



Estudo da atividade antioxidante de pólen apícola

João Filipe Barata Fernandes

Orientadores

Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Doutora Anna Gramza-Michałowska

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professor Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Professor Doutora Anna Gramza-Michałowska de Poznań University of Life Sciences.

Abril, 2015

Dedicatória

À minha mulher, pelo constante apoio, companhia, ajuda, paciência e incentivo ao longo deste percurso acadêmico.

Agradecimentos

À Professora Doutora Ofélia Anjos, pela grande ajuda ao longo do trabalho, laboratorial e escrito, pelo apoio no tratamento dos dados experimentais, pela permanente disponibilidade, paciência, incentivo e amizade demonstrada.

À Professora Doutora Anna Gramza-Michałowska pela simpatia, disponibilidade e apoio profissional durante a realização do estágio académico em Programa Erasmus na *Poznań University of Life Sciences* na Polónia.

À Professora Doutora Cristina Pintado e ao Professor Doutor João Pedro Luz pela disponibilidade, simpatia, ajuda e conhecimentos transmitidos.

À funcionária do Laboratório de Biologia, Graça, pela disponibilidade e simpatia demonstrada.

A todos os docentes da Escola Superior Agrária de Castelo Branco que de uma forma ou de outra, pelos seus ensinamentos, contribuíram para o meu progresso académico.

Ao Professor Doutor Zbigniew Krejpcio e ao Professor Doutor Dominik Kmiecik pela simpatia, disponibilidade e acolhimento no âmbito do Programa Erasmus.

Agradecimento particular à mestre Joanna Skrety pelo ensinamento dos métodos laboratoriais e do tratamento estatístico.

À funcionária Aneta Dach do gabinete de Erasmus da *Poznań University of Life Sciences* na Polónia pela simpatia, ajuda e disponibilidade.

Ao Gabinete de Relações Internacionais do Instituto Politécnico de Castelo Branco no âmbito do Programa Erasmus.

Ao *International Relation Office* da *Poznań University of Life Sciences* na Polónia.

Deixo aqui o agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, o meu sincero, muito obrigado.

Estudo da atividade antioxidante de pólen apícola

João Filipe Barata Fernandes

Resumo

O pólen apícola é um alimento natural com uma vasta gama de propriedades nutricionais e terapêuticas, alvo de vários estudos. O pólen apícola é rico em antioxidantes, substâncias capazes de anular os radicais livres. São numerosas as investigações desenvolvidas para averiguar a relação entre a atividade de radicais livres e o aparecimento de algumas doenças, tais como: o cancro, aterosclerose, distúrbios gastrointestinais, isquemia cerebral e cardíaca, doença de Parkinson e envelhecimento. Mesmo se as propriedades antioxidantes de certos compostos não possam ser aplicadas diretamente para tratar estas doenças, a possibilidade de estudar esses compostos pode ser um início importante para o desenvolvimento de novos fármacos.

As amostras de pólen apícola foram obtidas a partir de apicultores de Castelo Branco em Portugal e separadas por cores, após o processo de secagem. As diferentes origens botânicas das amostras foram realizadas utilizando um microscópio de acordo com o método de acetólise.

Cada amostra de pólen de abelha ($0,10 \pm 0,01$ g) foi extraído individualmente com metanol, etanol e água, para avaliar a solução do extrato mais eficiente. Todas as experiências foram analisadas em quadruplicado.

Neste trabalho, o teor em compostos fenólicos totais de pólen apícola foi analisada por espectrometria a 725 nm usando o reagente Folin-Ciocalteu bem como as propriedades antioxidantes por (ABTS) 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico) e (DPPH) 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

As conclusões para a atividade antioxidante total, com os métodos DPPH e ABTS, revelaram que, no geral, os extratos etanólicos de pólen apícola mostram uma maior atividade de eliminação de radicais livres para todas as amostras. A grande variabilidade está relacionada com a atividade antioxidante e o teor em compostos fenólicos totais de pólen apícola. Diferentes espécies botânicas apresentam uma atividade antioxidante específica da espécie ou da mistura de espécies que a constituem, mas também são dependentes do método analítico e do solvente de extração.

Palavras chave

Pólen apícola, ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu, antioxidante.

Study of antioxidant activity of bee pollen pellets

João Filipe Barata Fernandes

Abstract

Bee pollen is a health food with a wide range of nutritional and therapeutic properties.

Much research was developed to identify the relationship of active oxygen free radicals associated to various diseases such as: cancer, atherosclerosis, gastrointestinal disturbances, cerebral and cardiac ischemia, Parkinson's and ageing. Even if antioxidant properties of certain compounds cannot be used for direct application on these situations the possibility to explore good resources of them is an important start to develop new drugs.

Bee pollen samples were obtained from local beekeepers from Castelo Branco in Portugal and separated by colour, after the dried process. The different floral origin of samples was performed using a light microscope according to the acetolysis method.

Each sample of bee pollen (0.10 ± 0.01 g) was individually extracted according with methanol, ethanol and water to evaluate the more efficient extract solution. All experiments were analysed in quadruplicate.

In this work the total polyphenols content of bee pollen was analysed by spectrometry at 725 nm using the Folin-Ciocalteu reagent with ferulic acid as standard as well the antioxidant properties by 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay and Trolox equivalent antioxidant Capacity procedure (ABTS).

The findings for total antioxidant activity with DPPH and ABTS methods, revealed that the ethanol extracts of pollen show a higher scavenging activity of free radicals for all samples. The great variability is related to the antioxidant activity and the content of phenolic compounds of pollen. Different botanical species have a specific antioxidant activity of the species or mixture of species, but are also dependent on the analytical method and the extraction solvent.

Keywords

Bee pollen, ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu, antioxidant.

Índice geral

Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de Figuras.....	XIII
Índice de Tabelas	XV
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	XVII
1. Introdução	1
2. Pólen Apícola	3
2.1 Importância e definição.....	3
2.2 Recolha e armazenamento	3
2.3 Composição química	6
2.4 Benefícios para a saúde humana	8
3. Material e Métodos	10
3.1 Amostras	10
3.2 Reagentes	10
3.3 Análise polínica (Acetólise).....	11
3.4 Avaliação das propriedades antioxidantes do pólen apícola.....	12
3.4.1 Extração dos compostos antioxidantes	12
3.4.2 Método do DPPH	13
3.4.3 Método do ABTS	15
3.4.4 Método do Folin-Ciocalteu	16
3.4.5 Tratamento de dados	18
4. Resultados e Discussão	18
4.1 Resultados da análise polínica	18
4.2 Resultados do método do DPPH	21
4.3 Resultados do método do ABTS	23
4.4 Resultados do método do Folin-Ciocalteu	25
4.5 Comparação dos resultados obtidos com os vários métodos analíticos	26
5. Considerações finais	30
6. Referências bibliográficas	31

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo das principais etapas do processamento do pólen apícola.	5
Figura 2 - Estruturas químicas das principais classes dos flavonoides.	7
Figura 3 - Amostras de pólen apícola analisadas no estudo.	10
Figura 4 - Esquema representativo do procedimento realizado para a análise polínica.	11
Figura 5 - Amostras de pólen depois de esmagadas e homogeneizadas com vortex.	12
Figura 6 - Centrifugadora <i>Thermo Scientific Heraeus Megafuge 40 R</i>	12
Figura 7 - Sobrenadantes utilizados para análise bioquímica.	13
Figura 8 - Reta de calibração obtida pela percentagem de inibição de DPPH em função da concentração de Trolox.	14
Figura 9 - Espectrofotómetro SP 830 <i>Plus Metertech</i>	15
Figura 10 - Reta de calibração obtida pela percentagem de inibição de ABTS em função da concentração de Trolox.	16
Figura 11 - Reta de calibração obtida pela percentagem de inibição Folin-ciocalteu em função da concentração de ácido ferúlico.	17
Figura 12 - Percentagem de inibição de DPPH obtida nas diferentes amostras.	22
Figura 13 - Percentagem de inibição de ABTS obtida nas diferentes amostras.	24
Figura 14 - Teor de compostos fenólicos totais, mg FAE/g de pólen obtido nas diferentes amostras.	26
Figura 15 - Projeção dos valores obtidos para os três métodos e as diferentes soluções extrativas no sistema de eixos correspondentes ao facto 1 e facto 2, resultantes da análise de componentes principais.	28

Índice de Tabelas

Tabela 1- Composição detalhada de pólen apícola (seco).	6
Tabela 2 – Resultados da análise polínica das amostras que continham apenas uma espécie.	19
Tabela 3 – Resultados da análise polínica das amostras que continham mais do que uma espécie.	20
Tabela 4 – Percentagem de inibição de DPPH obtida nas diferentes amostras.	21
Tabela 5 – Percentagem de inibição de ABTS obtida nas diferentes amostras.	23
Tabela 6 – Teor de compostos fenólicos totais em mgFAE/g de pólen apícola obtido nas diferentes amostras.	25
Tabela 7- Matriz de correlação, entre a atividade antioxidante das amostras e o teor em compostos fenólicos totais extraídos utilizando como solvente água ou etanol ou metanol com os métodos DPPH, ABTS e Folin- Ciocalteu	27
Tabela 8 – Resumo da análise de variância relativa ao valor da atividade antioxidante das diferentes amostras de pólen apícola (método, solvente e amostra).	29
Tabela 9 – Resumo da análise de variância relativa ao valor da atividade antioxidante das diferentes amostras de pólen apícola (solvente e amostra).	29

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

FAE Equivalente em ácido ferúlico por grama de extrato de pólen

DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ABTS 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

IHC Comissão Internacional do mel

1. Introdução

A consciência que a ingestão de determinados alimentos pode ser prejudicial ou benéfica para a saúde humana levou ao desenvolvimento de estudos relacionados com os nutrientes para saber quais os mais favoráveis. Sabemos que substâncias reativas ao oxigénio estão implicadas em várias doenças humanas como a aterosclerose, trombozes e diabetes retinopatia. A descoberta da relação entre a existência de substâncias antioxidantes e a génese dessas espécies reativas via radicais livres em muitos materiais celulares como o DNA, lípidos e proteínas (Pérez-Pérez *et al.*, 2012), lançou a procura de substâncias antioxidantes para a atualidade.

Os radicais livres são umas das razões do envelhecimento das células do corpo humano e da deterioração dos alimentos (Prior, 2003; Michałowska e Matyasik, 2011) e para os inibir ou abrandar o uso de antioxidantes é uma das vias para o conseguir.

Uma consideração importante a ter em conta pela indústria agroalimentar é utilizar os alimentos naturalmente ricos em antioxidantes em vez da introdução de antioxidantes sintéticos na alimentação. Assim, além de conseguir uma maior estabilidade do alimento evitam-se problemas de toxicidade (Michałowska e Matyasik, 2011).

O uso de plantas que possuem polifenóis oferece possibilidades promissoras nesse campo oferecendo proteção para a saúde humana e estabilidade dos alimentos (Chen *et al.*, 2005; Michałowska e Matyasik, 2011).

O pólen de abelha é uma mistura de um pólen recolhido nos estames das flores (as células reprodutivas masculinas de flores, contendo concentrações de fitoquímicos e nutrientes e rica em metabolitos secundários), de néctar produzido pelas plantas com flor e também secreções enzimáticas das abelhas (Pérez-Pérez *et al.*, 2012).

