

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

GILBERTH SILVA NUNES

Pólen coletado pela *Melipona fasciculata* na Amazônia maranhense: composição físico-química e atividade antimicrobiana

São Luís - MA

2017

GILBERTH SILVA NUNES

Pólen coletado pela *Melipona fasciculata* na Amazônia maranhense: composição físico-química e atividade antimicrobiana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Área: Qualidade Ambiental e Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Garros Rosa

São Luís - MA

2017

GILBERTH SILVA NUNES

Pólen coletado pela *Melipona fasciculata* na Amazônia maranhense: composição físico-química e atividade antimicrobiana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Área: Qualidade Ambiental e Saúde

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr.^a Ivone Garros Rosa (Orientadora)
(Departamento de Patologia/UFMA)

Prof. Dr. Silvio Carvalho Marinho
(Faculdade Estácio São Luís)

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
(Departamento de Tecnologia Química/UFMA)

Prof^a. Dr.^a Adenilde Nascimento Mouchrek
(Departamento de Tecnologia Química/UFMA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar sempre coisas maravilhosas e muito mais do que eu mereça.

À minha família, em especial, aos meus pais, Ilza e Gilberto, pelos incentivos e por sempre mi ofertar tudo sem medir esforços, a minha força e toda minha dedicação vem de vocês e para vocês. Dedico também ao meu querido irmão Junior e aos meus avós, tias, primos que são inspiração de vida humana.

Aos colegas da turma 12 do mestrado em Saúde e Ambiente, pelas trocas de experiências, pelos incentivos, por todas os momentos de alegria em sala.

Aos meus amigos, Marcos, Luís, Samara, Lumex, Israel, Caio, Corina, Kátia Daniele, Hérika Polyana, Jetânia, Silvio pessoas que sempre vou levar no meu coração.

Este trabalho é uma obra com diversas impressões, não poderia de início agradecer à Franciele, Marcos, Edinho, professora Hércia e Jeinny, pesquisadores que contribuíram para finalização deste trabalho, foi uma troca de experiências magnífica.

Aos irmãos do laboratório de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) por sempre nesses anos de convívio manter um espírito de família e respeito com todos. Um beijo enorme e especial a Edna Maria pela amizade e carinho que sempre teve comigo.

Aos meliponicultores da Amazônia Maranhense pelo fornecimentos das amostras de pólen de tíuba. Agradecimento aos amigos Joca e José Malheiros pelos momentos e ensinamentos.

À professora Ivone Garros, pela amizade verdadeira e carinho imenso. Agradeço pelo convite à 8 anos atrás pois ganhei uma mãe e conselheira espiritual na minha vida. Esse trabalho tem uma parcela enorme de amor e respeito.

Aos professores da banca examinadora por aceitar o convite na construção desse trabalho e por serem inspirações.

Um agradecimento à Faculdade Estácio pelo apoio no desenvolvimento dessa dissertação de mestrado e parceria do professor Gustavo Monteiro.

RESUMO

O pólen e outros produtos de origem apícola são tradicionalmente utilizados desde muito tempo, especialmente na medicina natural, por apresentar propriedades fitoterápicas e por sua quantidade de nutrientes que possui e vem tomando espaço diante do seu potencial nutricional. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil físico-químico e biológico em pólen coletado pela abelha *Melipona fasciculata* da região da Amazônia Maranhense. A pesquisa abrangeu um estudo experimental descritivo, onde foram coletadas 11 amostras em 5 municípios (São Bento, Palmeirândia, São Vicente de Ferrer, Bequimão e Perimirim) da Baixada maranhense. Foram determinados os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos, valor calórico, pH e acidez, fenólicos totais e flavonóides totais, capacidade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e capacidade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar. As análises demonstraram que o teor de umidade variou de $32,00 \pm 1,29$ a $38,65 \pm 0,60$ g/100g, cinzas de $1,38 \pm 0,07$ a $2,50 \pm 0,03$ g/100g, lipídios de $2,09 \pm 0,18$ a $5,46 \pm 0,00$ g/100g, proteína de $13,91 \pm 0,00$ a $28,87 \pm 0,00$ g/100g, carboidratos de $29,43 \pm 0,83$ a $43,25 \pm 0,43$ g/100g, valor calórico de $247,48 \pm 2,86$ a $276,80 \pm 5,34$ kcal/100g, pH de $3,57 \pm 0,06$ a $3,80 \pm 0,00$ e acidez de $64,19 \pm 0,00$ a $161,70 \pm 0,00$ mEq/kg. O teor de fenólicos variou de $10,37 \pm 0,51$ a $22,37 \pm 1,29$ mg EAG/g e flavonoides totais de $0,92 \pm 0,05$ a $2,56 \pm 0,04$ mg catequina/g. A capacidade antioxidante, pelo método DPPH, variou de $91,03 \pm 0,78$ a $94,76 \pm 0,31\%$. Com relação à atividade antimicrobiana se observou oito as amostras apresentaram ação frente à bactérias gram-positivas e gram-negativas. O pólen coletado pela tíuba na Amazônia maranhense apresentou um alto valor nutricional e ação antioxidante evidenciando o seu uso como complemento alimentar e funcional, além de apresentar efeito contra o crescimento de bacteriano.

