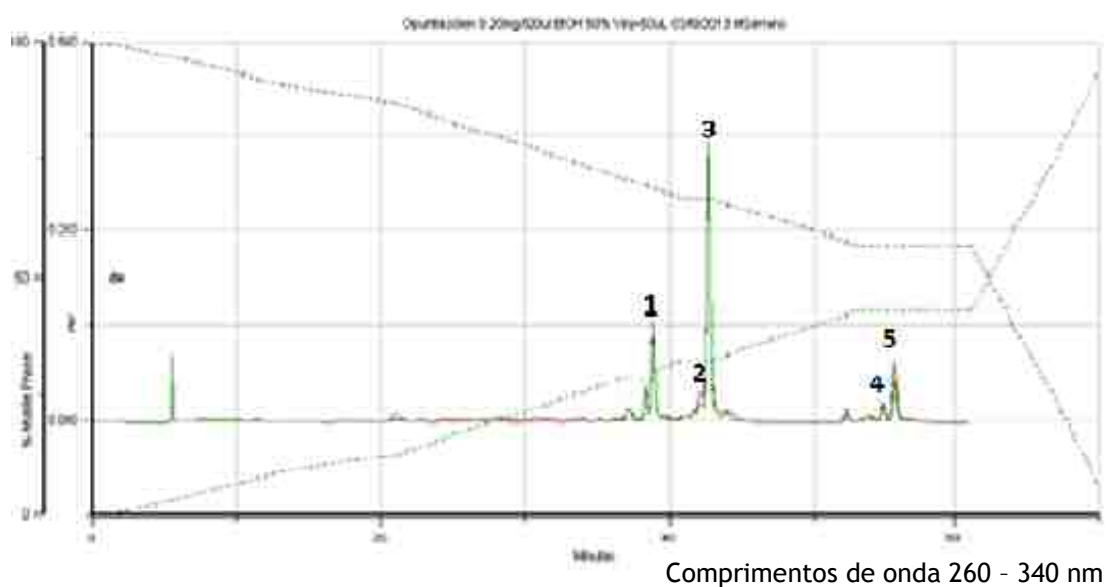
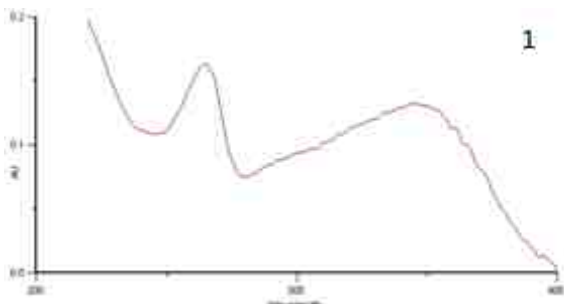
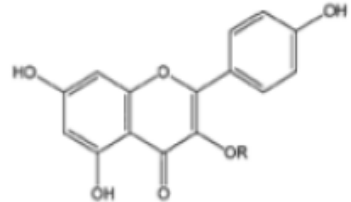
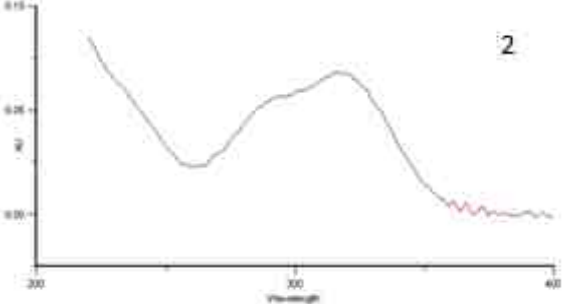
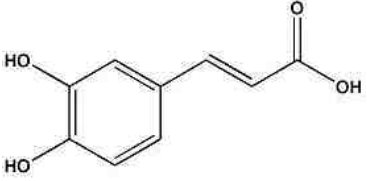


Figura 18 – Cromatograma da *Opuntia* spp.

Observam-se no cromatograma da Figura 18 diferenças nos picos obtidos por HPLC/DAD do género *Opuntia* spp. Os picos 1 e 3 têm uma concentração muito superior aos restantes picos, notoriamente o maioritário é o pico 3. Ao serem identificados os constituintes (Tabela 13) percebe-se que a elevada concentração nestes picos deve-se ao facto de serem o mesmo composto, o maior composto presente no género em estudo, é nomeadamente derivado da quercetina. Enquanto os picos 2, 4 e 5 em que a sua concentração é extremamente baixa, são derivados de ácidos fenólicos.

Tabela 13 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Opuntia* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1(38,86) 3(42,90)		 derivado do canferol-3-O-substituído
2(42,33) 4(54,93) 5(55,64)		 Derivados do ácido cafeico

5.1.13. *Papaver rhoeas*

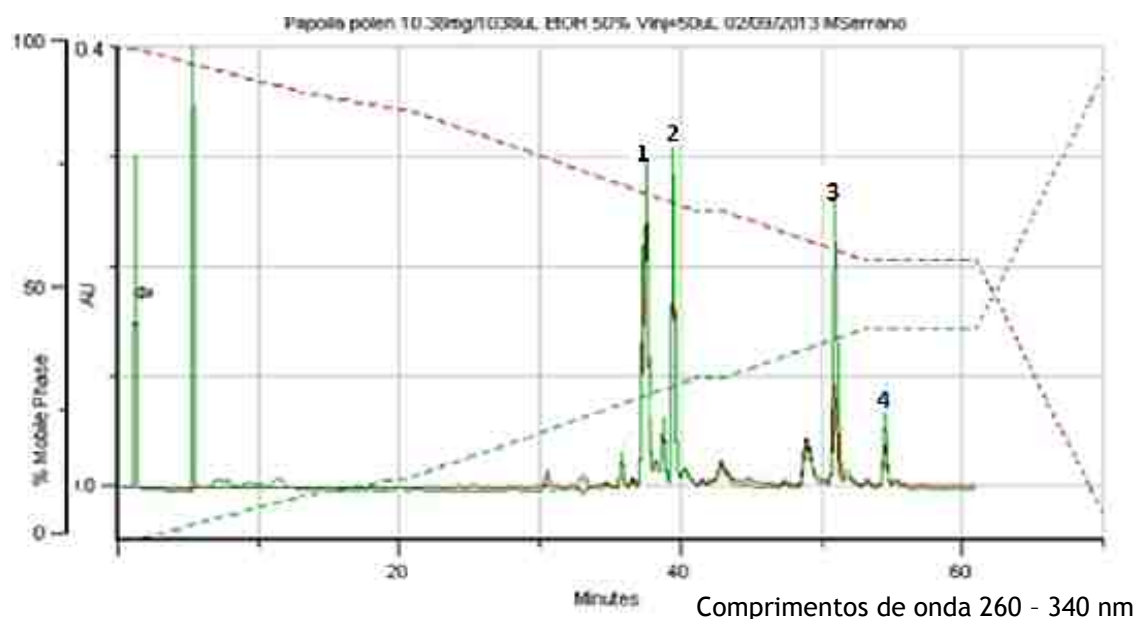
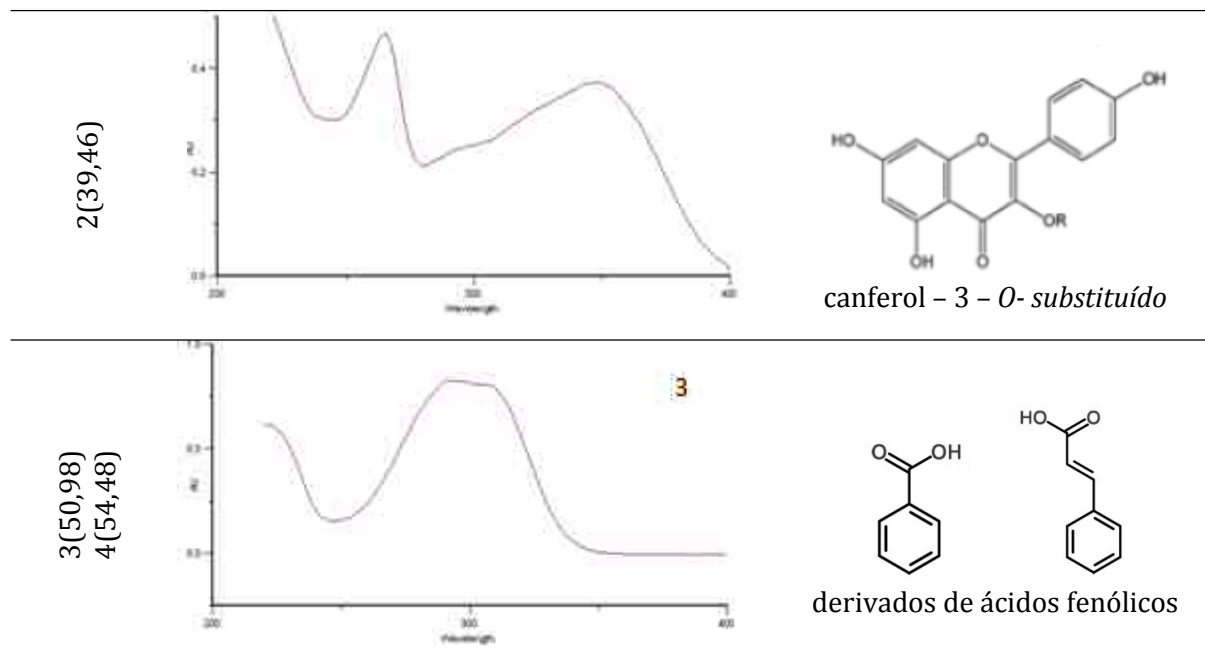


Figura 19 – Cromatograma da *Papaver rhoeas*.

Em comparação com outras espécies vegetais em estudo, a espécie *Papaver rhoeas* apresenta picos bastante elevados, indicando elevadas concentrações dos compostos presentes (Figura 19) relativamente a outras amostras. No entanto, ao comparar esta espécie com a *Opuntia* spp. é possível identificar os mesmos compostos presentes nas duas espécies mas com perfis diferentes nas quantidades relativas. O pico 1 e 2 são derivados da quercetina e os picos 3 e 4 são derivados de ácidos fenólicos. Na espécie *Opuntia* spp. os compostos presentes são idênticos, havendo diferenças entre os derivados presentes em ambas as espécies e nas concentrações dos compostos. Contudo o tempo de retenção nas duas espécies não apresenta grandes diferenças podendo corresponder a estruturas muito idênticas.

Tabela 14 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Papaver rhoeas*.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1(37,38)		 quercetina - 3 - O-substituída



5.1.14. *Silybum marianum*

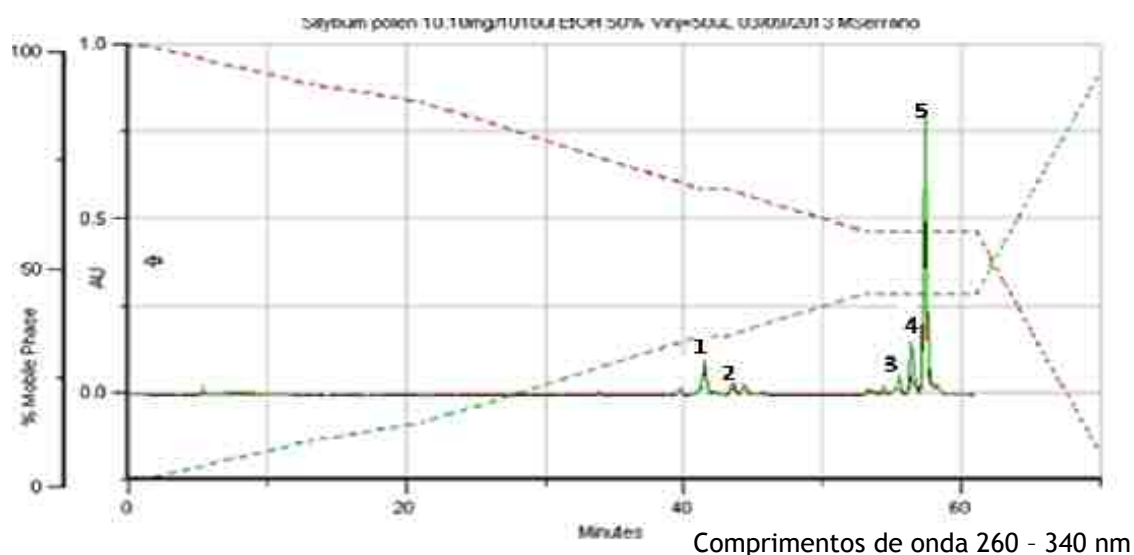
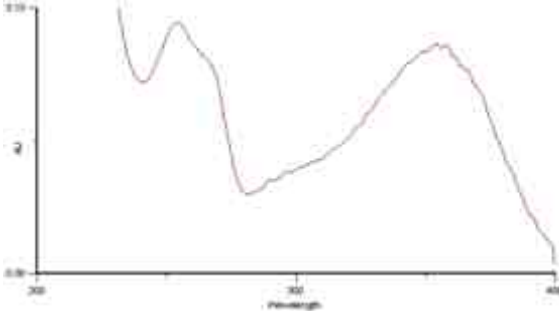
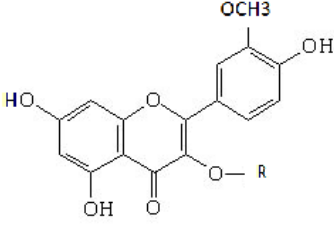
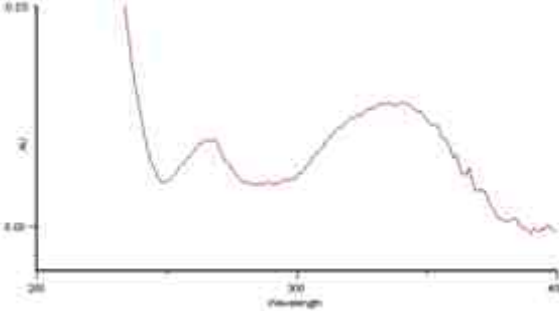
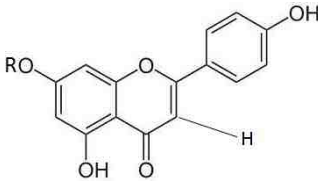
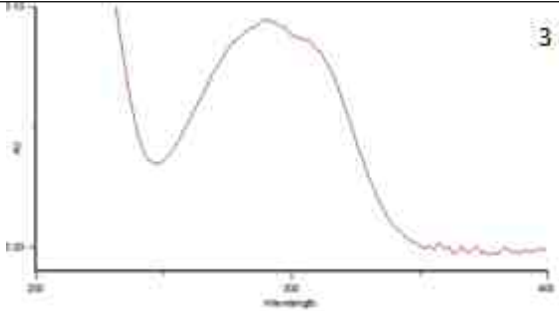
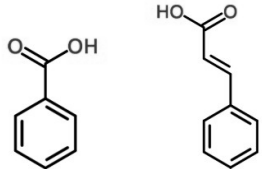


Figura 20— Cromatograma da *Silybum marianum*.