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 flavonoides, carotenoides, terpenos, entre outros. O pólen é ainda um produto rico em vitaminas do grupo B, como a tiamina (B1), riboflavina (B2), nicotinamida (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6) e biotina (B8). O pólen é ainda rico em diferentes minerais de interesse para a saúde.

Na antiguidade o uso de pólen apícola e outros produtos das abelhas deveu-se às suas propriedades medicinais fazendo hoje parte de vários suplementos alimentares (Pérez-Pérez *et al.*, 2012).

Vários estudos demonstraram o seu poder antioxidante e capacidade de eliminação de radicais livres (Pérez-Pérez *et al.*, 2012). A atividade antioxidante dos polifenóis é principalmente devida às suas propriedades redox que podem desempenhar um papel importante na neutralização de radicais livres e supressores de oxigénio (Nijveldt *et al.*, 2001; Marghitas *et al.*, 2009).

Este trabalho tem como objetivos avaliar a atividade antioxidante de pólen apícola por dois métodos diferentes (ABTS, DPPH) e o teor em compostos fólicos totais com o método de Folin-Ciocalteu com três soluções de extração diferentes (água, metanol e etanol).

2. Pólen Apícola

2.1 Importância e definição

O pólen apícola é um pó fino produzido por flores misturado com néctar e secreções das abelhas. Os pólenes são as células reprodutivas masculinas das flores sendo a principal fonte de alimento das abelhas, contendo concentrações de fitoquímicos e nutrientes e muitos metabolitos secundários (LeBlanc *et al.*, 2009). Formado por minúsculos grãos é recolhido pelas abelhas e é levado para o interior da colmeia, sendo utilizado na preparação do alimento das larvas jovens, devido ao seu alto valor nutritivo, riqueza em proteínas naturais, a que se acresce sais minerais como o potássio, o fósforo, o enxofre, o cobre, o ferro, o cloro, o magnésio, o silício e quantidades variáveis de elementos dos complexos vitamínico B, C, D e E (FNAP, 2010).

A cor do grão de pólen é determinada pela presença de pigmentos, nomeadamente flavonoides ou carotenoides (Montenegro *et al.*, 1997). O pólen das flores fica agarrado aos pelos do corpo das abelhas quando contactam com os estames, ficando aglutinado sendo transportado para a colmeia, onde é colocado nos alvéolos dos favos de mel (LeBlanc *et al.*, 2009).

2.2 Recolha e armazenamento

A produção de pólen por parte dos apicultores necessita de conhecimentos específicos, mas a sua produção em termos comerciais apenas terá sucesso em zonas onde exista muita disponibilidade deste recurso. Ao contrário do mel, o pólen não é armazenado na colmeia em quantidades muito superiores às necessidades da colónia. O pólen pode ser “colhido” da colmeia, através da colocação na entrada de voo de capta-pólenes ou caça-pólenes. As abelhas ao entrar na colmeia têm que passar por uma rede, cuja malha tem uma dimensão tal que muitas das cargas polínicas transportadas nas patas das obreiras em pastoreio de pólen cairão para um recipiente. Este recipiente encontra-se separado do resto do equipamento por uma rede de malha fina, que impede as abelhas de recolher o pólen caído no seu interior. O fundo deste equipamento deve ser de um qualquer material que deixe escapar a humidade e facilite a circulação de ar, pois só dessa forma se evitará a deterioração do pólen. Os apicultores deverão recolher o pólen regularmente. Os capta pólenes só devem ser colocados quando as condições climáticas são favoráveis, para não dificultarem a recolha do pólen e para não contribuírem para a sua degradação (FNAP, 2010).

Após a retirada do pólen das gavetas dos capta-pólenes deve proceder-se à limpeza das mesmas. O transporte até a sala de processamento deve ser realizado em baldes de plástico alimentar com tampa, e cuja capacidade não deve ser superior a 2,5kg de pólen. Na sala de processamento podem retirar-se as impurezas mais grosseiras (pré-limpeza) como abelhas ou formigas, por exemplo. De seguida

procede-se ao congelamento. Para tal, o pólen pode ser colocado em bandejas, com capacidade máxima de 2,5 kg durante 1 a 2 horas, após as quais deve ser mexido ou agitado, de forma a facilitar o congelamento e evitar a agregação das cargas polínicas (FNAP, 2010).

Após a congelação, o pólen deve descongelado à temperatura ambiente durante 3 a 4 horas, período após o qual deve ser introduzido no secador, onde permanecerá por um período de 12 a 48 horas. Este equipamento não deverá ultrapassar os 40°C e possuir sistema de ar forçado. A desidratação do pólen é um método que visa aumentar o tempo de vida de prateleira e manter as suas propriedades (Barreto *et al.*, 2006). Este processo faz com que o pólen perca cerca de 14-18% do seu peso (Serra e Escolá, 1997) e permite aumentar o tempo de vida de prateleira do pólen pois este produto apresenta na sua composição um elevado teor de humidade e proteínas, pelo que a desidratação, é essencial, para evitar a deterioração do produto (Arruda, 2013). Fatores como a humidade e o processo de descongelação devem também ser controlados, pois estão diretamente relacionados com o metabolismo do pólen, podendo ocorrer contaminações por microrganismos e a reativação dos processos metabólicos pós-conservação (Cuchiara *et al.*, 2012).

Depois de seco, procede-se à limpeza final, podendo usar-se para tal peneiras ou ventilação forçada. Depois de limpo e selecionado o pólen pode ser embalado em sacos plástico, hermeticamente fechados, de capacidade variável, ou em embalagens de vidro de vários tamanhos (FNAP, 2010).

Este produto como é rico em proteínas, se não for armazenado de forma correta, pode perder valor nutricional rapidamente, sofrendo reações de Maillard, por isso torna-se importante controlar e supervisionar todas as etapas de processamento e conservação para não perder nutrientes e propriedades organoléticas (Torres *et al.*, 2003).

A Figura 1 representa as principais etapas do processamento do pólen apícola.

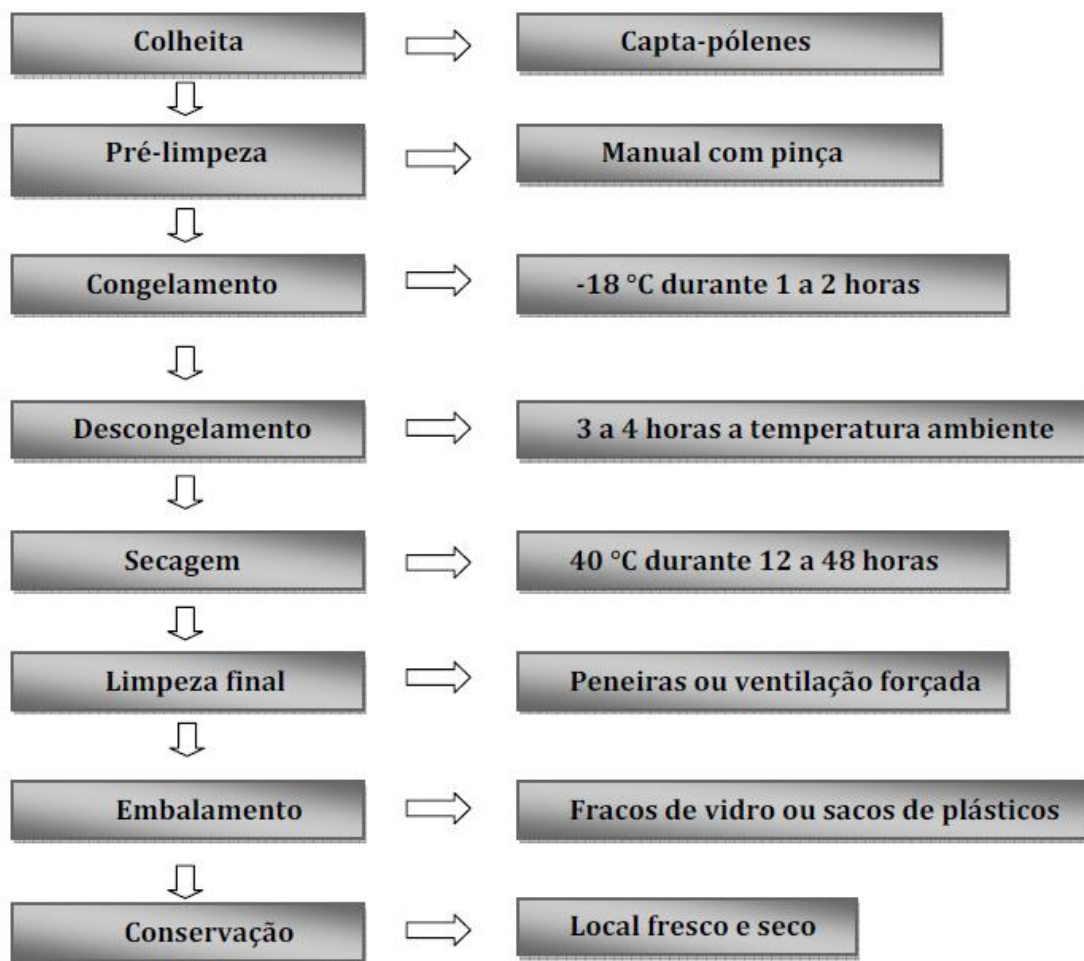


Figura 1 - Esquema representativo das principais etapas do processamento do pólen apícola. Adaptado de (Adaptado de FNAP, 2010).

2.3 Composição química

Na Tabela 1 está resumida a composição detalhada de pólen apícola (seco) de acordo com informação recolhida por Campos *et al.* (2008).

Tabela 1- Composição detalhada de pólen apícola (seco). Adaptado de artigo de revisão de (Campos *et al.*, 2008).

Componentes principais (Mín.-Máx. g/100 g de peso seco)		Minerais (mg/Kg)		Vitaminas (mg/Kg)	
Proteínas	10 – 40	Potássio	4000-20000	β-caroteno	10-200
Lípidos	1 – 13	Magnésio	200-3000	B1,tiamina	6-13
Hidratos de carbono totais	13 – 55	Cálcio	200-3000	B2, riboflavina	6-20
Fibras e pectina	0,3 – 20	Fósforo	800-6000	B3, niacina	40-110
Cinza	2 – 6	Ferro	11-170	B4, piridoxina	2-7
Outros componentes	2 – 5	Zinco	30-250	B5, Ácido Pantoténico	5-20
		Cobre	2-16	C, Ácido ascórbico	70-560
		Manganês	20-110	H, biotina	0,5-0,7
				Ácido Fólico	3-10
				E, Tocoferóis	40-320

Relativamente ao conteúdo de água, alguns países tem requisitos mínimos estabelecidos para o pólen seco. Assim, no Brasil: máx. 4 g/100 g; Suíça, Polónia: max. 6 g/100 g; Uruguai: máx. 8 g/100 g; Bulgária: max. 10 g/100 g. Portugal ainda carece de legislação a esse respeito.

Segundo Moreti (2004) o pólen ainda pode ser caracterizado quanto à presença de resinas, corantes, enzimas e coenzimas (Lengler, 2002 e Donadieu, 1983) mas também quantidades significativas de substâncias polifenólicas principalmente flavonoides. Fica claro, que de acordo com a sua composição o pólen apícola tem muitas potencialidades de bioatividade (Lopes *et al.*, 2010).

Os polifenóis são compostos hidroxilados aromáticos, encontrados em vegetais, frutas e muitas fontes de alimentos como o mel e o pólen apícola, designados como potentes substâncias bioativas e terapeuticamente úteis. Derivados fenólicos representam o maior grupo conhecido como produtos vegetais secundários sintetizados por plantas superiores, provavelmente como resultado de estratégias adaptativas na evolução dos organismos ancestrais a partir de cianobactérias (Apak

et al., 2007). Muitos destes compostos fenólicos são essenciais à vida das plantas, por exemplo, para proteção contra ataques microbianos (Bennick, 2002).

Os flavonoides são os principais compostos secundários do pólen apícola. Eles são responsáveis pela cor do pólen podem ser incolor, amarelo, vermelho e roxo (Stanley e Linskens, 1974). Os flavonoides também são responsáveis pelo sabor amargo de pólen (Bogdanov, 2011). A maioria dos flavonoides são glicósidos, chamados agliconas, ou seja, derivados de açúcar. A sua quantidade varia entre 1,293 e 8,243 mg/100 g de pólen apícola (Campos *et al.*, 2003). Diversos investigadores (Leja *et al.*, 2007; Carpes, 2008; Menezes, 2009) constataram diferenças significativas entre os flavonoides presentes no pólen apícola de diferentes regiões, tendo atribuído estas variações à origem botânica e geográfica das amostras. A rutina ou vitamina P parece ser o flavonoide principal (Marghitas *et al.*, 2009). A eficiência dos compostos polifenólicos como antioxidantes depende, em grande parte, de sua estrutura química, orientação relativa e do número de grupos hidroxilo ligados ao anel aromático (Rice-Evans *et al.*, 1996), como se pode observar na Figura 2.

Existem vários tipos de flavonoides tais como antocianinas, flavonols, flavonas, chalconas, catequinas e flavononas (Carpes, 2008).

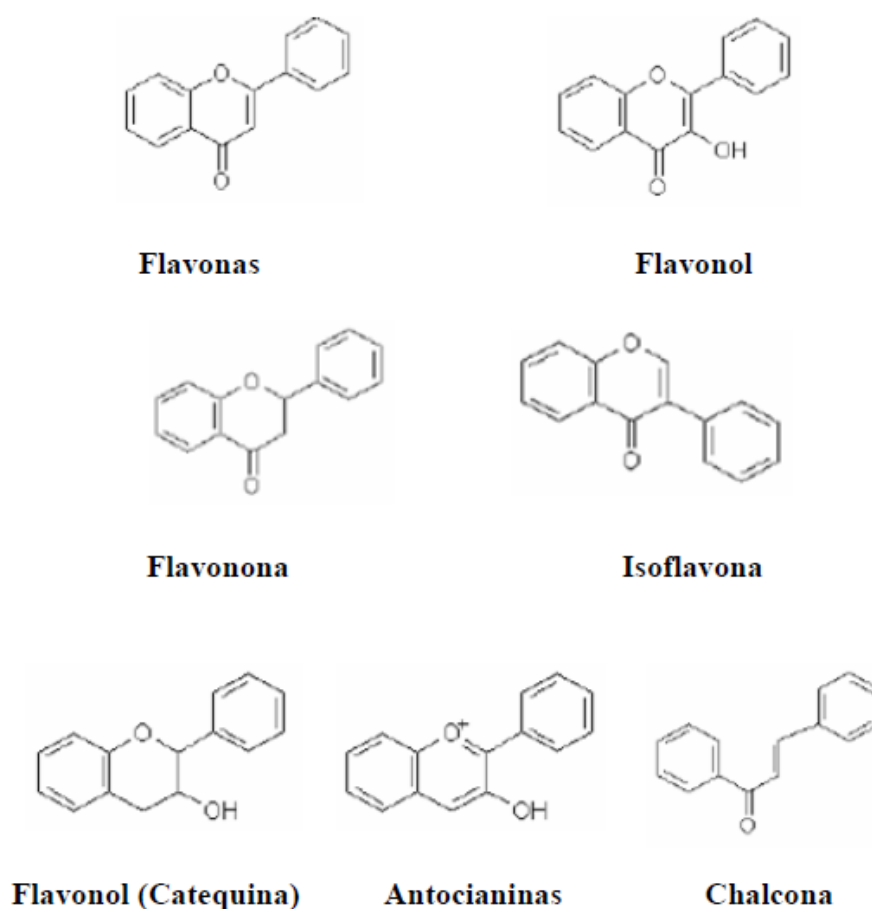


Figura 2 - Estruturas químicas das principais classes dos flavonoides (Carpes, 2008).

Atualmente ainda não existe uma 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).

2.4 Benefício para a saúde humana

O mel, o pólen e o própolis foram usados durante séculos na medicina tradicional devido às suas propriedades nutricionais e fisiológicas, sobretudo no que diz respeito ao equilíbrio entre os seus constituintes e ao seu efeito sobre o organismo humano. A ação biológica e os efeitos terapêuticos do pólen apícola estão relacionados com a presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (Kroyer e Hegedus, 2001). Os compostos fenólicos, são considerados benéficos para a saúde humana, porque diminuem o risco de doenças degenerativas, reduzindo o stress oxidativo e a inibição da oxidação de macromoléculas (Pereira *et al.*, 2007).

Atualmente, o pólen é cada vez mais usado como suplemento alimentar ou como um tónico, principalmente para os idosos, com o objetivo de minimizar os efeitos do envelhecimento (Graikou *et al.*, 2011 e Campos, 1997). Tem havido uma tendência crescente para estudar o pólen apícola como suplemento de origem natural à dieta alimentar, devido à sua alta qualidade nutricional, tornando-se cada vez mais num produto de grande interesse comercial (Paola-Naranjo *et al.*, 2004).

O pólen apícola é rico em antioxidantes, moléculas capazes de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas e por isso para evitar alterações resultantes do stress oxidativo que contribui para o desenvolvimento de doenças degenerativas, como o cancro, doenças autoimunes, o envelhecimento, cataratas, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e neuro-degenerativas (Pham-huy *et al.*, 2008).

Outro grupo de compostos do pólen apícola são os fitoesteróis que evidenciam um efeito redutor de colesterol no sangue através da inibição parcial da absorção intestinal de colesterol e também efeitos antiaterogénicos, bem como, estimulante imunológico e atividade anti-inflamatória (Morais *et al.*, 2011).

O pólen apícola é um produto que pode trazer vários benefícios à saúde devido aos seus principais compostos biologicamente ativos, que incluem, também os derivados fenólicos, tais como os flavonoides (Freire *et al.*, 2012). Os polifenóis, principalmente flavonoides, 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 (Kroyer e Hegedus, 2001). Os polifenóis são compostos usados para atrasar a acumulação de radicais livres e reforçar a estabilidade oxidativa de alimentos e do corpo humano (Jeszka *et al.*,

2010). A atividade antioxidante dos polifenóis é devida às suas propriedades redox, que desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres, atuando no oxigênio livre ou decompondo hidroperóxidos (Rice-Evans *et al.*, 1996). 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). Em termos de proteção dos sistemas biológicos, os principais compostos com propriedades terapêuticas encontrados no pólen apícola são os compostos fenólicos (Menezes, 2009). Quantidades consideráveis de compostos fenólicos, principalmente de flavonoides, podem atuar como antioxidantes muito eficazes (Leja *et al.*, 2007; Marghitas *et al.*, 2009). A atividade antioxidante do pólen apícola depende da origem botânica e geográfica, bem como do teor em flavonoides (Campos *et al.*, 2003).

Os flavonoides, 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). Atividade antioxidante e eliminação de radicais livres são associados a alguns fenóis e os seus potenciais efeitos na saúde humana (Bravo *et al.*, 1998).

Os recentes trabalhos de pesquisa e investigação estão direcionados na vertente do estudo dos antioxidantes na proteção do organismo contra efeitos dos radicais livres que estão associados ao processo de envelhecimento do corpo humano (Michałowska e Matyasik, 2011). A única maneira de retardar ou evitar esses efeitos é a utilização dos antioxidantes, como os polifenóis (Prior, 2003). Hoje em dia, antioxidantes com origem natural são considerados multifuncional e alternativas interessantes para antioxidantes sintéticos, e que pode ser utilizado para prevenir doenças e a oxidação dos sistemas alimentares complexos (Wang *et al.*, 2008).

Alguns autores indicam que o pólen apícola completa as necessidades mínimas do organismo humano em aminoácidos essenciais, através de uma dose média/diária de 15 g (Campos, 1997), tais como a lisina, o triptofano, a histidina, a leucina, a isoleucina, a metionina, a fenilalanina, mas também por aminoácidos promotores de crescimento, como a arginina, a cistina e a tirosina. A lisina contribui para a fixação do cálcio, estimula o apetite, facilita a digestão e favorece a renovação dos glóbulos vermelhos; o triptofano permite a assimilação da vitamina B3, cuja carência provoca a pelagra; a arginina combate a impotência; a histidina favorece a formação da hemoglobina; a cistina contribui para a melhoria da elasticidade da pele; a tirosina protege a pele contra a radiação solar; a leucina facilita o bom funcionamento do pâncreas; a metionina favorece o fígado e o aparelho digestivo em geral; outros constituintes conhecidos do pólen: as vitaminas do grupo B, C, D, E, e a provitamina A; a maior parte dos sais minerais: cálcio, potássio, magnésio, fósforo e numerosos

oligoelementos; algumas enzimas que favorecem o metabolismo de funções orgânicas importantes (FNAP, 2010).

Atualmente 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 (Estevinho *et al.*, 2012).

3. Material e Métodos

3.1 Amostras

As amostras de pólen de abelha foram recolhidas em 2013, na central meleira de Castelo Branco que processa pólen recolhido de diferentes apicultores da região de Castelo Branco (Portugal). As amostras foram secas a uma temperatura entre 38 - 40° C durante aproximadamente 16 horas.

A Figura 3 representa as amostras de pólen apícola separadas visualmente por classes de cor: pólen castanho (C1), pólen negro (C2), pólen roxo (C3), pólen verde escuro (C4), pólen verde claro (C5) pólen verde amarelado (C6), pólen amarelo (C7), pólen laranja (C8) e pólen amarelo escuro (C9).

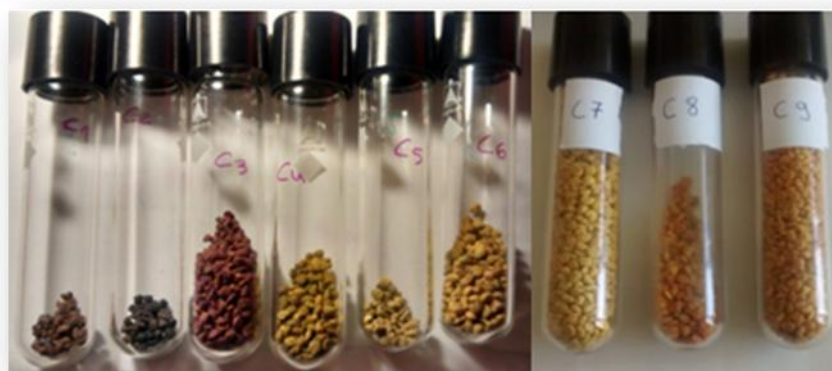


Figura 3- Amostras de pólen apícola analisadas no estudo.