O perfil cromatográfico dos compostos fenólicos e polifenólicos do pólen de *Silybum marianum* está representado por 5 picos na Figura 20, onde se podem observar várias diferenças entre eles. O composto do pico 5 mostra uma elevada concentração em comparação aos restantes. Enquanto os picos 1 e 2 têm um tempo de retenção após os 40 minutos, os picos 3, 4 e 5 são retidos até muito perto dos 60 minutos. Observa-se ainda que os últimos picos apresentam um tempo de retenção muito semelhante e ao analisar o espectro de absorção conclui-se que são derivados de um ácido fenólico, possivelmente com núcleo básico cinâmico. O composto correspondente ao pico 1 é

identificado como sendo uma isoramnetina-3-*O*-substituída e o pico 2 uma flavona apigenina-7-*O*-substituída, presente em baixa concentração nesta espécie.

Tabela 15 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do *Silybum marianum*.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1 (41,56)		 <p data-bbox="975 936 1350 965">isoramnetina-3-<i>O</i>- substituída</p>
2 (43,58)		 <p data-bbox="983 1261 1334 1301">apigenina-7-<i>O</i>- substituída</p>
3 (55,47) 4 (56,49) 5 (57,18)		 <p data-bbox="975 1574 1350 1608">derivados de ácidos fenólicos</p>

5.1.15. *Tilia* spp.

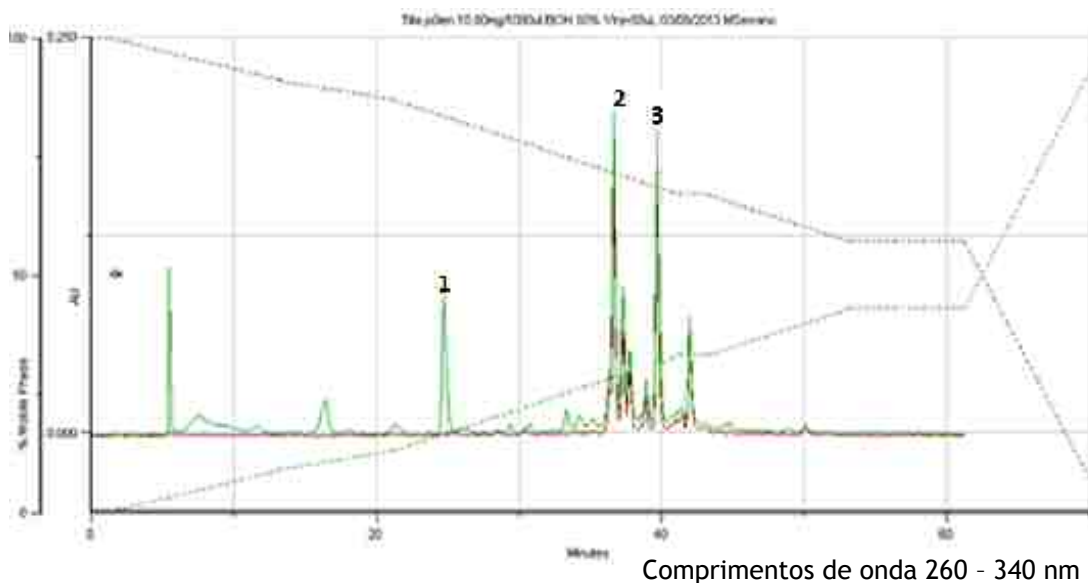
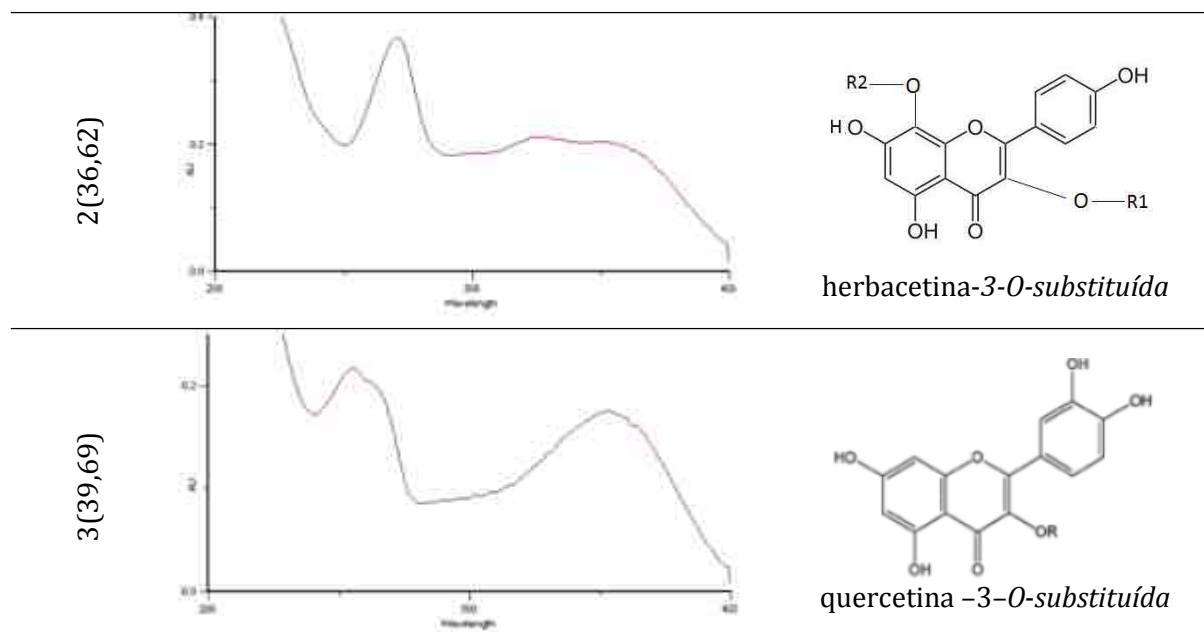


Figura 21 – Cromatograma da *Tilia* spp.

O penúltimo género em estudo, a *Tilia* spp., ostenta 3 picos (Figura 21) de altas concentrações, demonstrando que estes compostos estão maioritariamente presentes no pólen desta espécie. Esses compostos são nomeadamente herbacetina-3-O-substituída para o pico 2 e quercitina-3-O-substituída pico 3. Os tempos de retenção são diferentes principalmente do pico 1, desconhecido, que tem cerca de 12 minutos de intervalo para os outros. O pico 1 tem o seu tempo de retenção a ocorrer entre os 20 e os 30 minutos enquanto os picos 2 e 3 aproximadamente por volta dos 40 minutos.

Tabela 16 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas da *Tilia* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1(24,81)		Não identificado



5.1.16. *Viburnum tinus*

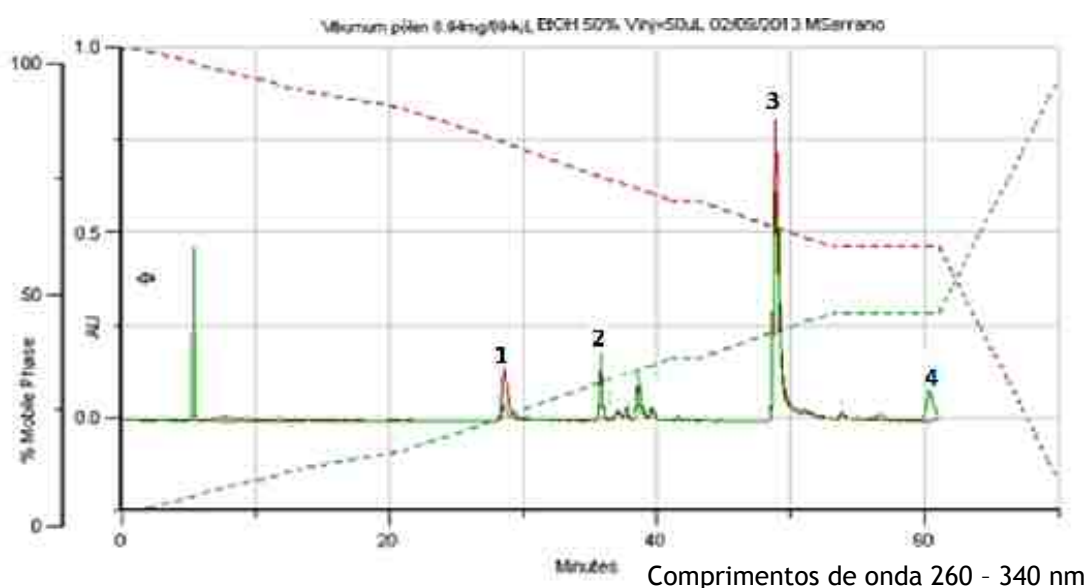


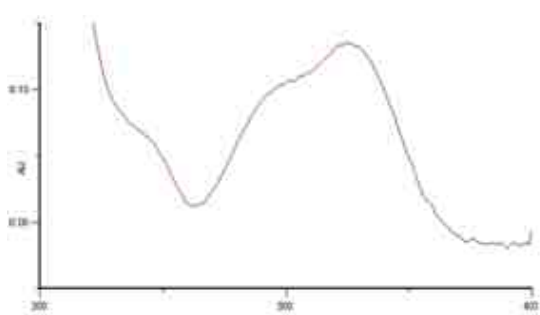
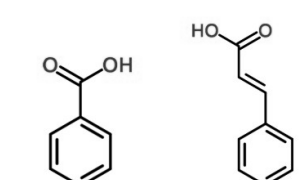
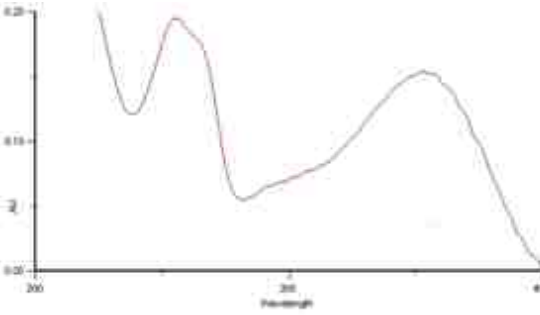
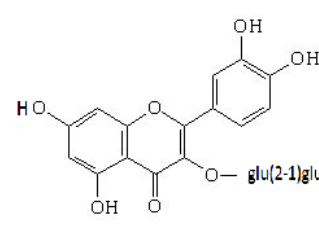
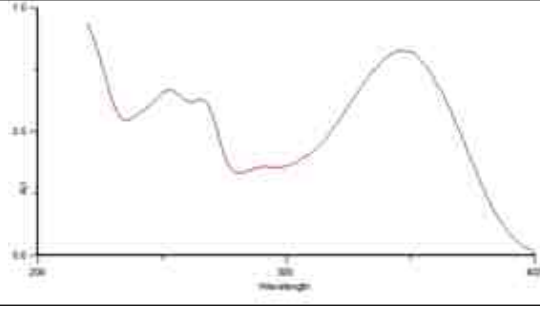
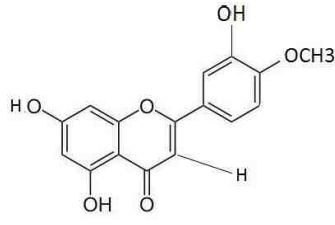
Figura 22 – Cromatograma do *Viburnum tinus*.