3.2 Reagentes

Metanol, (ABTS) 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), persulfato de sódio, e (Trolox) 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, etanol, Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, ácido ferúlico, glicerina, (DPPH) 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

3.3 Análise polínica (Acetólise)

Para caracterização dos grãos de pólen, utilizou-se o método da acetólise, onde os grãos de pólen foram submetidos a uma hidrólise ácida, com anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 9:1, de modo a eliminar o conteúdo celular dos grãos de pólen para observação da parede externa (exina). Com os grãos de pólen foram posteriormente elaboradas lâminas com gelatina glicerinada e identificada a espécie botânica por observação microscópica e comparação com banco polínico existente e alguns atas disponíveis.

A análise polínica do pólen foi realizada de acordo com o método descrito por Almeida-Muradian *et al.* (2005). Para a identificação dos grãos de pólen utilizou-se o microscópio modelo Leica e uma base de dados da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Na Figura 4 está representado um esquema das várias etapas de identificação dos grãos de pólen apícola.

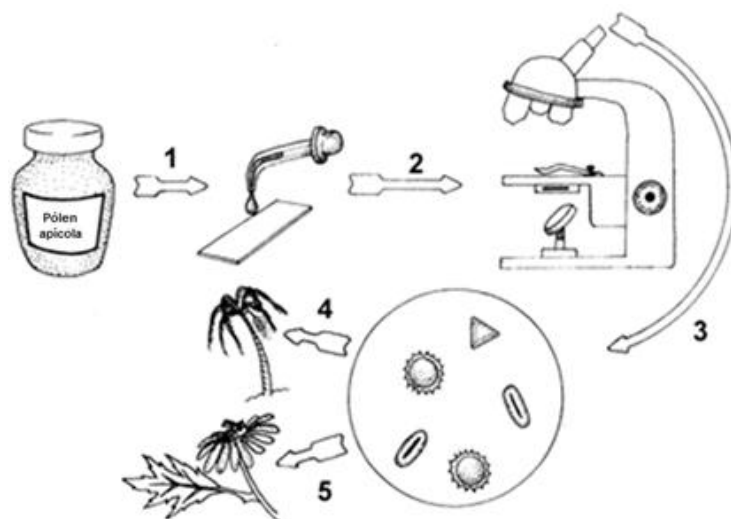


Figura 4 - Esquema representativo do procedimento realizado para a análise polínica. 1) acetólise; (2) e (3) observação dos grãos de pólen apícola ao microscópio óptico; 4) e 5) identificação da espécie vegetal a que pertence o grão de pólen, através de comparação com a base de dados. Adaptado de Salgado-Labouriau,(1973).

3.4 Avaliação das propriedades antioxidantes do pólen apícola

3.4.1 Extração dos compostos antioxidantes

Os extratos de pólen apícola foram obtidos de acordo com o método descrito por Pérez-Pérez *et al.* (2012).

Para a preparação das amostras de pólen (Figura 5), usou-se $0,10 \pm 0,01$ g de cada fração de pólen (moída em almofariz) em 5 mL de água ultrapura, 5 mL de metanol 99,9% (v/v) e 5 mL de etanol 95% (v/v), que foram homogeneizadas com auxílio do vortex.

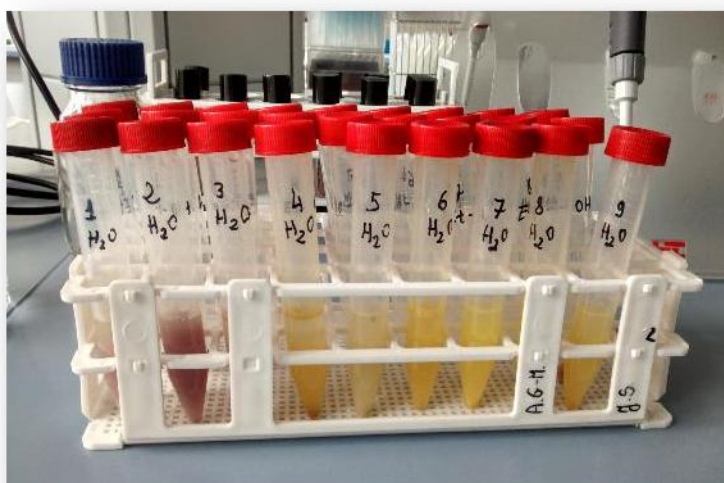


Figura 5- Amostras de pólen depois de esmagadas e homogeneizadas com vortex.

A solução resultante foi homogeneizada, centrifugada numa centrifugadora *Thermo Scientific Heraeus Megafuge 40 R* a 3000 rpm por 10 min (Figura 6) e os sobrenadantes (Figura 7) foram utilizados para análise bioquímica.



Figura 6 - Centrifugadora *Thermo Scientific Heraeus Megafuge 40 R*

Na determinação da atividade antioxidante do pólen foram utilizados dois métodos: avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), avaliação da eliminação de radicais livres (ABTS) e para avaliar o teor em compostos fenólicos totais com o método de Folin-Ciocalteu.



Figura 7- Sobrenadantes utilizados para análise bioquímica.

3.4.2 Método do DPPH

Este método é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de alimentos e plantas.

A avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sanchez-Moreno *et al.* (1998). O método DPPH emprega os radicais livres 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]), a obtenção de um resultado antioxidante resulta numa diminuição da absorvância proporcional à concentração e atividade antioxidante do composto analisado (Villaño *et al.*, 2007).

O radical DPPH[•] tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade de eliminação de radicais livres em produtos apícolas, nomeadamente no pólen apícola (Carpes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2006; Leja *et al.*, 2007).

Este método apresenta a vantagem de utilizar uma solução de radicais livres estável e disponível comercialmente e tem sido amplamente aplicada no estudo de atividade antioxidante dos alimentos como o azeite, frutas, sumos e vinhos (Villaño *et al.*, 2007).

Os radicais livres DPPH, que inicialmente apresentavam uma cor roxa por terem um eletrão livre, perdem essa cor quando um radical de hidrogénio doado por uma molécula antioxidante entra em contacto com a molécula do DPPH (Menezes, 2009).

Para traçar a reta de calibração pesou-se 0,00986 g de DPPH numa cuvete de plástico. Dissolveu-se o DPPH em 25 mL de metanol num balão volumétrico. Guardou-se num local escuro. Preparou-se a partir da solução stock de Trolox as seguintes diluições 0,1 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 0,75 mL; 1,0 mL em metanol para um

volume total de 5 mL. Juntou-se em 250 μL de solução de DPPH com 100 μL standard de Trolox com 2 mL de metanol. Misturou-se e guardou-se no escuro durante 20 minutos a 20°C. Mediu-se a absorvância a 517 nm de todas as amostras da solução de trabalho de Trolox as diferentes diluições e a solução controlo. Construiu-se a reta de calibração da solução standard (Figura 8) com base na reta de regressão linear para obter a concentração de DPPH com base na concentração de Trolox. A reta de calibração foi obtida pela medição da absorvância de soluções de Trolox (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mM) e é igual a $y = 87,2x - 2,4783$ com $R^2 = 0,9979$.

A redução do radical de DPPH foi determinada por medição da absorvância a 517 nm num espectrofotómetro *SP 830 Plus Metertech*. Quanto menor o seu valor, maior será a capacidade antioxidante do extrato de pólen (Carpes, 2008). A percentagem do efeito bloqueador do DPPH foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ do efeito bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_a) / A_{\text{DPPH}}] \cdot 100$$

onde:

A_a - Absorvância da amostra

A_{DPPH} - Absorvância da solução DPPH.

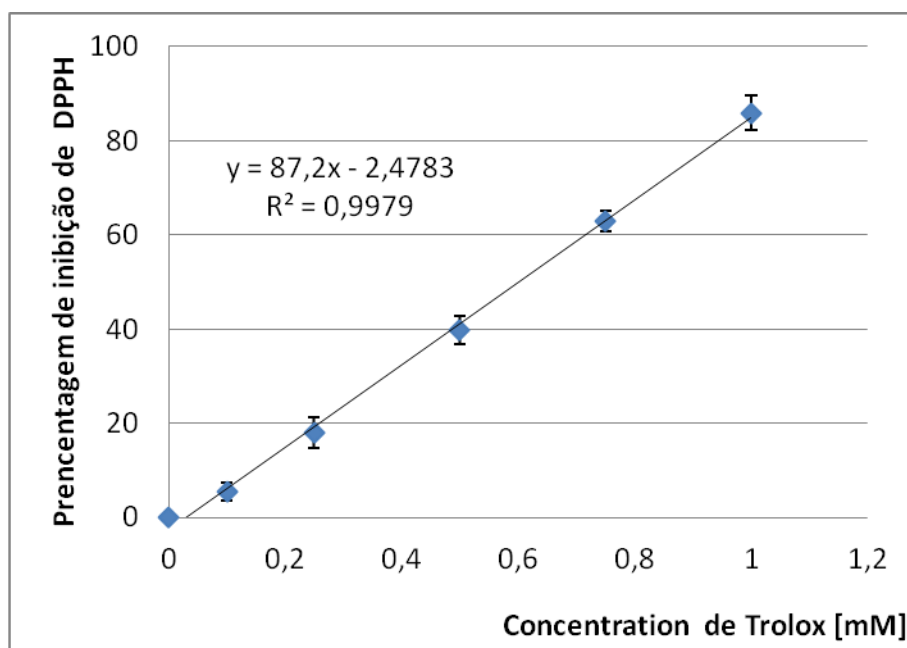


Figura 8 - Reta de calibração obtida pela percentagem de inibição de DPPH em função da concentração de Trolox.

Juntou-se 250 μL de solução de DPPH com 100 μL da amostra do extrato de pólen com água, do extrato de pólen com etanol e do extrato de pólen metanol e 2 mL de solvente (água/etanol/metanol). Guardou-se no escuro durante 20 minutos a 20°C.

Mediu-se a absorvância no espectrofotómetro a 517 nm todas as amostras. Todas as leituras foram feitas em quadruplicado.

3.4.3 Método do ABTS

Este método é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de alimentos e plantas. O procedimento utilizado baseou-se no descrito por Re *et al.* (1999) e tem como base a avaliação da capacidade que uma amostra tem de inibir este radical (ABTS^{•+}) em comparação com um antioxidante padrão, o Trolox.

A solução contendo o radical ABTS^{•+} foi preparado segundo Re *et al.* [1999] misturando 7,46 mM de ABTS^{•+} com 2,46 mM de persulfato de potássio (1:0,5, v/v) na ausência de luz à temperatura ambiente durante doze horas, o tempo necessário para a formação do radical. Para traçar a curva de calibração pesou-se 0,192 g de ABTS^{•+} numa cuvete de plástico e dissolveu-se o ABTS^{•+} em 50 mL de água ultrapura num balão volumétrico. Pesou-se 0,0166 g de persulfato de potássio e dissolveu-se em 25 mL de água ultrapura num balão volumétrico. Misturaram-se as duas soluções, agitou-se e guardou-se no escuro entre 12 horas, à temperatura ambiente.

A solução stock de ABTS assim obtida, foi diluída em metanol até se obter uma absorvância de 0,70 (\pm 0,020) a 734 nm (comprimento de onda de máxima absorção). Preparou-se a partir da solução de trabalho de Trolox as diluições 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; em metanol para um volume total de 10 mL. Juntou-se as soluções standard de Trolox com a solução diluída de ABTS. Misturou-se e guardou-se no escuro durante 6 minutos a 30°C. Mediu-se a absorvância no espectrofotómetro a 734 nm (Figura 9) de todas as amostras da solução de standard de Trolox a diferentes diluições e também da solução controlo com metanol.



Figura 9 - Espectrofotómetro SP 830 Plus Metertech

O valor representa a percentagem da capacidade de eliminação de radicais conforme:

$$\% \text{ de inibição} = [(AABTS - Aa) / AABTS] \cdot 100$$

onde:

Aa - Absorvância da amostra

AABTS - Absorvância da solução ABTS.

Construiu-se a reta de calibração da solução standard com Trolox (Figura 10). A reta de calibração foi obtida pela medição da absorvância de soluções de Trolox (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mM) e é igual a $y = 190,69x - 0,9476$ e $R^2 = 0,9992$.

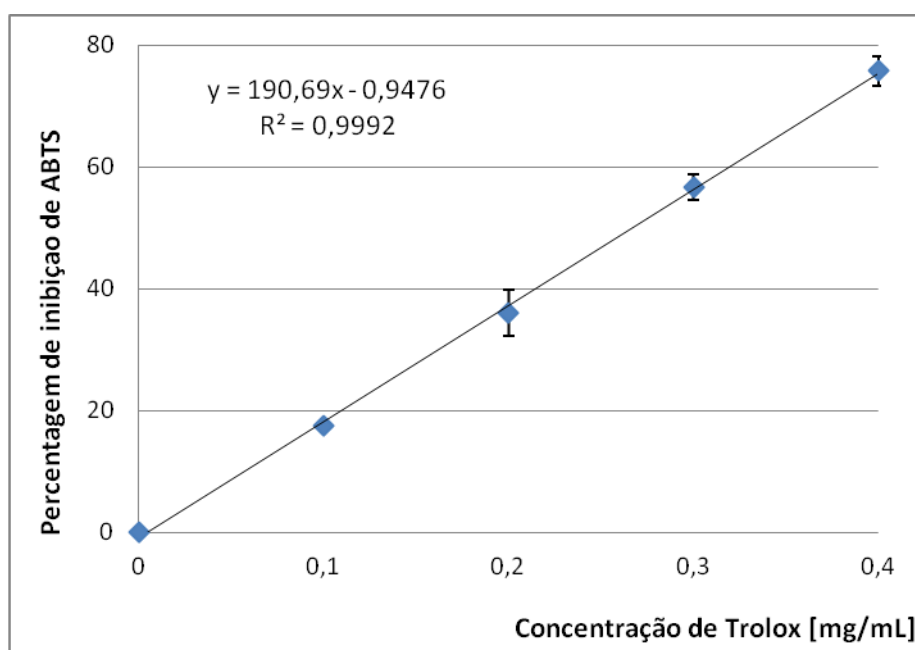


Figura 10 - Reta de calibração obtida pela percentagem de inibição de ABTS em função da concentração de Trolox.

Juntou-se a solução diluída de ABTS às amostras do extrato de pólen com água, do extrato de pólen com etanol e do extrato de pólen metanol. Guardou-se no escuro durante 6 minutos a 30°C. Mediu-se a absorvância no espectrofotómetro a 734 nm de todas as amostras. O branco foi preparado nas mesmas condições. Todas as leituras foram feitas em quadruplicado.

3.4.4 Método do Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu é utilizado para determinar o teor em compostos fenólicos totais. Baseia-se na determinação do número de grupos fenólicos ou noutros potenciais grupos oxidativos presentes nos compostos da amostra. Assenta no princípio que a transferência de eletrões em meio alcalino dos compostos fenólicos para os complexos ácidos fosfomolibdicos/fosfotungsticos e são determinados com o

espectrofotômetro a 725 nm. Os compostos fenólicos são fortemente oxidados em meio básico, resultando na liberação de O_2^- ; este, por sua vez, vai reagir com o molibdato, formando óxido de molibdênio, MoO_4^{2-} , o qual apresenta uma intensa absorvância a 725 nm (Poejo, 2008). O reagente de Folin-Ciocalteu (FCR) é uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato, usado para a determinação de antioxidantes fenólicos e polifenólicos (Singleton *et al.*, 1999). Ele funciona por medição da quantidade de substância analisada que é necessária para inibir a oxidação de reagente (Vinson *et al.*, 2005). No entanto, o reagente não só mede fenóis totais, mas vai reagir com qualquer substância redutora. Conseqüentemente é medida a capacidade redutora total de uma amostra e não apenas o nível de compostos fenólicos. Este reagente também reage com alguns compostos contendo azoto, tais como hidroxilamina e guanidina (Ikawa *et al.*, 2002).

A 125 μ L do extrato de pólen em água, em etanol e em metanol, separadamente, juntou-se 2 mL de água ultrapura, 125 μ L de solução diluída de reagente Folin-Ciocalteu e 250 μ L da solução saturada de carbonato de sódio. Passado 25 minutos mediu-se a absorvância da solução resultante num espectrofotômetro a 725 nm. O branco foi preparado nas mesmas condições. Todas as leituras foram feitas em quadruplicado.

Na determinação de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu de acordo com o descrito por Shahidi e Naczk (1995). O ácido ferúlico foi utilizado como padrão para a determinação da reta de calibração (Figura 11). A reta de calibração obtida pela medição da absorvância de soluções de ácido ferúlico (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mM) igual a $y = 3,13x + 0,0429$ e $R^2 = 0,9971$.

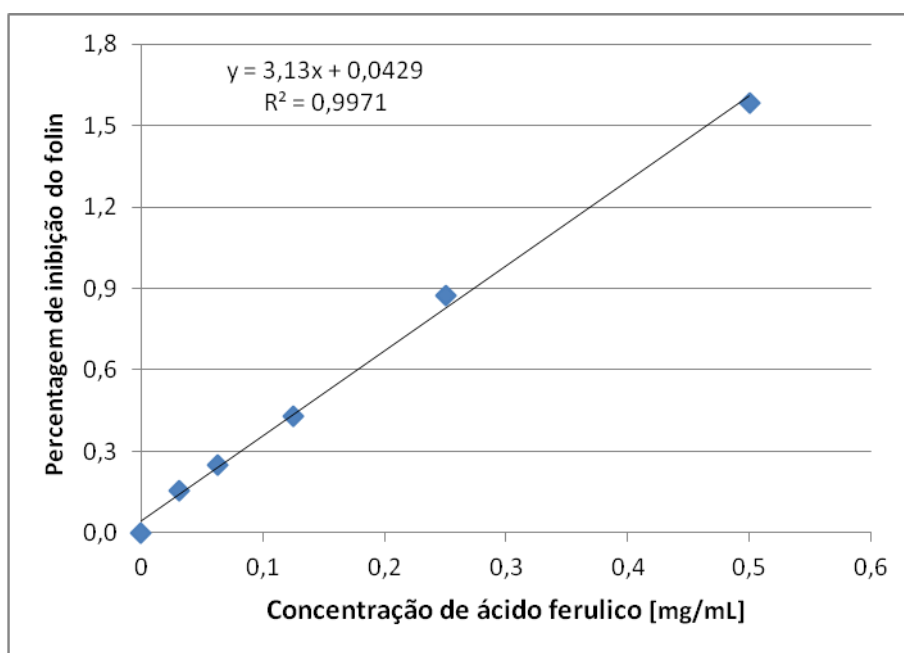


Figura 11 - Reta de calibração obtida pela porcentagem de inibição Folin-Ciocalteu em função da concentração de ácido ferúlico.

3.4.5 Tratamento de dados

Foi efetuada a análise multivariada, análise em componentes principais de modo a perceber as correlações conjuntas entre diferentes variáveis bem como entre os diferentes ensaios. Para a análise de variância foi calculado a percentagem de variação para cada fator considerado significativo. Os níveis de significância considerados foram:

1. Não significativo (ns) para valores de $p > 0,05$;
2. Significativo (*) para valores de $0,05 > p > 0,01$;
3. Muito significativo (**) para valores de $0,01 > p > 0,001$;
4. Altamente significativo (***) para valores de $p < 0,001$.

Para a análise estatística referida acima utilizou-se o valor da mediana de cada amostra. Os cálculos de análise de variância e análise multivariada foram efetuados com recurso ao *software* estatístico Statistic da Statsoft e módulo de análise de dados do Excel.

Para estudar a influência do método DPPH, ABTS e Folin-Ciocalteu para a determinação da atividade antioxidante e do tipo de solvente utilizado na preparação (água, etanol e metanol) para as diferentes amostras foi efetuada uma análise de variância a três fatores. Foi efetuado o teste de comparação múltipla de *Scheffé* a 95% de confiança para verificar se existiam diferenças significativas entre as diferentes amostras e para cada teste, as diferentes soluções extrativas. Optou-se pela utilização do teste de *Scheffé* devido à maior simplicidade de cálculo. Por permitir usar amostras com dimensões diferentes; ser robusto a violações dos pressupostos de normalidade e de igualdade de variâncias.

4. Resultados e Discussão

4.1 Resultados da análise polínica

Na Tabela 2 estão representados os resultados da análise polínica das várias amostras.

Tabela 2 - Resultados da análise polínica das amostras que continham apenas uma espécie




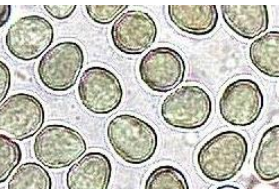

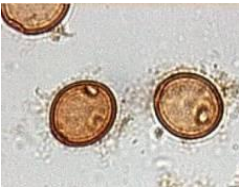

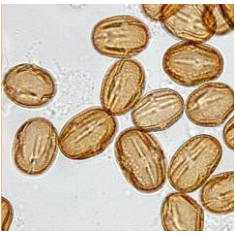



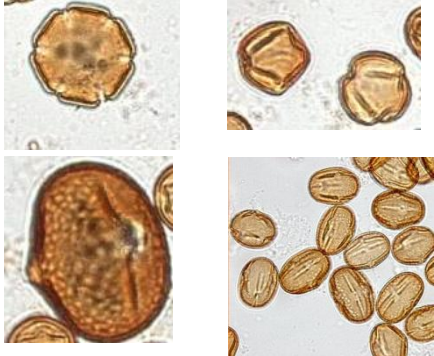

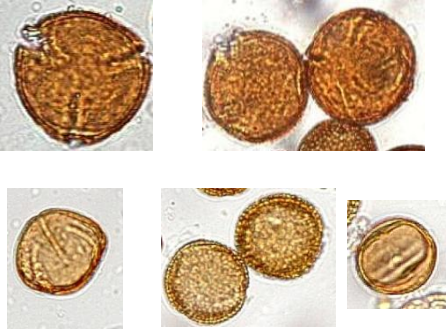

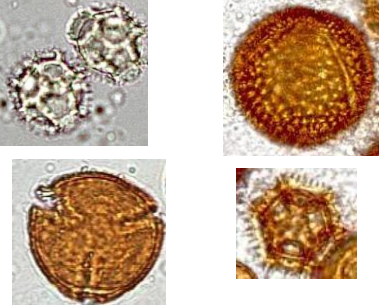

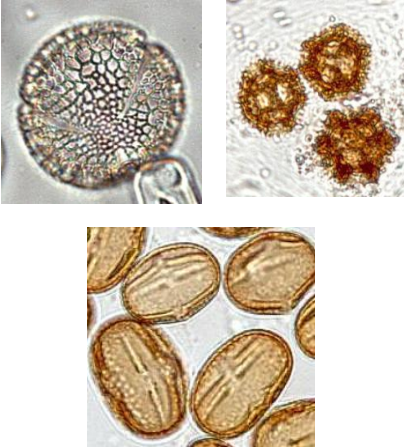
Espécie	Cor do pólen	Grão de polen	Ampliação
1. <i>Echium</i> sp.			400x
2. <i>Echium</i> sp.			200x
3. <i>Jasione montana</i>			400x
4. <i>Trifolium</i> spp.			400x
6. <i>Trifolium</i> spp.			400x