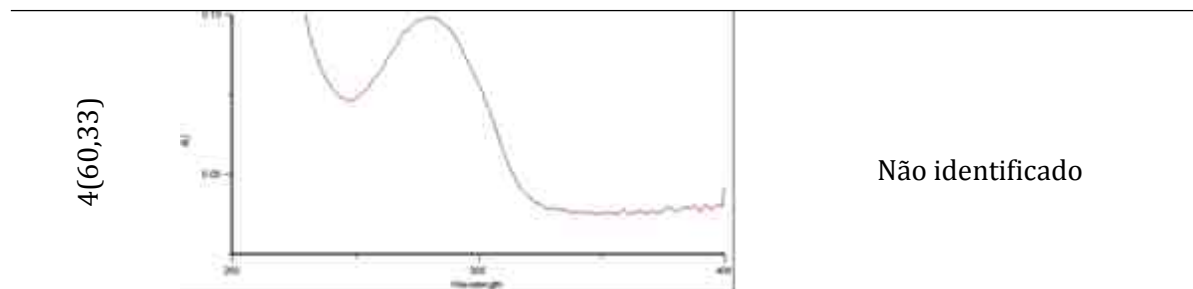
A última espécie em estudo neste trabalho é o *Viburnum tinus* cujo perfil cromatográfico dos fenóis e polifenóis do pólen se representa na Figura 22. Possui quatro picos distanciados uns dos outros. É possível observar que os picos 1, 2 e 4 têm uma concentração similar em comparação com o pico 3 que apresenta uma concentração muito elevada relativamente aos outros. Também se pode observar a grande disparidade no tempo de retenção (T_r) entre os 4 picos. Os picos 1 e 2 são retidos entre os quase 30 e os 40 minutos, o pico 3 aos 48,88 minutos e por último o pico 4 aos 60,33 minutos. Esta disparidade de tempo entre os picos pode estar relacionada com o facto de terem todas polaridades bem distintas. Conforme o

indicado na Tabela 17, o pico 1 é um derivado de um ácido fenólico, provavelmente do cafeico, o pico 2 uma quercetina - 3 - O soforósido, já identificada em vários outros pólenes de outras espécies apresentadas neste trabalho, o pico 3 que apresenta uma elevada concentração é uma flavona, provavelmente, um derivado da diosmetina e o último pico é desconhecido.

Apareceram em algumas amostras espectros similares que podem corresponder a estruturas com anéis aromáticos como o caso de alguns aminoácidos ou de alcalóides que deles derivam. Porém neste trabalho não foi possível fazer esse tipo de pesquisa.

Tabela 17 - Espectros de absorção com os seus respectivos compostos/estruturas do *Viburnum tinus*.

Númeo do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(28,67)		 derivado do ácido fenólico
2(35,82)		 quercetina -3-O-soforósido
3(48,88)		 derivado da diosmetina



5.2. Recolha de pólen apícola da região centro do país

O pólen apícola usado neste estudo foi colhido no mesmo apiário, sendo realizada posteriormente a separação por cores, uma vez que as cargas polínicas podem apresentar diferentes cores consoante as várias origens florais. Embora extremamente difícil a sua separação física por cores (o que alguns autores tentam fazer com outras técnicas mais sofisticadas com recurso a medição correcta das mesmas para maior eficiência do processo), neste trabalho essa separação realizou-se recorrendo apenas ao processo manual e por visualização directa junto de uma boa fonte luminosa, assinalando cada amostra separada com um código.

Observou-se que existia no pólen uma variação de cores entre escuro e claro que pode estar relacionada com a humidade presente no pólen, isto é, quando o conteúdo em água é baixo a cor do pólen é mais escura e quando a humidade é maior a cor do pólen é mais claro.

5.2.1. Pólen Apícola de *Echium* spp.

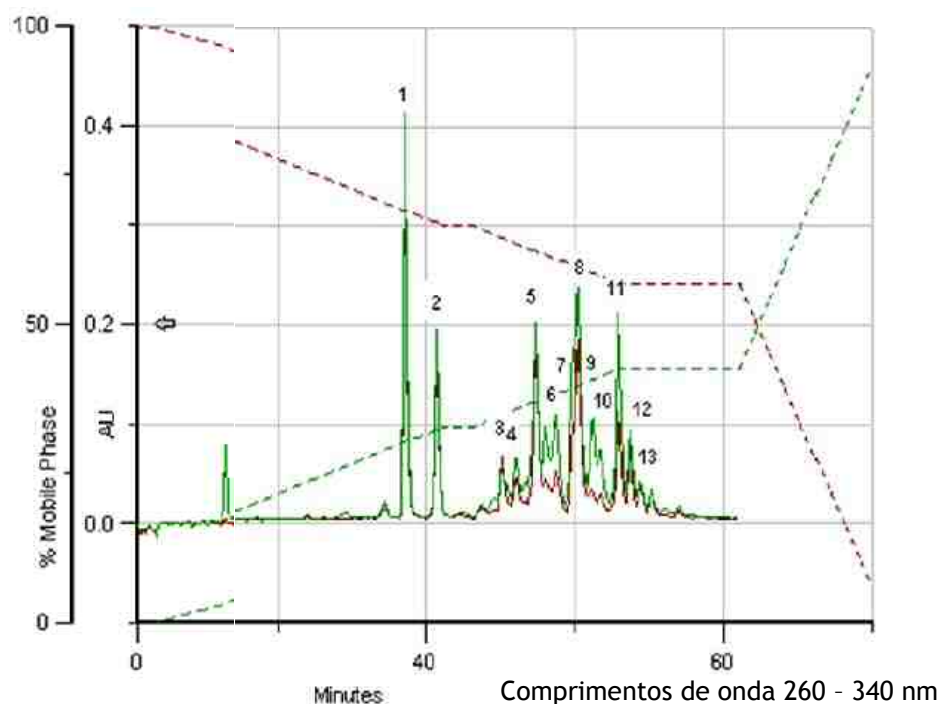
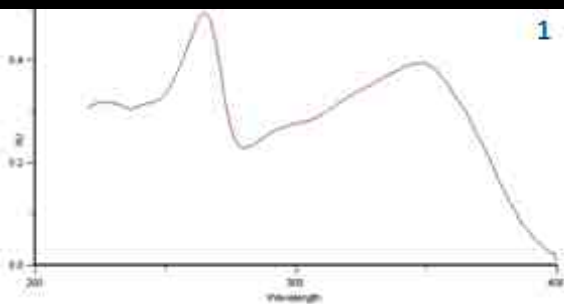
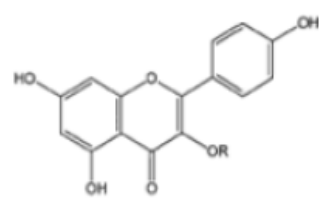
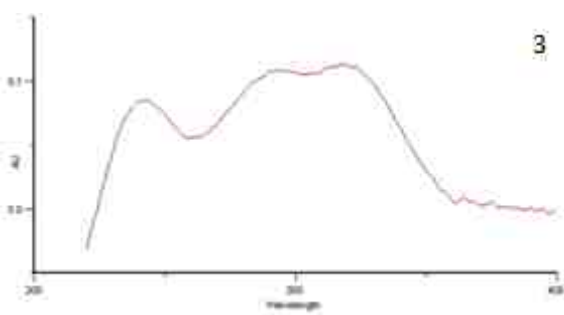
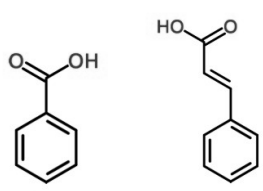


Figura 23 – Cromatograma do pólen apícola de *Echium* spp.

No cromatograma da Figura 23 observa-se que esta amostra apresenta 13 picos, sendo os dois primeiros como está descrito na Tabela 18 do canferol -3-*O*-substituído, ambos tem um tempo de retenção perto dos 40 minutos, enquanto os restantes picos ocorrem entre os 40 e os 60 minutos sendo derivados de ácidos fenólicos possivelmente derivados do cafeico. Estes compostos heterosidicos do canferol aparecem em pólen de *Coleostephus myconis* e de *Digitalis purpurea* com um tempo de retenção muito próximo. O pico 1 é o que está presente em maior quantidade nesta carga polínica. E os picos de 3 a 13 embora sejam todos derivados de ácidos fenólicos apresentam concentrações muito diferentes. Através da identificação polínica por microscopia feita às amostras foi permitido identificar que o género envolvido nesta amostra é *Echium* spp.

Tabela 18 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola *Echium* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1(38,58) 2(40,73)		 canferol -3- <i>O</i> -substituído,
3(45,09) 4(46,03) 5(47,31) 6(48,03) 7(48,74) 8(50,19) 9(51,18) 10(51,68) 11(52,89) 12(53,68) 13(54,33)		 derivados de ácidos fenólicos

5.2.2. Pólen Apícola de *Reseda* spp.

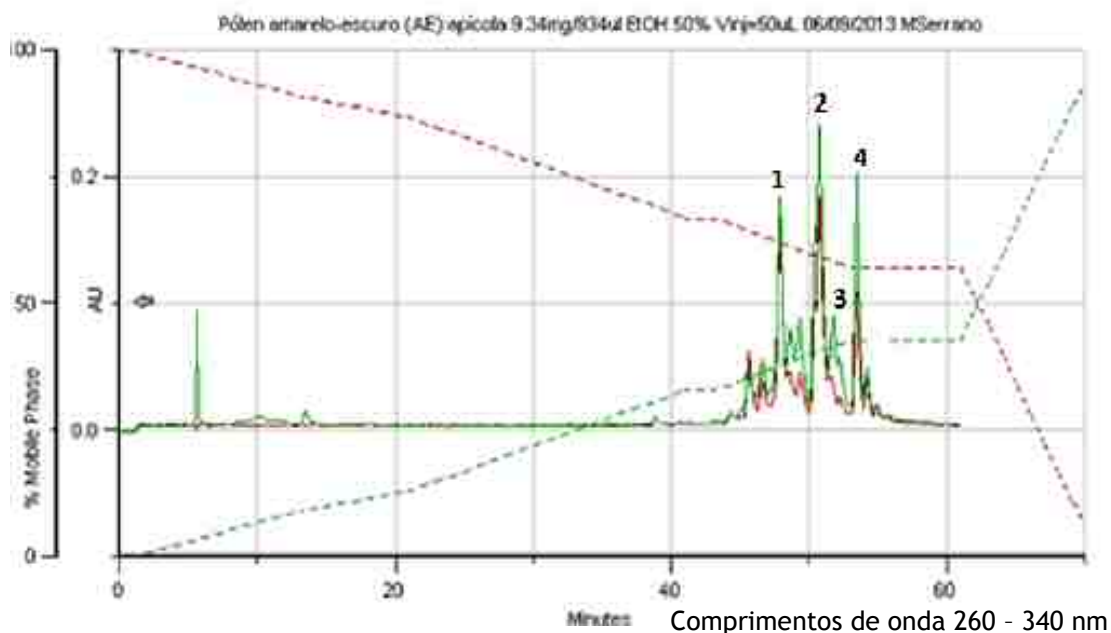
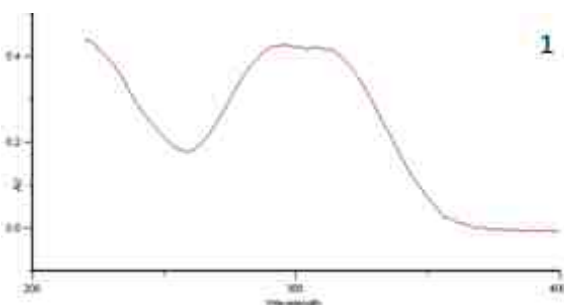
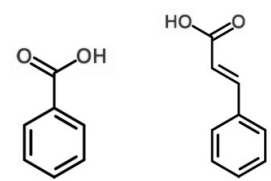


Figura 24 – Cromatograma do pólen apícola de *Reseda* spp.

A carga polínica representada no cromatograma da Figura 24 tem 4 picos todos derivados de ácidos fenólicos e observa-se que o tempo de retenção destes compostos é mantido entre os 40 e 50 minutos. Ao se identificar qual o género nesta carga polínica ficou comprovado que este género não corresponde a nenhuma das espécies que foram apresentadas anteriormente dado que todas elas apresentavam flavonóides e derivados de ácidos fenólicos, polimerizados ou apenas glicosilados mas sempre em simultâneo. No entanto, muitas vezes o conteúdo relativo entre eles eram bastante dispare e por vezes apresentando uma variedade grande de derivados de ácidos fenólicos tal como acontece com este género que foi identificado através de microscopia como sendo o género *Reseda* spp.