Tabela 3 - Resultados da análise polínica das amostras que continham mais do que uma espécie

<p>5. Mistura A <i>Lavandula</i> spp. <i>Rubus</i> spp. <i>Cytisus</i> spp. <i>Trifolium</i> spp.</p>			<p>400x</p>
<p>7. Mistura B: <i>Cistus</i> spp. <i>Quercus</i> spp. <i>Olea</i> spp. <i>Brassica</i> spp. <i>Raphanus</i> spp.</p>			<p>400x</p>
<p>8. Mistura C: <i>Taraxacum</i> spp. <i>Andryala</i> spp. <i>Cistus</i> spp. <i>Rhamnus</i> spp.</p>			<p>400x</p>
<p>9. Mistura D: <i>Cistus</i> spp. <i>Crepis</i> spp. <i>Trifolium</i> spp.</p>			<p>400X</p>

Devido a diversidade da origem botânica e ao comportamento das abelhas durante a recolha do pólen, as cores do grãos de pólen umas vezes correspondem a espécies isoladas como é o caso das amostras 1, 2, 3, 4 e 6 e outras vezes correspondem a misturas de espécies como é o caso das amostras 5, 7, 8 e 9. A espécie *Cistus* spp. está presente em quase todas as misturas, amostras 7, 8 e 9.

Embora as amostras apresentem cores diferentes podem corresponder à mesma espécie, como é o caso das amostras 1 e 2 que correspondem a *Echium* sp. e as amostras 4 e 6 correspondem à espécie *Trifolium* spp.

4.2 Resultados do método do DPPH

Os resultados que constam na Tabela 4 e na Figura 12 foram expressos em percentagem.

Tabela 4 - Percentagem de inibição de DPPH obtida nas diferentes amostras (média \pm desvio padrão).

Amostras	DPPH (%)		
	Extração com água	Extração com etanol	Extração com metanol
1 <i>Echium</i> sp.	9,11 \pm 0,62 aA	9,20 \pm 0,51 bA	10,63 \pm 0,21 aB
2 <i>Echium</i> sp.	12,03 \pm 0,59 bB	10,78 \pm 0,45 bA	11,72 \pm 0,24 a, bB
3 <i>Jasione montana</i>	15,01 \pm 0,59 cB	4,91 \pm 0,25 aA	15,28 \pm 1,10 a, bB
4 <i>Trifolium</i> spp.	8,13 \pm 0,36 aA	41,62 \pm 1,11 eB	61,91 \pm 1,51 eC
5 Mistura A	7,39 \pm 0,08 aA	23,00 \pm 0,75 cB	29,82 \pm 1,88 cC
6 <i>Trifolium</i> spp.	7,87 \pm 0,56 aA	41,77 \pm 0,97 eB	66,71 \pm 1,51 fC
7 Mistura B	30,26 \pm 1,04 fA	28,03 \pm 2,23 dA	64,30 \pm 2,84 e, fB
8 Mistura C	21,05 \pm 0,79 dC	4,02 \pm 0,30 aA	15,68 \pm 0,98 bB
9 Mistura D	25,24 \pm 0,83 eB	2,53 \pm 0,12 aA	45,09 \pm 1,74 dC

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes amostras de pólen
 Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes soluções de extração

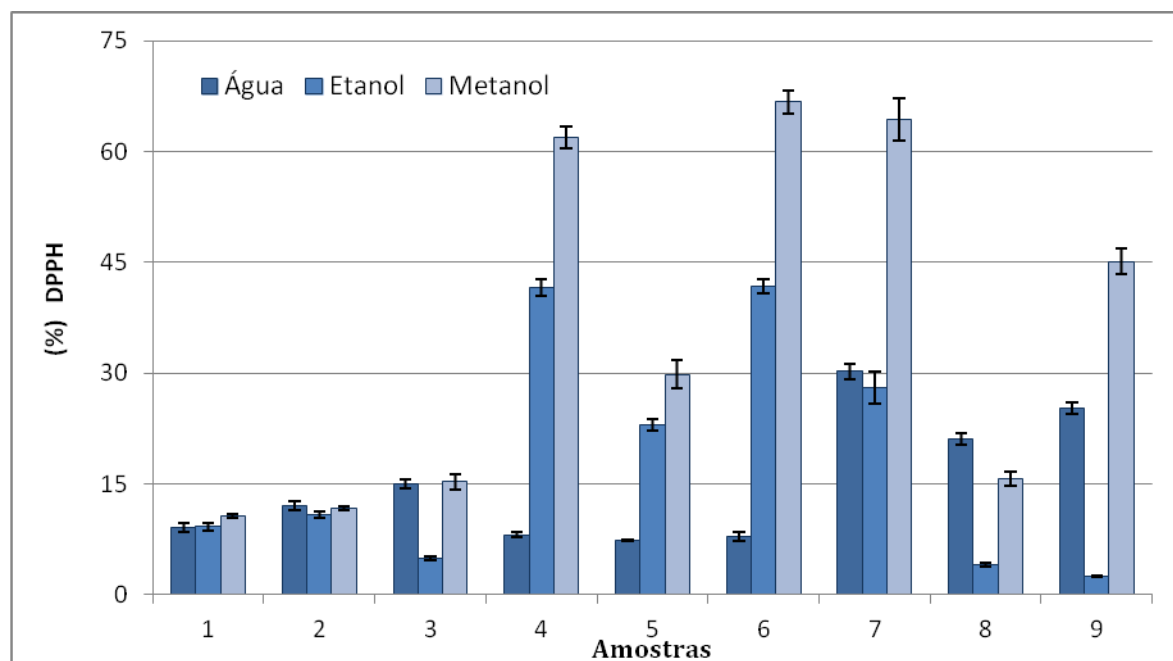


Figura 12 - Percentagem de inibição de DPPH obtida nas diferentes amostras (média \pm desvio padrão).

Os resultados obtidos com o método do DPPH revelaram-se discrepantes. Assim, a percentagem de inibição dos radicais de DPPH varia entre 2,53 e 66,71%. Tal pode ser justificado pela diferente origem botânica das amostras de pólen e a sensibilidade do método utilizado. Por outro lado, para o mesmo método existem substâncias antioxidantes que reagem de modo diferente com o DPPH* implicando uma cinética diferente. Assim, existem compostos que reagem rapidamente com o BHT e rapidamente com o ácido ascórbico (Margaritas *et al.*, 2009). Sendo a natureza das amostras de pólenes diferentes são constituídas por compostos também diferentes e com cinética diferente. O método do DPPH permite testar substâncias lipofílicas e hidrofílicas, ou seja, independe da polaridade do substrato (Koleva *et al.*, 2002). A lipofilicidade e hidrofilicidade dos antioxidantes não afetam as reações com o DPPH, uma vez que foi observada similaridade entre as atividades de captura de radicais livres do Trolox e α -tocoferol (Yamaguchi *et al.*, 1998).

A atividade antioxidante mede-se segundo o decréscimo de absorvância produzida, quanto maior for a atividade antioxidante do composto testado menor será a sua percentagem de inibição. Os extratos etanólicos de pólen foram os que apresentaram melhores resultados, atendendo ao teste de Scheffé, variando entre 2,53 a 41,77 %. As amostras com melhores atividade antioxidante foram as 9, 8 e 3, ou seja, mistura D, mistura C e *Jasione montana* respetivamente e por ordem crescente. Os extratos metanólicos foram variando entre 10,63% e 66,71% e as melhores amostras foram a 1 e 2 que correspondem a *Echium* sp. A extração com água apresentou os piores resultados que variaram entre 7,39 e 30,26%. Para os extratos hídricos de pólen, os melhores resultados incidiram nas amostras 5, 6, 4 e 1,

ou seja, mistura A, *Trifolium* spp. e *Echium* sp. Estes resultados parecem coerentes já que o *Trifolium* spp. também faz parte da constituição da mistura A.

A extração realizada com etanol foi a mais eficiente tal como já tinha sido observado por Michałowska e Matyasik (2011) e as misturas C e D e a amostra 3 revelaram ser as que apresentaram uma maior atividade antioxidante.

4.3 Resultados do método do ABTS

Os resultados que constam da Tabela 5 e na Figura 13 foram expressos em percentagem.

Tabela 5 - Percentagem de inibição de ABTS obtida nas diferentes amostras. (média \pm desvio padrão)

Amostras	ABTS (%)		
	Extração com água	Extração com etanol	Extração com metanol
1 <i>Echium</i> sp.	21,69 \pm 1,08 bC	14,93 \pm 0,52 bA	16,97 \pm 0,67 aB
2 <i>Echium</i> sp.	17,10 \pm 0,67 aB	13,39 \pm 0,47 bA	17,00 \pm 0,30 aB
3 <i>Jasione montana</i>	28,57 \pm 0,47 dC	5,54 \pm 0,35 aA	14,81 \pm 0,56 aB
4 <i>Trifolium</i> spp.	20,38 \pm 0,72 bA	24,89 \pm 0,57 dB	39,93 \pm 1,24 cC
5 Mistura A	26,82 \pm 1,34 c, dA	28,18 \pm 1,09 eA	37,70 \pm 1,02 cB
6 <i>Trifolium</i> spp.	24,67 \pm 0,71 cA	25,55 \pm 1,41 dA	47,22 \pm 1,70 dB
7 Mistura B	37,37 \pm 0,67 fB	18,31 \pm 0,63 cA	38,63 \pm 1,37 cB
8 Mistura C	33,89 \pm 1,63 eC	6,51 \pm 0,32 aA	22,47 \pm 0,61 bB
9 Mistura D	32,82 \pm 0,76 eB	6,11 \pm 0,07 aA	37,24 \pm 1,25 cC

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes amostras de pólen.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes soluções de extração.