Tabela 19 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da *Reseda* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1(47,86) 2(50,75) 3(51,75) 4(53,42)		 derivados de ácidos fenólicos

5.2.3. Pólen Apícola de *Crepis* spp.

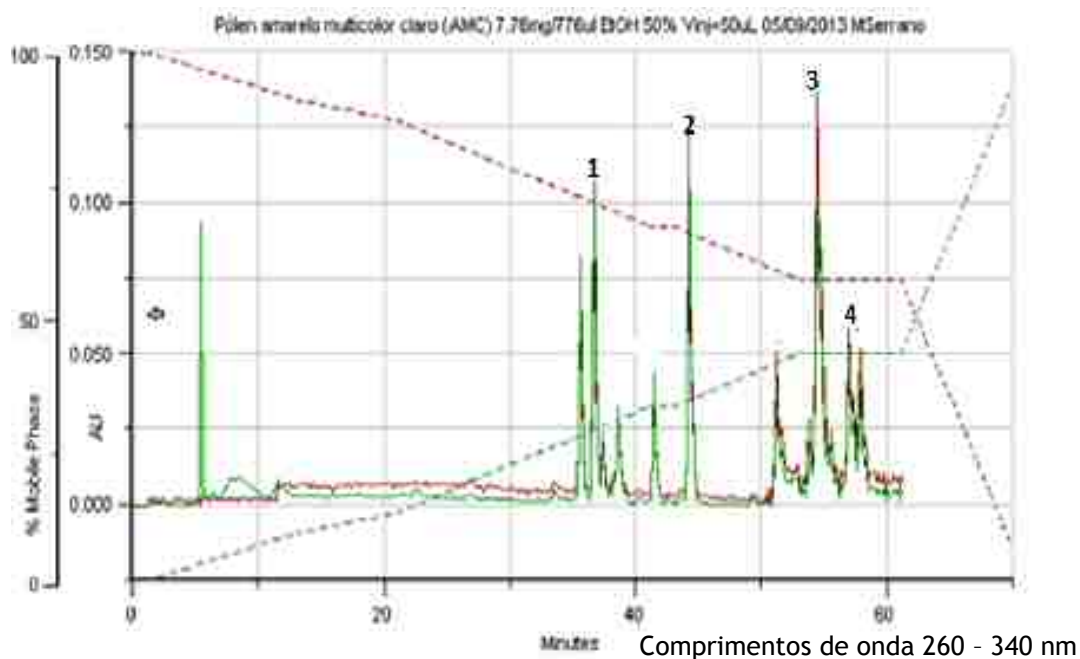


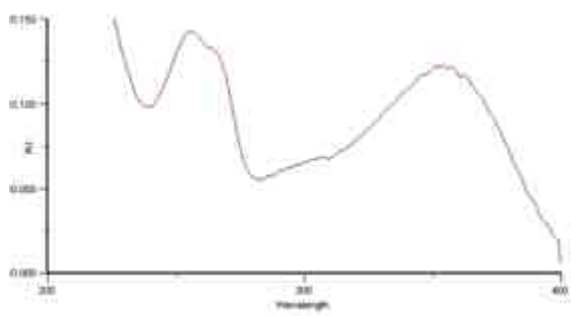
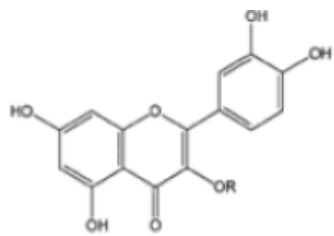
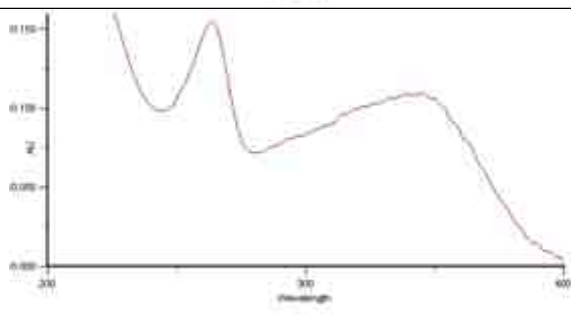
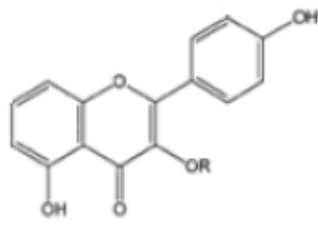
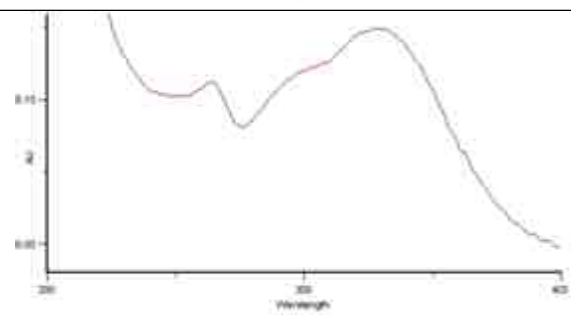
Figura 25 – Cromatograma do pólen apícola de *Crepis* spp.

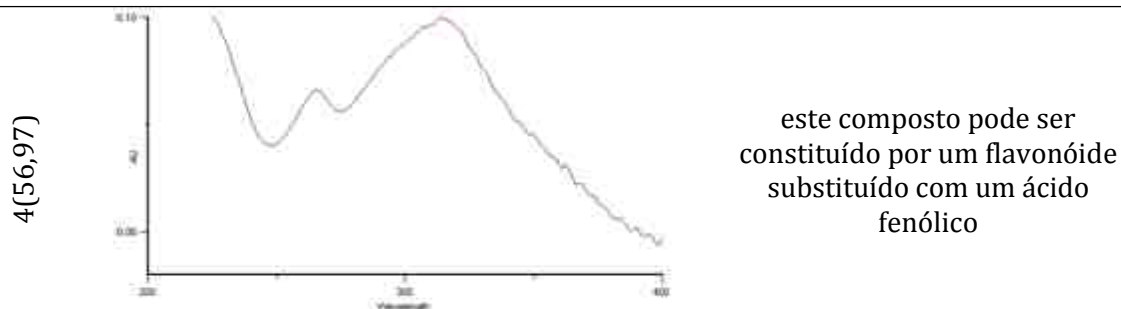
Os picos 1 e 2 do cromatograma da Figura 25 como está representado na Tabela 20, são derivados da quercetina e do canferol ambos substituídos em C3-O-, sendo a diferença entre estes os dois compostos no C3', em que o composto do pico 1 têm OH e o composto do pico 2 não tem. Ambos os compostos estão presentes nesta carga polínica em elevada quantidade e o tempo de retenção é relativamente junto, o pico 1 ocorre aos 36,72 minutos e o pico 2 aos 44,23 minutos. O pico 3 está assinalado na Tabela como sendo possivelmente derivado de um flavonóide substituído com um ácido fenólico (talvez derivado do ácido cafeico), enquanto o pico 4 poderá ser

similar, mas substituído com outro ácido, não sendo possível apenas com estes espectros saber quais os compostos que estão presentes e qual a sua estrutura.

Pode-se apenas analisar que é o composto do pico 3 que está em maior quantidade na carga polínica e que o composto do pico 4 em menor quantidade. Ambos têm um tempo de retenção entre os 50 e 60 minutos. Esta análise mostra que é necessário continuar a estudar os compostos presentes no pólen apícola. Este género foi identificado como sendo *Crepis* spp. através de identificação microcópica.

Tabela 20 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da *Crepis* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/Estrutura
1 (36,72)		 quercetina - 3 - <i>O</i> -substituída
2 (44,23)		 canferol - 3 - <i>O</i> -substituído
3 (54,47)		este composto pode ser constituído por um flavonóide substituído com um ácido fenólico possivelmente derivado do ácido cafeico.



5.2.4. Pólen Apícola de *Olea europea* L.

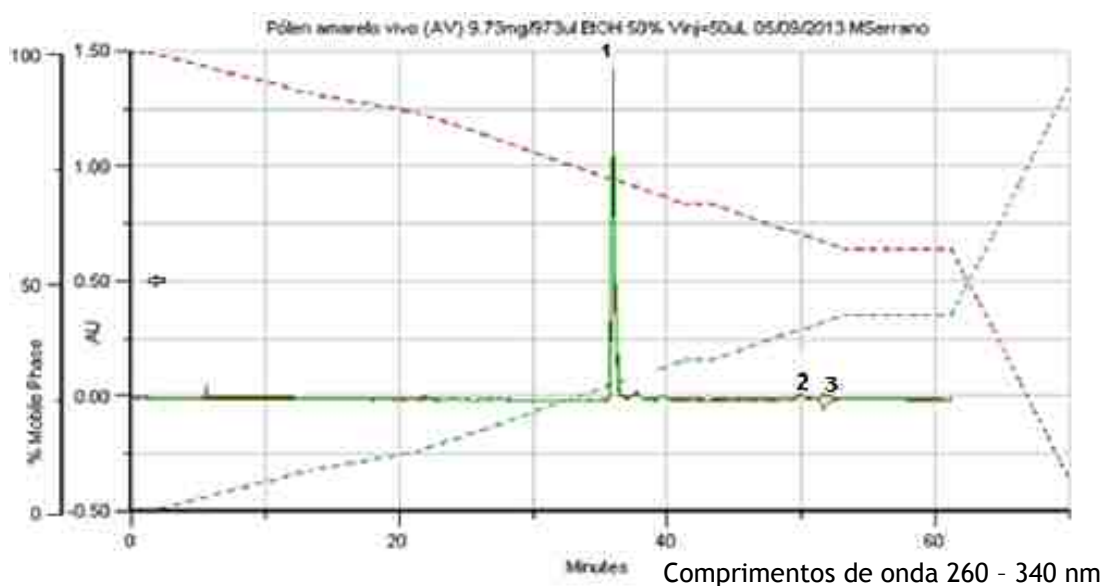


Figura 26 – Cromatograma do pólen apícola de *Olea europea* L.

No cromatograma da Figura 26 o composto com maior concentração é o do pico 1 que como se pode observar na Tabela 21 é a quercetina - 3 - *O* sofrósido, tendo um tempo de retenção de 35,77 minutos. Já os outros dois picos apresentam uma baixa concentração sendo os compostos em menor quantidade nesta carga polínica e consoante o que se vê na Tabela o pico 2 é dihidroflavonol e o pico 3 uma naringenina-chalcona. Ambos ocorrem a um tempo de retenção muito próximo dos 50 minutos. Esta carga polínica é pólen de *Olea europea* L. como se pode confirmar comparando com o cromatograma e os respectivos compostos da Figura 18 e Tabela 21.

Tabela 21 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da *Olea europea* L.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1 (35,77)		<p>quercetina – 3 – O soforósido</p>
2 (49,84)		<p>dihidroflavonol</p>
3 (51,63)		<p>naringenina-chalcona</p>

5.2.5. Pólen Apícola de *Raphanus* spp.

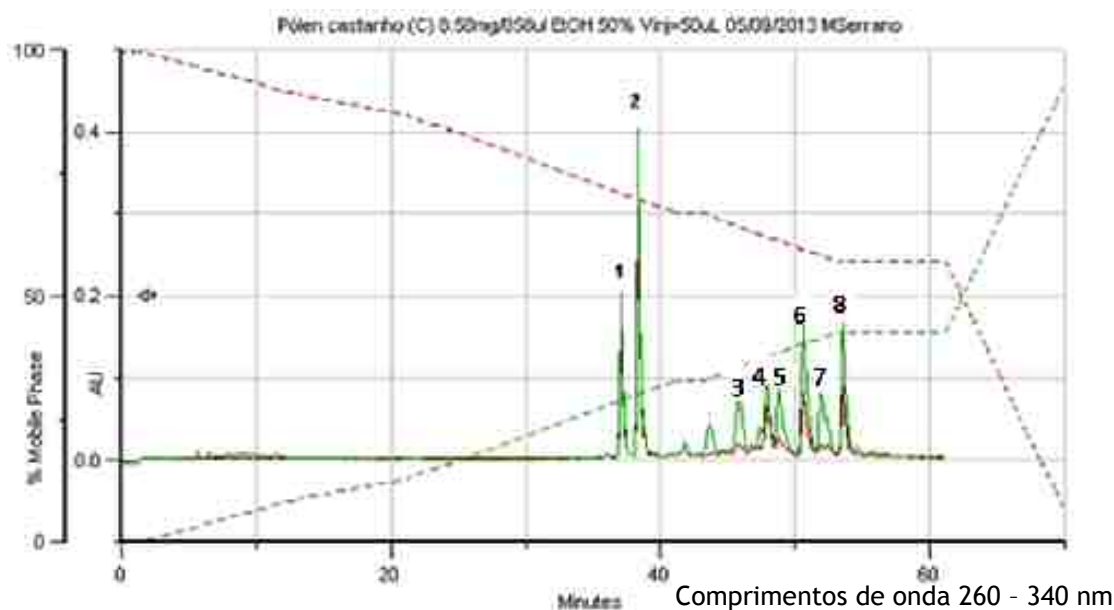
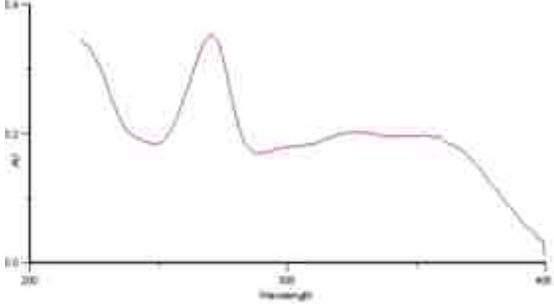
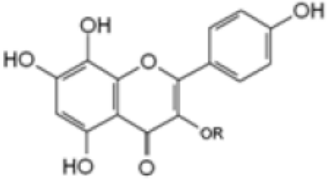
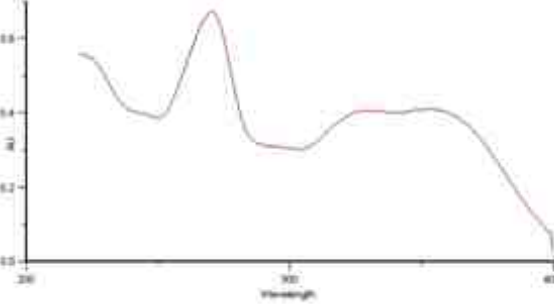
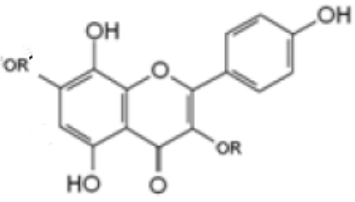
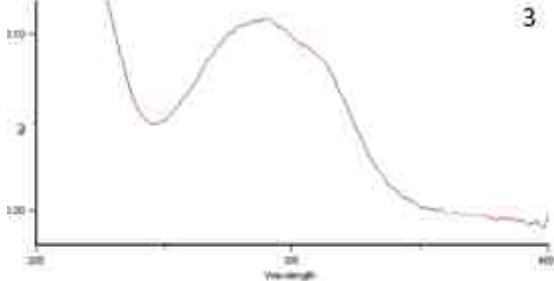
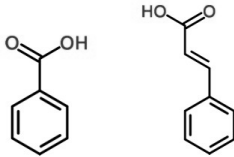


Figura 27— Cromatograma do pólen apícola de *Raphanus* spp.