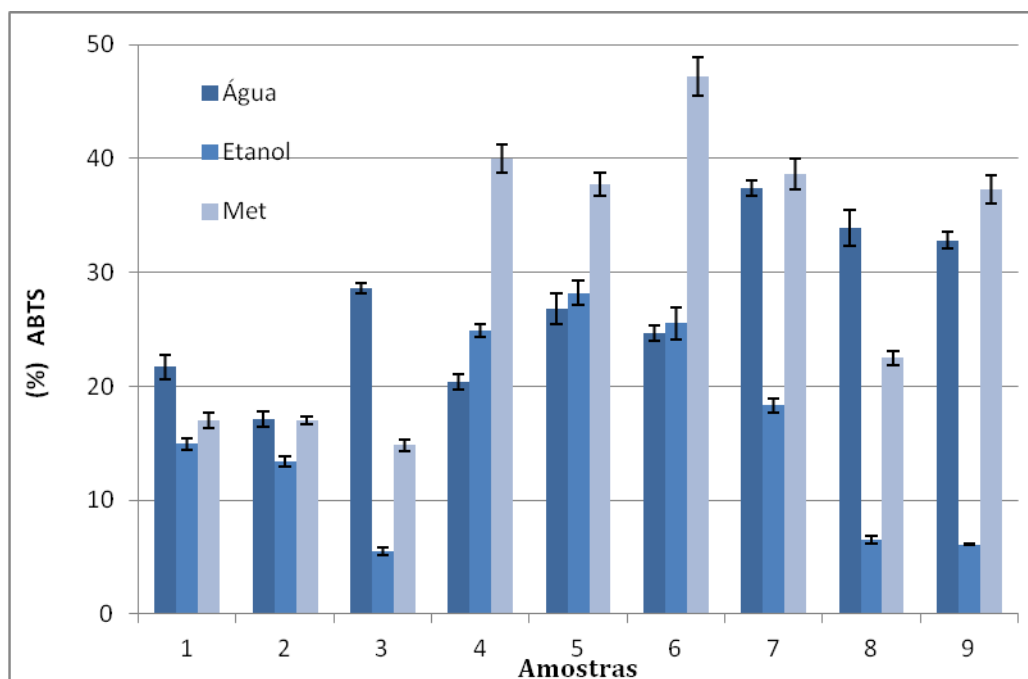


Figura 13 - Percentagem de inibição de ABTS obtida nas diferentes amostras.

A atividade antioxidante mede-se segundo o decréscimo de absorvância produzida, quanto maior for a atividade antioxidante do composto testado menor será a sua percentagem de inibição. Para estudar a influência do método ABTS para a determinação da atividade antioxidante e do tipo de solvente utilizado na preparação (água, etanol e metanol) para as diferentes amostras foi efetuada uma análise de variância a três fatores. Os extratos etanólicos de pólen foram os que apresentaram melhores resultados atendendo ao teste de Scheffé, variando entre 5,54 a 28,18 %. As amostras com melhores atividade antioxidante foram as amostras 3, 9 e 8, ou seja, *Jasione montana*, mistura D e mistura C. respetivamente e por ordem crescente. Os extratos metanólicos variaram entre 14,81 e 47,22% e as melhores amostras foram a 3, 1 e 2 que correspondem a *Jasione montana* e *Echium* sp. A extração com água apresentou os piores resultados que variaram entre 17,10 a 37,37%. Para os extratos hídricos de pólen, o melhor resultado foi obtido pela amostra 2, ou seja, *Echium* sp. A extração realizada com etanol foi a mais eficiente tal como já tinha sido observado por Pérez-Pérez, 2012 e Michałowska e Matyasik (2011).

4.4 Resultados do método de Folin-Ciocalteu

Os resultados que constam na Tabela 6 e na Figura 14 foram expressos em mg FAE /g de pólen.

Tabela 6 - Teor de compostos fenólicos totais em mg FAE/g de pólen apícola obtido nas diferentes amostras (média \pm desvio padrão).

Amostras	Extração com água	Extração com etanol	Extração com metanol
1 <i>Echium</i> sp.	70,43 \pm 0,22gC	29,50 \pm 0,14dA	49,43 \pm 0,17bB
2 <i>Echium</i> sp.	51,38 \pm 0,21dC	29,63 \pm 0,17dA	45,93 \pm 0,15aB
3 <i>Jasione montana</i>	54,05 \pm 0,34eB	13,60 \pm 0,08cA	57,88 \pm 0,13cC
4 <i>Trifolium</i> spp.	29,85 \pm 0,17aA	86,30 \pm 0,12gB	86,75 \pm 0,19eB
5 Mistura A	47,33 \pm 0,15cA	102,75 \pm 0,13hC	101,18 \pm 0,10fB
6 <i>Trifolium</i> spp.	43,18 \pm 0,19bA	48,40 \pm 0,25fB	103,10 \pm 0,12fC
7 Mistura B	86,75 \pm 0,19iB	42,08 \pm 0,25eA	118,20 \pm 0,12gC
8 Mistura C	72,90 \pm 0,18hC	11,60 \pm 0,16bA	61,93 \pm 0,26dB
9 Mistura D	62,50 \pm 0,12fB	10,70 \pm 0,12aA	86,38 \pm 0,28eC

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes amostras de pólen.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ entre as diferentes soluções de extração.

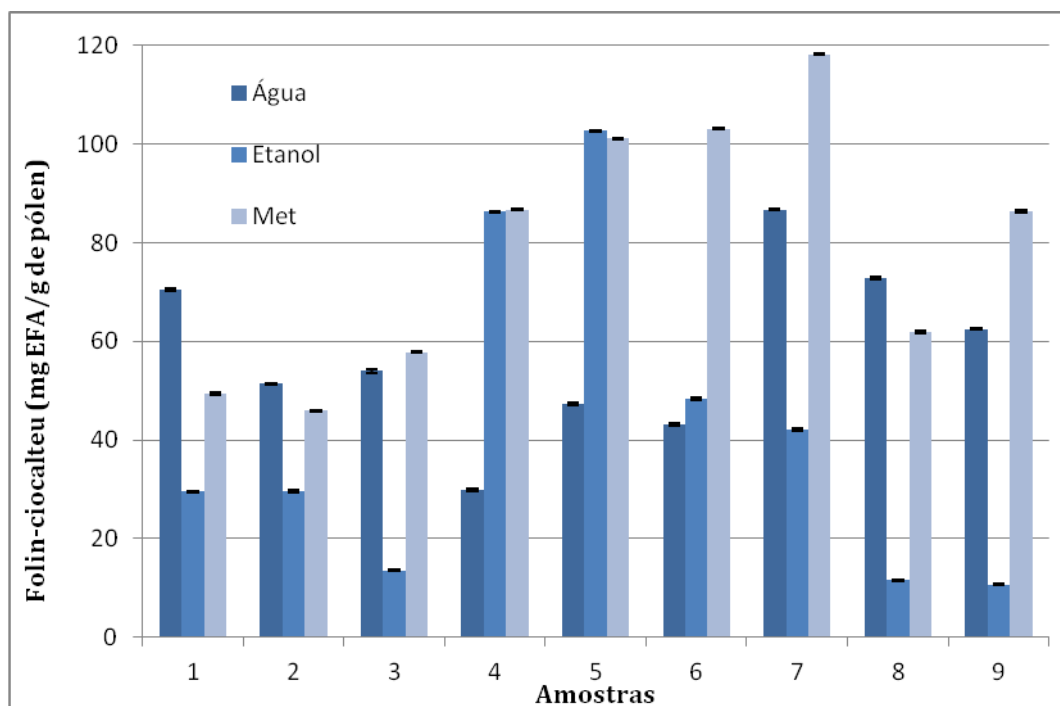


Figura 14 - Teor de compostos fenólicos totais em mg FAE/g de pólen apícola obtido nas diferentes amostras.

Os extratos metanólicos foram os melhores variando entre 45,93 e 118,20% e as melhores amostras foram a 7, 6 e 5 que correspondem a mistura B, *Trifolium* spp. e mistura A. Os extratos hídricos variaram entre 29,85 e 86,75%. As melhores amostras foram a 7, 8 e 1 que correspondem a mistura B, mistura C e *Echium* sp.. Os extratos etanólicos de pólen apresentaram os piores resultados e variaram entre 10,7 a 102,75. As melhores amostras foram a 5 e a 4 ou seja, mistura A e *Trifolium* spp. respetivamente e por ordem crescente.

Quando se analisa a relação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos, percebe-se muitas vezes que a literatura é contraditória. Muitos autores encontraram uma correlação positiva entre os compostos fenólicos e/ou flavonóides e o potencial antioxidante de uma grande variedade de produtos alimentícios (Meda *et al.*, 2005; leja *et al.*, 2007) enquanto outros relataram uma correlação muito fraca entre atividade antioxidante e compostos fenólicos (Atoui *et al.*, 2005; Zheng e Wang, 2001).

4.5 Comparação dos resultados obtidos com os vários métodos analíticos

Para o estudo das correlações entre os resultados dos métodos DPPH e ABTS utilizou-se uma matriz de correlação (Tabela 7).

Tabela 7 - Matriz de correlação, entre a atividade antioxidante das amostras e o teor em compostos fenólicos totais extraídos utilizando como solvente água ou etanol ou metanol com os métodos ABTS, DPPH e Folin-Ciocalteu.

	DPPH			ABTS			Folin-Ciocalteu		
	Água	Etanol	Metanol	Água	Etanol	Metanol	Água	Etanol	Metanol
Água	1			1			1		
Etanol	-0,361	1		-0,344	1		-0,556	1	
Metanol	0,168	0,794	1	0,220	0,653	1	0,008	0,511	1

Nos métodos DPPH e ABTS há uma correlação positiva entre os valores obtidos com os extratos em metanol e etanol. A correlação observada é superior para o método DPPH.

Tal como referenciado por Michałowska e Matyasik (2011) a comparação entre os métodos de eliminação de radicais livres, DPPH• e ABTS^{•+}, também mostram as diferenças entre o comportamento dos antioxidantes pois os tempos de reação são diferentes de acordo com o método usado (DPPH• 20 min e ABTS^{•+} 6 min). Arnao (2000) sugeriu que as diferenças entre DPPH• e ABTS^{•+} pode ser o resultado de que o DPPH• é medido a um comprimento de onda mais perto do visível do que o ABTS^{•+}. Como refere Sakanaka e Ishihara (2008) a atividade de um composto antioxidante de origem natural depende de vários parâmetros, tais como o mecanismo de reação e as condições experimentais.

Em relação a análise em componentes principais (Figura 15), relativo aos resultados obtidos com os procedimentos DPPH, ABTS e Folin-Ciocalteu usando os diferentes solventes (metanol, etanol e água), verifica-se uma correlação positiva em relação ao solvente utilizado para a extração dos antioxidantes independentemente do método utilizado.

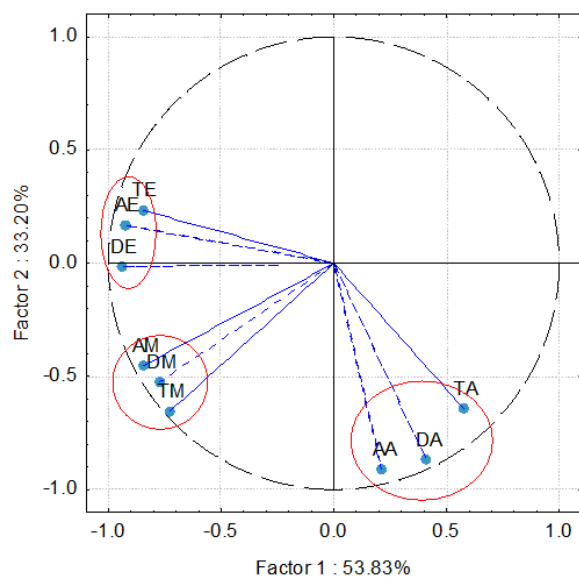


Figura 15 - Projeção dos valores obtidos para os três métodos e as diferentes soluções extrativas no sistema de eixos correspondentes ao facto 1 e facto 2, resultantes da Análise de componentes principais. Legenda: A - Método ABTS, D - Método DPPH, T - Método Folin-ciocalteu; solvente utilizado: M - metanol, E- etanol, A - água.