No cromatograma da Figura 27 podemos ver que existe uma grande concentração de compostos fenólicos, sendo o maioritário representado pelo pico 2 seguido pelo pico 1, tanto o composto do pico 2 como o do pico 1 são ambos derivados da herbacetina - 3-*O*-substituída, sendo o composto 2 também 7-*O*-substituído enquanto os compostos dos picos 3 a 8 são derivados de um ácido fenólico. Os picos derivados do ácido fenólico têm a característica do seu tempo de retenção ser compreendido entre os 40 e 60 minutos, o que revela uma gama grande de polaridades normalmente atribuída aos substituintes tal como se pode confirmar na Tabela 22 onde estão as estruturas destes compostos.

Algumas espécies contêm este tipo de herbacetinas tal como a Tília (Tabela 16) e o *Ulex europeus* (Campos, 1997), porém o tempo de retenção é diferente do que aparece nesta carga polínica que se acredita ser devido ao substituinte, que é biossintetizado neste género *Raphanus* spp.

Tabela 22 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da *Raphanus* spp.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(37,08)		 <p>herbacetina - 3 - <i>O</i>-substituída</p>
2(38,32)		 <p>herbacetina - 3,7 - <i>O</i>-di-substituída</p>
3(45,77) 4(47,92) 5(48,78) 6(50,60) 7(51,94) 8(53,56)		 <p>derivados de ácidos fenólicos</p>

5.2.6. Pólen Apícola de *Trifolium repens*

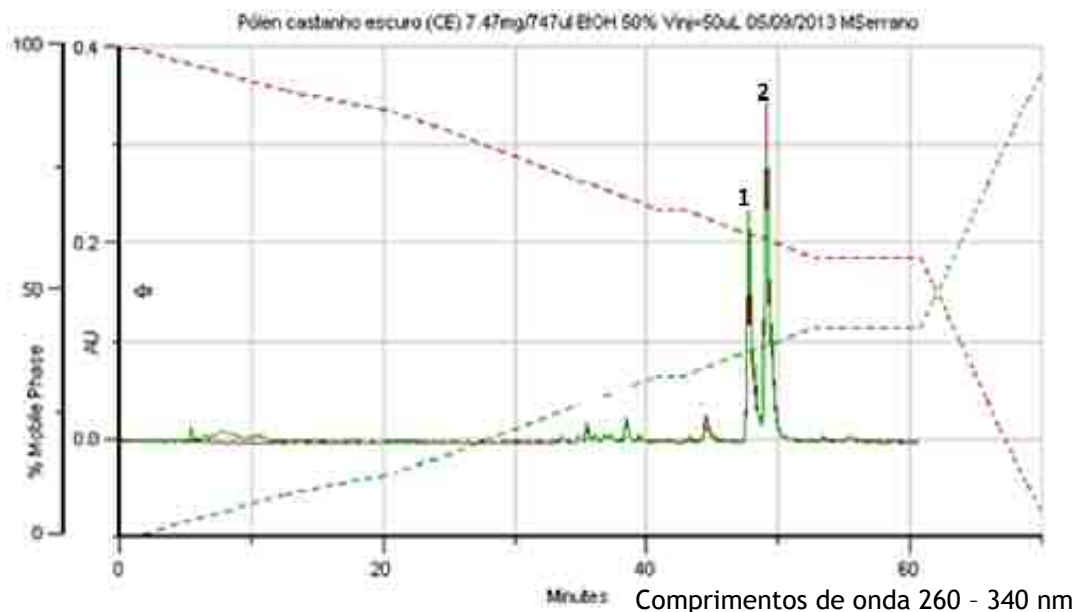
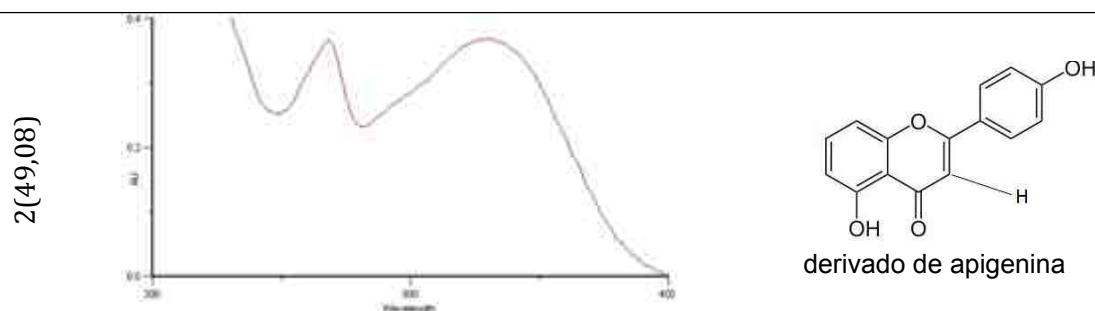


Figura 28 — Cromatograma do pólen apícola de *Trifolium repens*.

Nesta carga polínica ao analisa-se o cromatograma da Figura 28 observa-se que estão presentes quantidades relevantes de dois compostos e que ambos ocorrem num tempo de retenção muito próximo. O primeiro a 47,73 e o segundo a 49,08 minutos. Na Tabela 23 nota-se que os dois compostos presentes são ambos flavonas, estando a diferença entre elas presente apenas no C8, em que a flavona representada pelo pico 1 tem um OR, enquanto a do pico 2 não tem presente. Esta espécie foi identificada como sendo *Trifolium repens*.

Tabela 23 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola de *Trifolium repens*.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(47,73)		<p>derivado da diosmetina</p>



5.2.7. Pólen Apícola amostra “CZ”

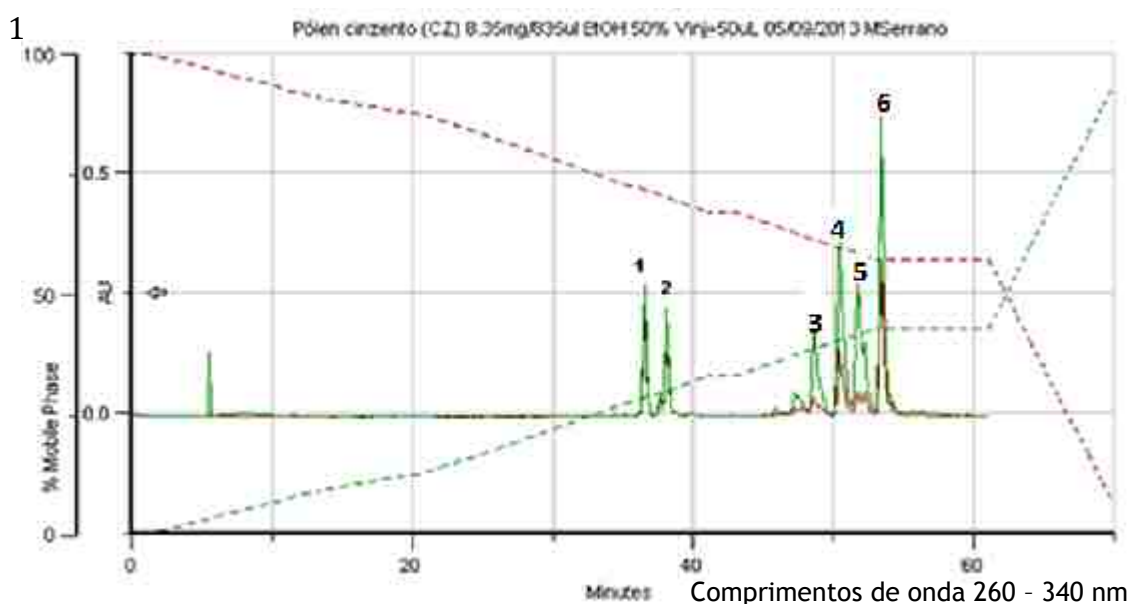
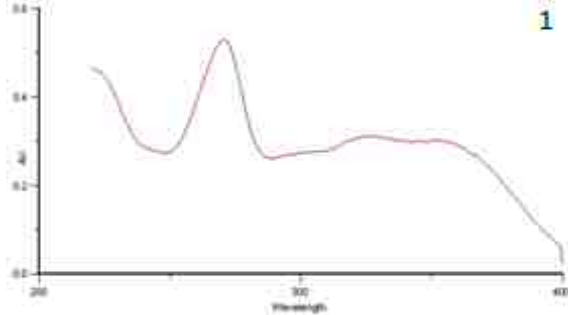
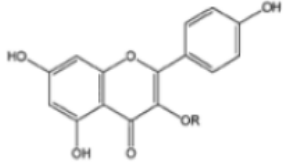
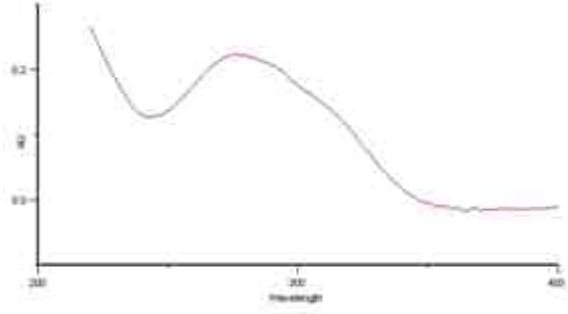
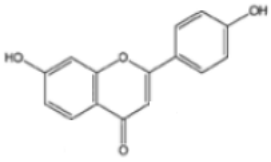
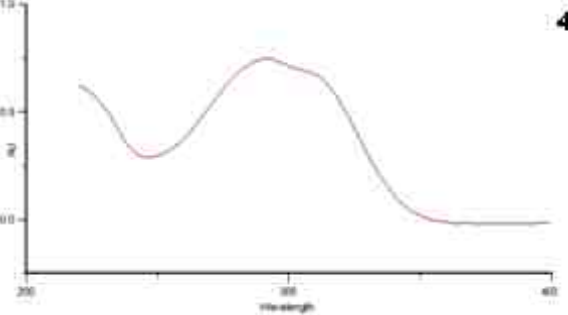
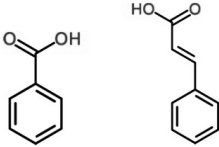


Figura 29 – Cromatograma do pólen apícola carga polínica “CZ”.

Não foi possível identificar qual a espécie presente nesta carga polínica, por isso identificou-se com o código “CZ”, que indica a cor que os grãos de pólen apresentavam.

A apresentação deste cromatograma (Figura 29) mostra que os dois primeiros picos ocorrem com um tempo de retenção antes dos 40 minutos e ao serem analisados mostraram ser derivados da herbacetina-3-O e que o pico 3 é dihidroflavonol com um tempo de retenção antes dos 50 minutos. Os últimos três picos tendo em conta o seu tempo de retenção tudo indica que sejam derivados do ácido fenólico como se comprova consoante o que está descrito na Tabela 24. É o pico 6 o que está presente em maior quantidade seguido pelo pico 4 também um derivado do ácido fenólico, por isso os compostos maioritariamente presentes nesta carga polínica são derivados do ácido fenólico.

Tabela 24 - Espectros de absorção com os seus respetivos composto/estrutura do pólen apícola carga polínica "CZ".

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(36,54) 2(38,10)		 derivado da herbacetina - 3 - O
3(48,62)		 dihidroflavonol
4(50,39) 5(51,73) 6(53,18)		 derivados de ácidos fenólicos

5.2.8. Pólen Apícola da amostra “LC”

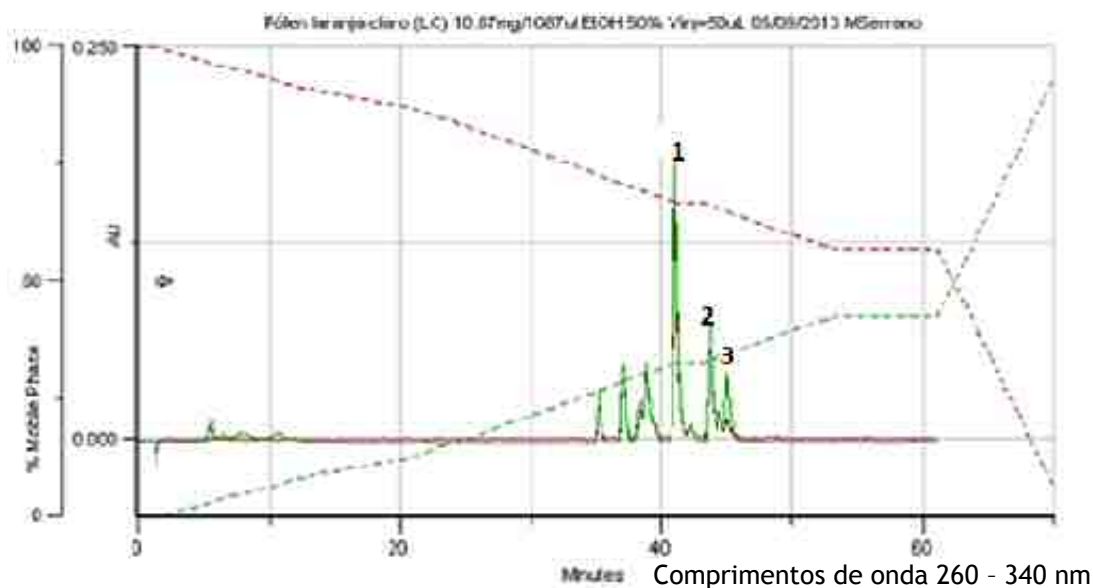
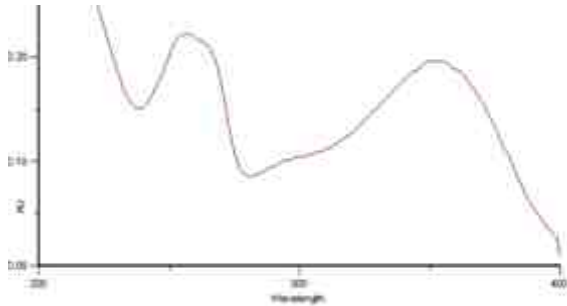
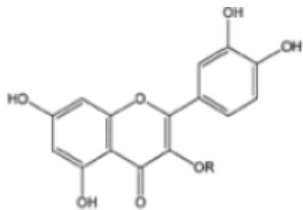
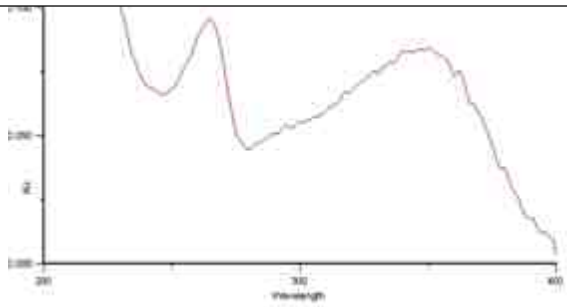
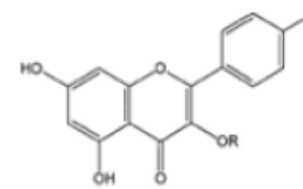
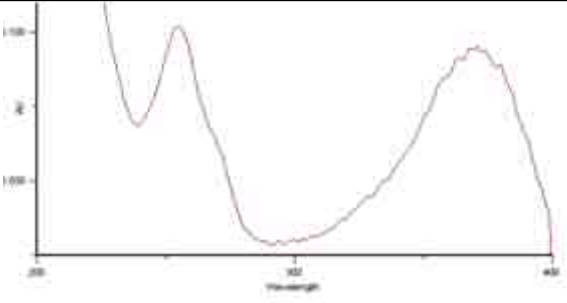
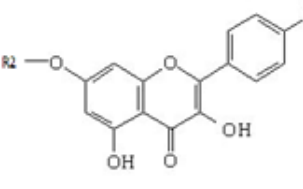


Figura 30 – Cromatograma do pólen apícola carga polínica “LC”.

Dois dos três compostos presentes nesta carga polínica são derivados da quercetina - 3 - O, no entanto, os compostos apresentam espectros diferentes (Tabela 25) porque o pico 3 também é substituído em C7 (O - R). O pico 2 corresponde a um caemferol derivado em C3 como muitos outros similares descritos em outras espécies. O tempo de retenção dos três compostos ocorre depois dos 40 minutos, nomeadamente 41,05 minutos no primeiro, 43,67 minutos no segundo e 45,03 minutos no terceiro.

Não foi possível identificar a qual espécie pertence esta carga polínica, sendo a sua identificação neste texto feita apenas com um código que representa a cor dos grãos de pólen.

Tabela 25 - Espetros de absorção com os seus respetivos composto/estrutura do pólen apícola carga polínica "LC".

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(41,05)		 <p data-bbox="1023 752 1398 786">derivado da quercetina - 3 - O</p>
2(43,67)		 <p data-bbox="1023 1059 1398 1093">derivado do caemferol - 3 - O</p>
3(45,03)		 <p data-bbox="1010 1350 1410 1417">derivado da quercetina - 7 - O-Substituído</p>

5.2.9. Pólen Apícola da amostra “LE”

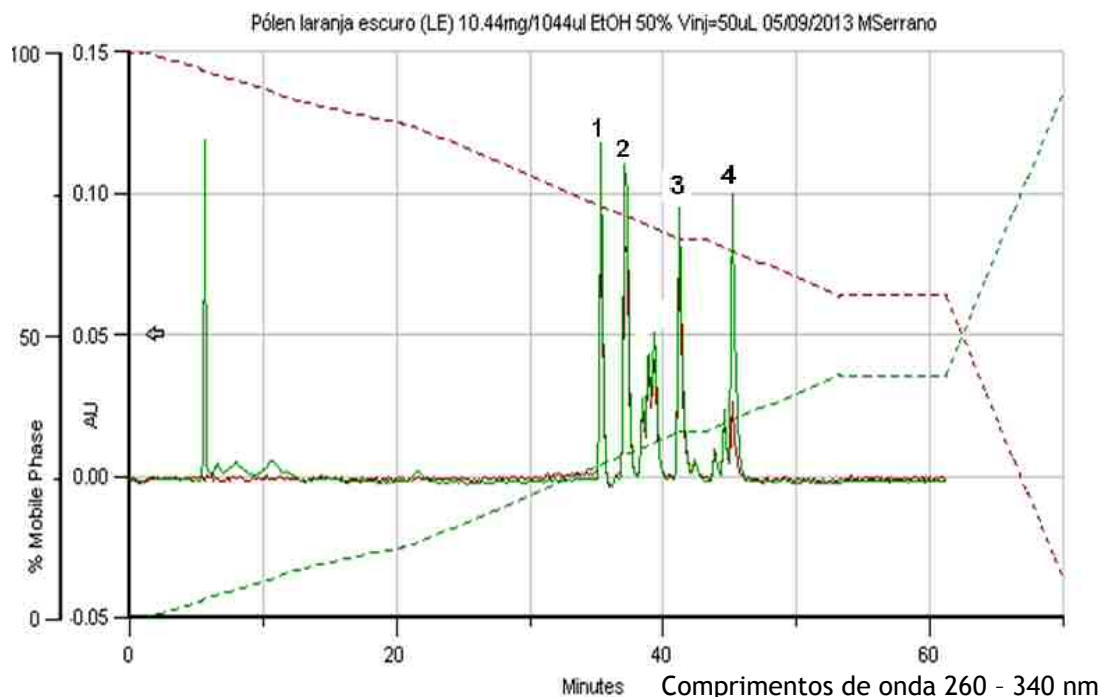


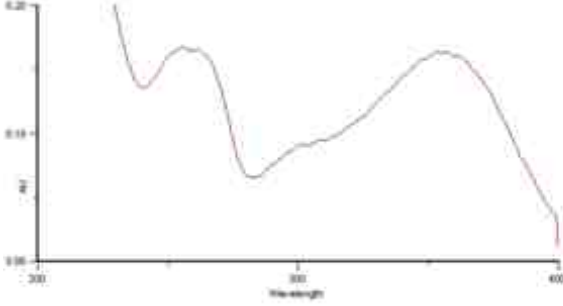
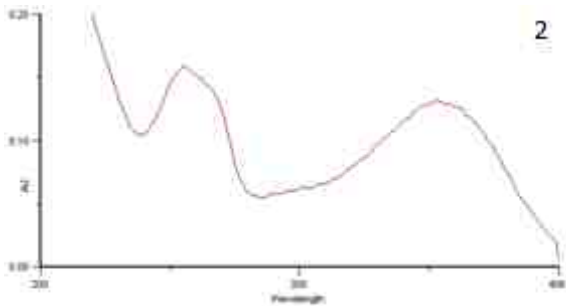
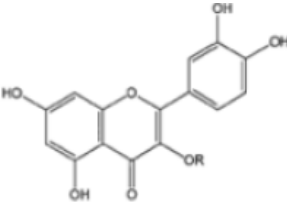
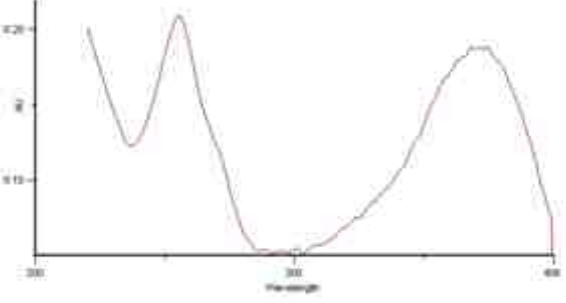
Figura 31 – Cromatograma do pólen apícola carga polínica “LE”.

Cromatograma (Figura 31) apresenta concentrações similares dos compostos presentes nesta carga polínica. Com os compostos representados pelos picos 1, 2, 3 e 4. Todos os picos ocorreram próximos uns dos outros, por isso o tempo de retenção destes compostos não vai ser muito distante. O tempo de retenção encontra-se entre os 30 e os 40 minutos.

Em relação aos compostos presentes nesta carga polínica conforme se pode ver na Tabela 26. O composto representado pelo pico 1 trata-se de um derivado da luteolina, enquanto os compostos representados pelos picos 2, 3 são todos derivados da quercetina – 3 – *O-substituída*, e o 4 é um espectro que corresponde a uma genina provavelmente de quercetina ou de isorhamnetina que têm espectro similar nesta forma, embora nesta amostra existam quercetinas heterosídicas o que pode levar por hidrólise ao aparecimento de quercetina livre embora esta situação seja pouco frequente em pólenes.

Tal como nas amostras anteriores também esta espécie é desconhecida, não sendo possível fazer a sua identificação e mais uma vez o seu código representa a cor que os grãos de pólen apresentavam.

Tabela 26 - Espectros de absorção com os seus respectivos composto/estrutura do pólen apícola carga polínica "LE".

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(35,33)		luteolina -6 ou 8 - O -substituída
2(37,12) 3(41,23)		 <p data-bbox="1024 1079 1407 1111">derivado da quercetina - 3 - O</p>
4(45,20)		Este espectro corresponde a uma genina provavelmente de quercetina ou de isorhamnetina que têm espectro similar nesta forma

5.2.10. Pólen Apícola “R”

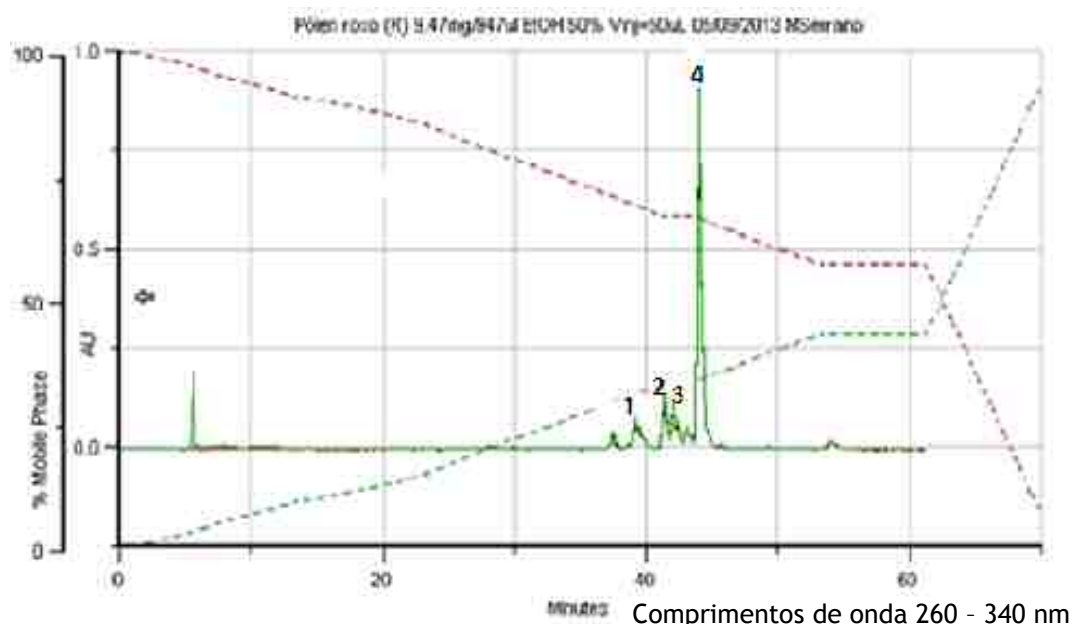


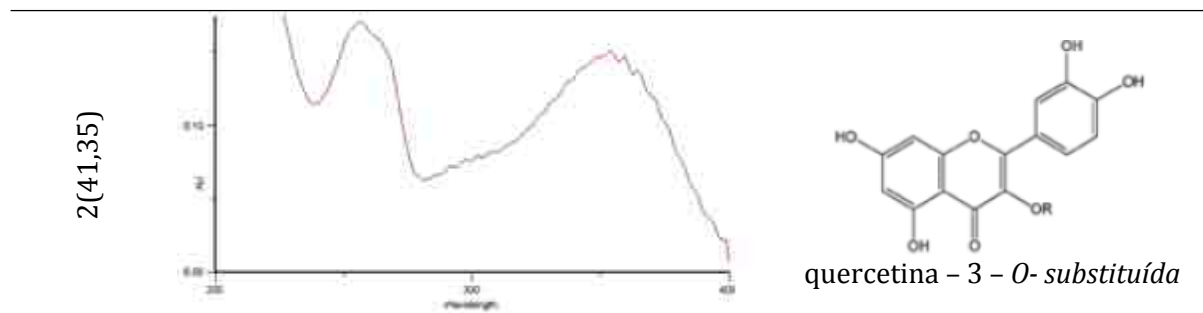
Figura 32 – Cromatograma do pólen apícola da carga polínica “R”.