Na Tabela 8 está representado o resumo da análise de variância para avaliar as diferenças entre as amostras (método, solvente e amostra). Os fatores solvente e os métodos DPPH e ABTS são altamente significativos para a explicação da variação dos dados com 18,7% e 24,8% respetivamente, da variabilidade total. Os resultados obtidos para os dois métodos, embora muito significativos explicam apenas 0,2 % da variação total, devido ao facto de não só os métodos serem semelhantes, mas também pelo facto do efeito do solvente e tipo de amostra se sobrepor ao efeito do método.

Verifica-se ainda que os resultados obtidos para cada método em função do solvente (12 % da variação total) e da amostra (8 % da variação total) são estatisticamente diferentes.

A maior percentagem de variação (33,3%) é devida ao efeito verificado do comportamento do solvente para cada amostra, denotando que se deve ter a máxima atenção na seleção do solvente sempre que se muda de amostra de pólen.

Tabela 8 - Resumo da análise de variância relativa ao valor da atividade antioxidante das diferentes amostras de pólen apícola (método, solvente e amostra).

	Graus de liberdade	Média da soma dos quadrados	F_{cal}	p-value	Porcentagem da variação
Método	1	93,8	8,3	0,004**	0,2
Solvente	2	4857,3	430,1	0,000***	18,7
Amostra	8	2157,3	191,1	0,000***	24,8
Método*Solvente	2	1555,3	137,7	0,000***	11,9
Método*amostra	8	353,0	31,3	0,000***	7,9
Solvente*amostra	16	972,0	86,1	0,000***	33,3
Erro	178	11,3			3,1

Na Tabela 9 apresenta o resumo da análise de variância relativa ao valor da atividade antioxidante das diferentes amostras de pólen apícola (solvente e amostra).

Tabela 9 - Resumo da análise de variância relativa ao valor da atividade antioxidante das diferentes amostras de pólen apícola (solvente e amostra).

	Graus de liberdade	Média da soma dos quadrados	F_{cal}	p-value	Porcentagem da variação
Solvente	2	12646,4	358167,8	0,000***	27,9
Amostra	8	3091,2	87548,6	0,000***	20,5
Solvente*amostra	16	2591,9	73406,3	0,000***	51,6
Erro	81	0,0			0,0

Observou-se que o efeito do solvente utilizado é altamente significativo explicando 27,9% da variação observada. O conteúdo em compostos fenólicos é muito variável de acordo com as amostras de pólen e explica 20,5% da variação observada.

Mais uma vez verifica-se que é necessário ter em atenção a escolha de solvente sempre que se trabalham amostras diferentes dado que o valor da interação solvente amostra explica 51,6% da variação observada.

Os métodos utilizados para a avaliação dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante são baseados em propriedades redox, logo deveria ser encontrada alguma correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante tal como medido pela DPPH• e ABTS•+ métodos de eliminação de radicais

livre. Ambos os métodos são classificados como sendo só dependente do anti-oxidante e do agente oxidante, mas o mecanismo real depende de outros fatores, como o tipo de componente ou pH da reação afetando principalmente o radical ABTS (Michałowska e Matyasik, 2011).

5. Considerações finais

Em média os extratos metanólicos apresentam um teor de polifenóis totais mais elevado do que os outros (com água e com etanol), com exceção para a mistura C e *Echium* sp..

A grande variabilidade está relacionada com a atividade antioxidante e o teor em compostos fenólicos totais de pólen apícola. Diferentes espécies botânicas apresentam uma atividade antioxidante específica da espécie ou da mistura de espécies que a constituem, mas também são dependentes do método analítico e do solvente de extração.

Os resultados são melhores para os extratos referentes a misturas do que para espécies isoladas, o que leva a concluir que algumas das espécies que se encontram nas misturas e que não foi possível analisar separadamente, são espécies com elevada capacidade antioxidante.

As propriedades antioxidantes dos extratos de pólen apícola não podem ser avaliadas através de apenas um método devido à natureza complexa dos seus constituintes. Assim, recomenda-se o uso de pelo menos dois métodos para avaliar e comparar a capacidade antioxidante de uma amostra, tal como foi procedido neste estudo.

Para os dois métodos que permitem avaliar da atividade antioxidante, DPPH e ABTS o melhor solvente foi o etanol.

São necessários mais estudos para o pólen da região de Castelo Branco que possam permitir isolar as espécies botânicas identificadas nas misturas, de modo a averiguar a sua capacidade antioxidante e possíveis características diferenciadoras de modo a valorizar este produto.

6. Referências bibliográficas

- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Jornal f Food Composition and Analysis*, 18, 105-11.
- Apak, R. , Güçlü, K., Demirata,B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K. e Özyurt, D. (2007) *Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay Molecules*, 12, 1496-1547
- Arnao M.B., (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 419-421.
- Arruda, V. (2013). Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutorado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27-36.
- Barreto, L. M. R. C.; Funari, R. C.; Orsi, R.O.; Dib, A. P. S. (2006). Produção do pólen no Brasil. Taubaté, SP, Cabral Editora e Livraria Universitaria. 100;
- Bennick, A. (2002). Interaction of Plant Polyphenols with Salivary Proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13, 184-196.
- 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.
- Campos, M. (1997) Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas, Faculdade de Farmácia Universidade de Coimbra.
- Campos, M., Webby, R., Markham, K., Mitchell, K., Cunha, A. (2003) Age-Induced Diminution of Free Radical Scavenging Capacity in Bee Pollens and the Contribution of Constituent Flavonoids, *Agric. Food Chem.*, vol. 51, pp. 742-745.
- Campos, M., Bogdanov, M., Almeida-Muradian, L., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., Ferreira, F. (2008) Pollen composition and standardisation of analytical methods, *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47(2): 156–163.
- 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.
- Carpes, S.T. (2008). Estudo das características Físico-Químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Sector de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.
- Carpes, S.T., Alencar, S.M., Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Mourão, G.B., Haminiuk, C.W.I., Luz, C.F.P., Masson, M.L. (2013). Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *Journal of Food*, 11 (2), 150-161.
- Chen, C., Liu, K., Hsu J., Huang H., Yang, M., Wang, C., (2005). Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chem.* 91, 601-607.
- Cuchiara, C.C., Souza, S.A.M., Silva, S.D.A., Bobrowski, V.L. (2012). Efeito do tempo de descongelamento de grãos de pólen demamoneira armazenados em diferentes temperaturas. *Biotemas*, 25, 65-73.

Donadieu, Y. (1983) *Le pollen - Therapeutique naturelle*. Editora Librairie Maloine, Paris, França. 99;

Estevinho, L. M., Rodrigues, S., Pereira, A.P., Feás, X. (2012). Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 429-435.

FNAP, (2009) *Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Manual de criação de rainhas autóctones em Portugal*.

FNAP, (2010) *Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Manual de produção de Pólen e Própolis*.

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

Graikou, K., Kapeta, S., Nektarios, A., Sotiroudis, G. e Niki, C., (2011). *Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties*. *Chemistry Central Journal* 2011, 5:33

Ikawa M., Schaper T.D., Dollard C.A., Sasner J.J. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.* 51 (7): 1811-5.

Jeszka M., Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Dziedzic K. (2010). Phenolics – characteristic and significance in food technology, *Inc Science Technology* 4, 2.

Koleva, I. I., van BeeK, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A., Evstatieva, L. N. (2002). *Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods*. *Phytochem. Anal.*, 13, 8.

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., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekoń, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100, 237-240

LeBlanc, B., Davis, O., Boue, S., DeLucca, A., Deeby T., (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen 115 pp. 1299-1305.

Lengler, S. (2002) *Pólen apícola*. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, Brazil.

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.

Marghitas, L., Stanciu, O., Dezmiorean, D., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S., Campos, M., (2009). *In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from* *Food Chemistry* 115 pp. 878-883.

Marghitas, L. A. (2011). *Bee Pollen Antioxidant Activity – A Review: Achievements and Further Challenges*. *Journal of Pharmacognosy*. Vol. 2, Issue 2, pp. 25-38.

Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571-577.

Menezes, J.D.S. (2009). *Compostos Bioativos do pólen apícola*. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos na Faculdade de Farmácia da Bahia, Brasil.

- Michałowska, G. Anna e Matyasik, C. Magdalena (2011). Evaluation of the antiradical potential of fruit and vegetable snacks, University of Life Sciences, Poznań, Polonia
- Montenegro, G. Avila, G., Rougier, D., Timmermann, B. (1997) . Pollen loads: source of carotenoids originating from the mediterranean plant communities of the central zone of Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 70, 91-99.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., Estevinho, L.M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidante properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1096-1101.
- Moreti, A. C. (2004) Pólen: alimento protéico para as abelhas – complemento alimentar para o homem. Instituto de Zootecnia de São Paulo.
- Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., & Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418–425.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.A., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. (2007) Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2287-2295.
- 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.
- Pérez-Pérez, E. M., Vit, P., Rivas, E., Sciortino, R., Sosa A., Tejada, D., Rodríguez-Malaver, A. J. (2012) *Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Mérida, Venezuela*. *Archivos latinoamericanos de nutrición órgano oficial de la sociedad latinoamericana de nutrición*, 62, 4.
- Pham-Huy, L., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biomedical science*. (4): 89-96.
- Poejo, P., (2009) *Avaliação da atividade antioxidante em diferentes tipos de bebidas: vinho e cerveja*. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Alimentar/Qualidade 52- 56
- Prior, R. (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 570S-578S.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rice-Evans, C., Miller N.J., Paganga G. (1996). *Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Sakanaka, S., Ishihara, Y. (2008). Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation tuna homogenates. *Food Chemistry* 107, 739–744.
- Saric, A., Balog, T., Sobocanec, S., Kusic, B., Sverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, B., Pinto, B., Marotti, T., (2009). Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cistus incanus* L. rich bee pollen, *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp. 547–554.
- Serra, J.B., Escolá, R.J. (1997) Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 45, 725-732.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 299: 152-178.

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.

Stanley, R. , Linskens, H. (1974) *Pollen. Biology - Biochemistry - Management*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Torres, A., Guinand, J., Guerra Modernell, M. (2003) Propiedades nutricionales y estabilidad de los componentes de los alimentos. In: Guerra Modernell, M., coord. Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos. Madrid, Miranda: CYTED. 1, 1-18.

Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M., Garcí-Parrilla M.C. (2007), Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*, 71, 230–235.

Vinson J, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J (2005). «Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants». *J Am Coll Nutr* 24 (1): 44–50. PMID 15670984.

Wang, H., Gao, X.D., Zhou, G.C., Cai, L., Yao, W.B., (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Chobrospondias axillaris*. *Food Chemistry* 106, 888 895.

Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J., 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1201–1204.

Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.

Bibliografia de Figuras

Figura 4- <http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm>,