É possível ver neste cromatograma (Figura 32) que o composto presente em maior quantidade é o do pico 4, em comparação aos picos 1, 2 e 3 que apresentam pouca concentração nesta carga polínica. Pode ainda observar-se no cromatograma que os quatro compostos ocorrem todos muito próximos uns dos outros, sendo o tempo de retenção aproximadamente aos 40 minutos. Ao analisar-se quais os compostos presentes conclui-se que os picos são derivados do canferol e da quercetina ambos substituídos em C3 (Tabela 27).

Esta espécie também não foi possível de identificar, por isso a sua carga polínica ficou identificada pelo código escolhido consoante a cor que os grãos de pólen apresentavam.

Tabela 27 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola da carga polínica “R”.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1 (39,11) 3 (41,99) 4 (43,95)		<p>canferol - 3 - O substituído</p>



5.2.11. Pólen Apícola *Galactites tomentosus*

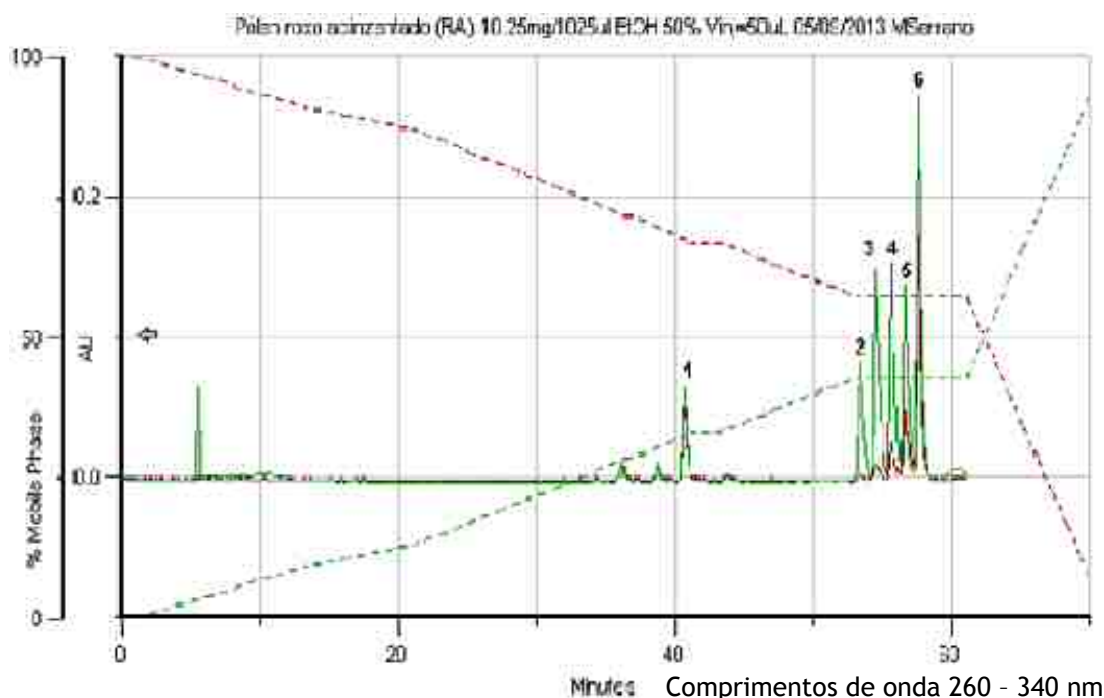


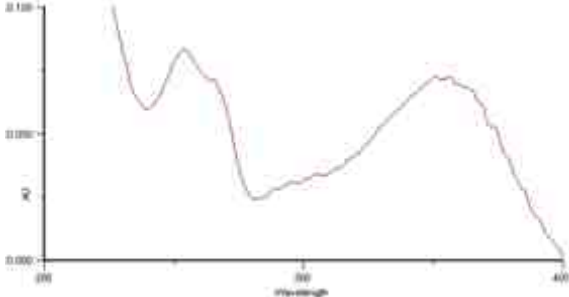
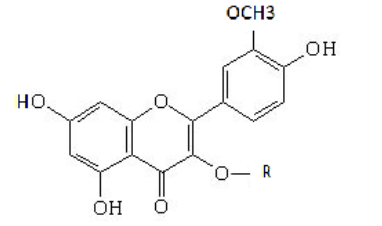
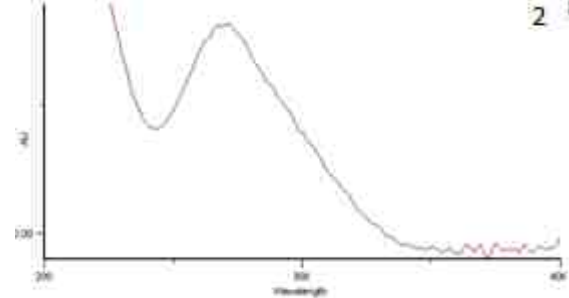
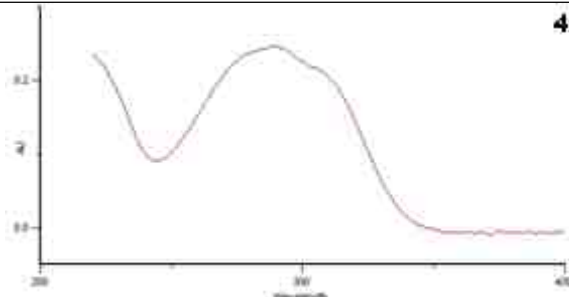
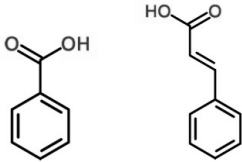
Figura 33 – Cromatograma do pólen apícola de *Galactites tomentosus*.

Analisando-se o cromatograma do perfil desta carga polínica na Figura 33 observa-se que o pico 6 é o que está em maior quantidade nesta espécie, no entanto os restantes picos como os picos 1 e 2 parecem ter uma concentração semelhante tal como acontece com os picos 3, 4 e 5. Na Tabela 28 está a identificação feita aos diferentes espectros e observa-se que o pico 1 é um derivado da isoramnetina-3-O *substituída*, o pico que apresenta um tempo de retenção inicial aos 40,72 minutos, enquanto os picos 2 e 3 são desconhecidos, e os picos 4, 5 e 6 que são derivados de um ácido fenólico. Estes últimos picos encontram-se todos com um tempo de retenção perto dos 60 minutos, característica comum nos derivados do ácido fenólico, nas espécies em estudo.

Esta carga polínica poderá corresponder à espécie *Galactites tomentosus* pois os tempos de retenção dos compostos são muito similares e apresentam a mesma estrutura por equivalência da absorção no ultravioleta da Figura 13 e Tabela 8. No entanto, nos derivados de ácidos fenólicos a proporção não é exactamente

sobreponível o que pode pressupor uma espécie diferente para o mesmo género ou mesmo uma subespécie.

Tabela 28 - Espectros de absorção com os seus respetivos compostos/estruturas do pólen apícola de *Galactites tomentosus*.

Número do pico (Tr/min)	Espectro	Composto/ Estrutura
1(40,72)		 <p>isoramnetina-3-O- substituída</p>
2(53,48) 3(54,61)		Não identificado
4(55,67) 5(56,58) 6(57,54)		 <p>derivados de ácidos fenólicos</p>

5.3. Análise dos Minerais

Na análise realizada aos minerais foi feita inicialmente a determinação dos diferentes metais pesados calculando com base na recta de calibração os limites de quantificação (LOQ), estando representado Na Tabela 29 esses limites.

Os resultados obtidos na análise realizada aos minerais estão representados na Tabela 30.

Tabela 29 - Limites de quantificação para os metais 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
Ni	1,00

Tabela 30 - Resultados dos minerais da análise elaborada às amostras.

Amostra	Cd (µg/kg)	Cu (mg/kg)	Cr (µg/kg)	Pb (µg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Ni (mg/kg)
<i>Acacia dealbata</i>	<LQ	7,62	<LQ	<LQ	90,6	79,6	21,0	17,90
<i>Bignonia</i> spp.	1613	18,8	538,0	2688	316	191	162	6,452
<i>Carpobrotus edulis</i>	<LQ	9,47	3528,3	<LQ	126	38,6	85,6	6,615
<i>Galactites tomentosus</i>	294,8	18,4	2325,8	<LQ	201	13,6	39,4	0,919
<i>Olea europaea</i> L.	<LQ	8,24	<LQ	<LQ	91,8	21,1	52,6	0,368
<i>Opuntia</i> spp.	<LQ	6,48	656,5	<LQ	41,8	65,4	51,6	5,614
<i>Papaver rhoeas</i>	<LQ	13,2	<LQ	<LQ	107	26,9	108	<0,4
<i>Silybum marianum</i>	<LQ	15,9	<LQ	<LQ	45,4	9,69	25,2	3,774
<i>Viburnum tinus</i>	<LQ	13,2	<LQ	<LQ	95,6	21,9	32,0	<0,4
Apícola <i>Crepis</i> spp.	<LQ	8,44	<LQ	<LQ	119	42,7	63,0	0,473
Apícola <i>Raphanus</i> spp.	835,7	6,44	<LQ	1573	241	118	103	1,870
Apícola "LE"	156,0	5,84	<LQ	<LQ	60,7	11,4	53,0	2,371

Ao se analisar a Tabela 30 pode-se observar que das espécies vegetais aquela que apresenta maior concentração de minerais é a amostra do género *Bignonia* spp., seguida pelas amostras da espécie *Galactites tomentosus* e do género *Opuntia* spp. No caso do pólen apícola é a carga polínica correspondente a *Raphanus* spp. que apresenta em termos gerais os valores mais elevados, com excepção ao cobre e ao níquel.

Segundo o Regulamento (CE) Nº. 1881/2006 e o Regulamento (CE) Nº. 629/2008 que fixam os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios os únicos metais analisados que estão presentes nesses regulamentos são o Cádmiu e o Chumbo. Sendo o limite máximo de Cádmiu 1,0 mg/kg e para o Chumbo de 3,0 mg/kg. Ao se analisar os valores obtidos das amostras para os valores presentes nos regulamentos dos dois minerais em estudo nota-se que a maior parte dos resultados são inferiores ou dentro do limite estipulado mais uma vez com a excepção da espécie vegetal *Bignonia* spp. que apresenta valores de 1613 µg/kg (1,613 mg/kg), ou seja, ultrapassa o valor estipulado em ambos os regulamentos, no caso do chumbo todas as amostras apresentam valores inferiores ao estipulado, no entanto mais uma vez é necessário ver a espécie *Bignonia* spp. que embora não ultrapasse o valor está mesmo no limite com 2688 µg/kg (2,688 mg/kg). Ainda que os regulamentos apresentem estes valores limites para estes dois minerais é necessário ter atenção ao facto de que estes valores se referirem a suplementos alimentares, não existindo qualquer referência ao pólen apícola ou pólen de origem vegetal. O que mais uma vez vem salientar a necessidade da criação de legislação específica para este produto.

Em relação aos outros minerais em estudo pode-se observar que quase todos e em todas as espécies incluindo no pólen apícola apresentam valores bastante elevados com a diferença do Crómio e Níquel.

Há contudo que referir que a existência de elevados conteúdos em metais presentes em determinadas espécies pode estar relacionado com uma necessidade absoluta da planta para poder resistir à poluição ambiental, como é o caso da existência de enzimas antioxidantes no nosso organismo que vão eliminar os radicais livres que se desenvolvem e são os causadores das diversas doenças numeradas neste trabalho caso não sejam eliminados rapidamente. Estas enzimas antioxidantes são, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), que necessita destes metais para a sua actividade. Temos por exemplo a SOD1 que é dependente do cobre e do zinco enquanto a SOD2 é dependente do manganês.

6. Considerações Finais

Foram analisadas 30 amostras de pólen, 16 colhidas directamente dos estames e 14 correspondentes a pólen apícola, tendo sido retiradas 3 amostras de pólen apícola que apresentavam uma grande variedade de cargas polínicas pertencentes certamente a muitas espécies, não sendo possível observar uma predominância de algum tipo de pólen. Foi ainda retirado das espécies vegetais o género *Crepis* spp. pois através da identificação microscópica ficou provado que o pólen desta espécie vegetal não correspondia ao género *Crepis* spp.

As primeiras amostras destinavam-se a constituir uma base de dados de identificação de pólen de origem apícola e pesquisar fontes interessantes de novas estruturas que possam vir a ser exploradas quanto à sua bioactividade e que não sejam tão frequentes na natureza. Dentre estas últimas identificaram-se com potencial de novos compostos, o pólen da *Acacia dealbata*, *Crepis* spp, *Tilia* spp. e *Viburnum tinus*.

Atendendo ao valor nutritivo do pólen e às suas potencialidades terapêuticas é muito importante que se realizem estudos no sentido de avaliar cada vez melhor os seus constituintes, atendendo a que lhe estão atribuídas diversas actividades biológicas prevenindo doenças como cancro, doenças cardiovasculares e diabetes.

Tendo em conta estas considerações é necessário mais pesquisas de forma a chegar a normas de padronização do produto, que deve ter um controlo rigoroso de qualidade para que possa ser aplicado a nível terapêutico. Em relação aos resultados obtidos neste estudo vieram confirmar que cada espécie vegetal possui o seu próprio perfil cromatográfico, tal como já tinha sido referido por outros autores. Embora espécies diferentes possam apresentar os mesmos compostos ou compostos semelhantes que apenas diferem ao nível da sua concentração. As estruturas de base mais comuns nas amostras analisadas são os derivados do canferol, quercetina e isorhamnetina que diferem na hidroxigenação do anel B e depois apresentam vários tipos de substituições em C3.

Foram encontrados alguns compostos cujos espectros de absorção ainda não foram identificados em amostras de pólen de *Acacia dealbata* e *Viburnum tinus* que poderão ser importantes em estudos futuros dado não serem muito comuns.

Verificou-se em relação aos minerais que havia certas espécies vegetais que apresentavam elevadas quantidades de minerais como é o caso da amostra de *Bignonia* spp. que ultrapassa os valores limites dos regulamentos (CE) N.º. 1881/2006 e (CE) N.º. 629/ 2008. Pode-se concluir que todas as espécies em estudo e as amostras de pólen apícola apresentam elevadas quantidades de minerais, contudo estes valores elevados podem estar relacionados com cada espécie, isto é, a planta pode ter elevados níveis de minerais porque necessita e não ser propriamente contaminação. Mas para comprovar este facto seria necessário fazer análises ao solo e à água das zonas onde se encontram as plantas aqui estudadas bem como do local do apiário.

Por fim parece importante voltar a salientar como é necessário a continuação de estudos ao pólen de modo a conhecer os compostos presentes nas diferentes espécies que podem ser importantes na aplicação de diversas áreas como a área alimentar e

farmacêutica. Existe ainda a importância de direcionar os estudos para o pólen apícola com o intuito de criar uma legislação para as boas práticas e os limites legais dos seus constituintes.

É importante terminar com a sugestão de como é necessário uma maior divulgação em Portugal deste produto de colmeia uma vez que ao longo da realização deste trabalho foi notória a falta de conhecimento do consumidor e do próprio produtor em relação a esta matéria-prima.

7. Referências Bibliográficas

Almaraz-Abarca, N., Campos, M. G., Avila-Reyes, A., Naranjo-Jimenez, N., Herrera-Corral, J., Gonzales-Valdez, L. S. (2004). Variability of antioxidante activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Intersciencia* 29(10): 574-578.

Almaraz-Abarca, N., Campos, M. G., Avila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J., Gonzalez-Valdeza, L. S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, *Leguminosae*). *Journal of Food Composition and Analysis* (20): 119-124.

Almeida-Murafian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 105 – 111.

Antunes, M. V., Lazzaretti, C., Gamaro, G. D., Linden, R. (2008). Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol.44. nº. 2.

Arenas, A., Farina, W. M. (2012). Learned olfactory cues affect pollen-foraging preferences in honeybees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour* 83: 1023 – 1033.

Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2010). In vitro antioxidante properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products* 32: 572-579.

Bogdanov, S. (2012). *Bee Product Science* (www.bee-hexagon.net) Acedido em 20/01/2014.

Bogdanov, S. (2011). *Bee Product Science* (www.bee-hexagon.net) Acedido em 5/02/2014.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56 (11): 317-333.

Cabrera, A., Mach, N. (2012). Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. 16(4): 143-153.

Campos, M. (1997). Caracterização do pólen Apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

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

Campos, M., Markham, K., Proença da Cunha, A. (1997). An Approach to the Characterization of Bee Pollens via Their Flavonoid/Phenolic Profiles. *Phytochemical Analysis*. 8 (4): 181 – 185.

Campos, M., Webby R. and Markham, K. (2002) The Unique Occurrence of the Flavone Aglycone Tricetin in Myrtaceae Pollen. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57.9 – (10): 944 – 946.

Campos, M. G., Webby, R. F., Markham, K. R., Mitchell, K. A., Cunha, A. P., (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): 742-745.

- Carpes, S. T., Begnini, R., De Alencar, S. M., Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciencia e Agrotecnologia* 31 (6): 1818-1825.
- Clarke, A., Gleeson, P., Harrison, S., Knox, R. B. (1979). Pollen-stigma interactions: Identification and characterization of surface components with recognition potential. *Cell Biology*, 76(7): 3358-3362.
- Cook, N. C., Samman, S. (1996). Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* (7): 66-76.
- Costa, R. M. (2011). Caracterização do perfil fenólico e da ultra estrutura do pólen de cultivares de *Olea europaea* L. como contributo para uma classificação varietal. Tese de mestrado. Departamento de Ciências da Vida, FCT/UC 80-83.
- Dafni, A., Hesse, M., Pacini, E. (2000). Pollen and Pollination, special edition of Plant Systematics and Evolution, Vol. 222, N^o. 1-4, Springer-Verlag Wien New York.
- Dobson, H. E. M., Peng, Ying-Shin. (1997). Digestion of Pollen Components by Larvae of the Flower-Specialist Bee *Chelostoma florissomne* (Hymenoptera: Megachilidae). *J. Insect Physiol.* Vol. 43, No. 1, pp. 89-100.
- Dórea, M. C., De Novais, J. S., Dos Santos, F. A. R. (2010). Botanical profile of bee pollen from the Southern coastal region of Bahia. Brazil *Acta bot. bras.* 24(3): 862-867.
- Franchi, G. G., Franchi, G., Corti, P., Pompella, A. (1997). Microspectroscopic evaluation of digestibility of pollen grains. *Plant Foods for Human Nutrition* 50 (2): 115-126.
- Francis, J. N., Till, S. J., Durham, S. R. (2003). Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Hari, K., Kesava, K., Ravikumar, A., Supriya, M., Ram, C., Stanley, A. (2004). Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diag Lab Immunol* (11): 63-69.
- Harmanescu, M., Bordean, D., Gergen, I. (2007). Heavy Metals Contents of Bee's pollen from different locations of Romania. *Lucrări Stiințifice Medicină Veterinară* vol. XL, Timisoara.
- Harmanescu, M., Popovici, D., Gergen, I. (2007). Mineral Micronutrients Composition of Bee's Pollen. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, Volume XIII*, No.1 175-182.
- Hesse, M., Halbritter, H., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., Ulrich, S. (2009). Pollen Terminology, An illustrated handbook. Springer Wiew, New York, 266 p.
- Human, H., Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67: 1486 – 1492.
- Human, H., Nicolson, S. W., Strauss, K., Pirk, C. W. W., Dietemann, V. (2007). Influence of pollen quality on ovarian development in honeybee workers (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology* 53: 649 – 655.
- Kačaniova, M., Rovná, K., Arpášová, H., Hleba, L., Petrová, J., Haščík, P., Čuboň, J., Pavelková, A., Chlebo, R., Bobková, A., Stričík, M. (2013). The effects of bee pollen extracts on the broiler chicken's gastrointestinal microflora. *Veterinary Science* 95: 34 – 37.
- Kessler, R., Harley, M. (2009). Pollen. The Hidden Sexuality of Flowers. Kew Plants People Possibilities. PAPADAKIS.
- Khan, N., Afaq, F., Mikhtar, H. (2006). Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis*. (28): 233-239.

- Kroyer, G., Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 171 – 174.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepack-Baniak, J., Czekonska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*. 100: 237-240.
- Linskens, H. F., Jorde, W. (1997). Pollen as food and medicines A review. *Econ. Bot.* (51): 77-78.
- Lopes, J., Stanciu, O. G., Campos, M. G., Almaraz-Abarca, N., Almeida-Muradian, L. B., Marghitas, L. A. (2011). Bee Pollen Antioxidant Activity – A Review: Achievements and Further Challenges. *Journal of Pharmacognosy*. Vol. 2, Issue 2, pp. 25-38.
- Mărghitaş, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Popescu, O., Bogdanov, S., Campos, M. G. (2009). *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry* 115: 878 – 883.
- Martins, M. C. T., Morgano, M. A., Vicente, E., Baggio, S. R., Rodriguez-Amaya, D. B. (2011). Physicochemical Composition of Bee Pollen from eleven Brazilian States. *Journal of Apicultural Science* Vol. 55 No. 2.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Myoda, T., Nagashima, T. (2005). Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen *Cistus ladaniferus*. *International Journal of Molecular Medicine*. 15: 259-263.
- Paola-Naranjo, R. D. D., Sánchez-Sánchez, J., González-Paramás, A.M., Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. *Journal of Chromatography A*, 1054: 205 – 210.
- Paramás, A. M. G., Bárez, J. A. G., Marcos, C. C., García-Villanova, R. J., Sánchez, J. S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry* 95: 148 –156.
- Paulo, L., Antunes, P., Campos, M. G., 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.
- Pham-Huy, L., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biomedical science*. (4): 89-96.
- 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 fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.
- RIMPLER, M. (2003). Von Bienen gesammelte Blütenpollen: Eigenschaften und Verwendung. *Ärztzeitschrift für Naturheilverfahren* 44 (3): 158-165.
- Roulston, T. H., Cane, J. H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222 (1-4): 187-209.
- Šarić, A., Balog, T., Sobočanec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D., Marotti, T. (2009). Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology* 47: 547 – 554.
- Shoskes, D. A. (2002). Phytotherapy in chronic prostatitis. *Urology*. 60 (6): 35-37.

Silva, T. M. S., Camara, C. A., Lins, A. C. S., Barbosa-Filho, J. M., Silva, E. M. S., Freitas, B. M., Santos, F. A. R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 507 – 511.

Stanciu, O. G., Mărghitas, L. A., Dezmirean, D. S., Campos, M. G. (2010). Macro- and oligo-mineral elements from honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Transylvania (Romania) *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnology*, 66 1-2.


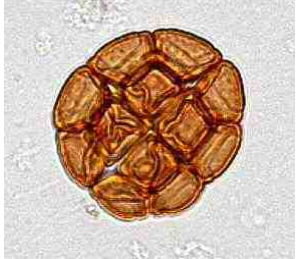

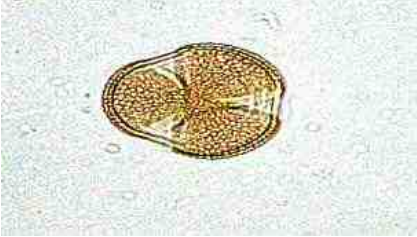



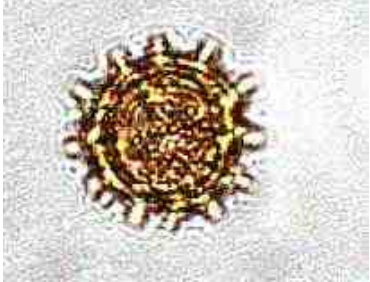
Szefer, P., Nriagu, J. O. (2007). *Mineral Componentes in Foods. Properties of Food Componentes Series* CRC Press Taylor & Francis Group, p. 232-233.






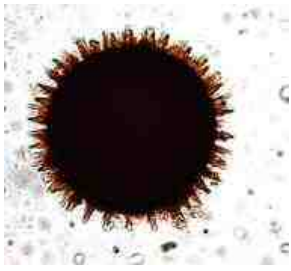



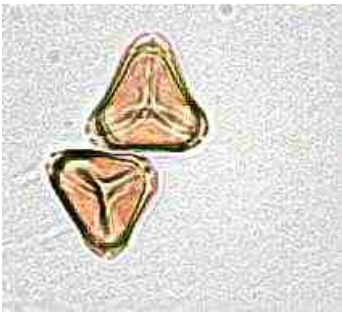
Terradillos, L. A., Muniategui, S., Sancho, M. T., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. (1994). An alternative method for analysis of honey sediment. *BeeScience* Vol. 3 No. 2 Page 86.









Wodehouse, R. T. (1928). The Phylogenetic Value of Pollen-grain Characters. *Annals of Botany* 42 (4): 891-934.

Anexo

Tabela - Imagem microscópica das espécies vegetais em estudo.

Nome Científico	Imagem	Imagem ao microscópio
<i>Acacia dealbata</i>		
<i>Bignonia spp.</i>		
<i>Carpobrotus edulis</i>		
<i>Coleostephus myconis</i>		

<p><i>Digitalis purpurea</i></p>		
<p><i>Galactites tomentosus</i></p>		
<p><i>Lavatera spp.</i></p>		
<p><i>Ligustrum spp.</i></p>		
<p><i>Melaleuca spp.</i></p>		

<p><i>Olea europaea</i> L.</p>		
<p><i>Opuntia</i> spp.</p>		
<p><i>Papaver rhoeas</i></p>		
<p><i>Silybum marianum</i></p>		
<p><i>Tilia</i> spp.</p>	