Palavra-chave: pólen apícola, *Melipona fasciculata*, valor nutricional, compostos fenólicos, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Pollen and other bee-derived products are traditionally used since a long time, especially in natural medicine, due to its herbal and quantity of nutrients that has and is taking space in front of their nutritional potential properties. This study aims to evaluate the physicochemical and biological profile in pollen collected by bees *Melipona fasciculata* of the lowland region in order to identify the nutritional value of apiculture products for family farming. The research is an experimental descriptive study, in which 11 samples were collected in 5 municipalities (São Bento, Palmeirândia, São Vicente de Ferrer, Bequimão and Perimirim) from Maranhão Amazon. The values of moisture, ashes, proteins, lipids, carbohydrates, caloric value, pH and acidity, total phenolics and total flavonoids were determined by spectrophotometry, antioxidant capacity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and antimicrobial capacity by Diffusion technique in agar. The analyzes showed that the moisture content ranged from 32 ± 1.29 to 38.65 ± 0.60 g / 100g, ashes from 1.38 ± 0.07 to 2.50 ± 0.03 g / 100g, 2.09 ± 0.18 to 5.46 ± 0.00 g / 100g, protein from 13.91 ± 0.00 to 28.87 ± 0.00 g / 100g, carbohydrates from 29.43 ± 0.83 a 43.25 ± 0.43 , kilocalories of 247.48 ± 2.86 to 276.80 ± 5.34 , pH of 3.57 ± 0.06 to 3.80 ± 0.00 and acidity of 64.19 ± 0.00 to 161.70 ± 0.00 mEq / kg. The phenolic content ranged from 10.37 ± 0.51 to 22.37 ± 1.29 mg EAG / g and total flavonoids from 0.92 ± 0.05 to 2.56 ± 0.04 mg catechin / g. The antioxidant capacity, by the DPPH method, ranged from 91.03 ± 0.78 to $94.76 \pm 0.31\%$. Regarding antimicrobial activity was observed eight samples showed the opposite action gram-positive and gram-negative bacteria. The pollen collected by tiúba in the Maranhão Amazon presented a high nutritional value and antioxidant action evidencing its use as a food and functional complement, besides having an effect against bacterial growth.

Keywords: bee pollen, *Melipona fasciculata*, nutritional value, phenolic compounds, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização de alguns Meliponíneos no Brasil.....	14
Figura 2. Caixa modular de <i>Melipona fasciculata</i> da região de São Bento-Maranhão, Brasil.....	15
Figura 3. Localização da Baixada Maranhense, segundo IBGE.....	24
Figura 4. Teste de difusão em meio sólido com disco e perfuração de poços realizado com os extratos de pólen coletados pela tíuba na Amazônia maranhense.....	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Identificação das amostras e descrição da origem do pólen coletado pela <i>Melipona fasciculata</i>	25
Tabela 1. Perfil físico-químico das amostras de pólen de <i>Melipona fasciculata</i> coletadas na Amazônia Maranhense.....	33
Tabela 2. Teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante do pólen coletado pela tíuba.....	41
Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de pólen (EEP) pelo método de difusão em meio sólido com perfuração de poços em milímetros (mm).....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 As abelhas indígenas sem ferrão (<i>Melipona fasciculata</i>).....	13
2.2 Pólen apícola	16
2.3 Composição química e propriedades.....	17
2.4 Propriedades biológicas.....	18
2.4.1 Compostos fenólicos.....	19
2.4.2 Capacidade antioxidante.....	20
2.4.3 Benefícios do pólen para saúde humana.....	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Tipo de estudo e local da pesquisa	23
4.2 Descrição da área de coleta.....	23
4.3 Obtenção das amostras	24
4.4 Análises físico-químicas	25
4.4.1 Umidade.....	25
4.4.2 Cinzas.....	26
4.4.3 Lipídios	26
4.4.4 Proteína bruta	26
4.4.5 Carboidratos.....	27
4.4.6 Valor calórico	27
4.4.7 pH e Acidez livre.....	27
4.5 Análise de Compostos fenólicos	28
4.5.1 Preparo do Extrato metanólico de pólen.....	28
4.5.2 Teor de Fenólicos totais.....	28
4.5.3 Teor de Flavonóides totais.....	28
4.5.4 Capacidade Antioxidante.....	29
4.6 Capacidade antimicrobiana.....	29

4.6.1	Preparo dos extratos etanólicos de pólen.....	29
4.6.2	Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Ágar.....	30
4.6.2.1	Microrganismos utilizados.....	30
4.6.2.2	Padronização das suspensões bacterianas.....	30
4.6.2.3	Análise antimicrobiana pela técnica de perfuração em ágar.....	30
4.6.2.4	Análise Estatística.....	31
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Composição físico-química das amostras de pólen.....	32
5.1.1	Umidade.....	34
5.1.2	Cinzas.....	35
5.1.3	Lipídios.....	36
5.1.4	Proteínas.....	37
5.1.5	Carboidratos.....	38
5.1.6	Valor calórico.....	39
5.1.7	pH e Acidez.....	39
5.2	Compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante.....	40
5.3	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de pólen (EEP).....	43
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas encontradas nas anteras de estames em angiospermas e representam o gametófito masculino de flores, além de ser o próprio objeto da polinização, para muitos insetos e, especialmente, para as abelhas. O pólen é a principal fonte de alimento, essencial para o crescimento normal e desenvolvimento e reprodução das colônias (KRELL, 1996; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2007; CAMPOS et al., 2008).

O pólen é rico em proteínas, que servem de matéria prima para o crescimento e restauração dos tecidos animais, contém ainda nutrientes como lipídios, esteróis, amido, açúcar, vários minerais e vitaminas. Almeida-Muradian et al. (2005) encontraram proteínas, lipídios, minerais e carotenóides totais em bolotas de pólen apícola.

Além de ser elemento fundamental para a reprodução, o pólen é um alimento apreciado por diversos grupos de insetos especialmente pelas abelhas, que acrescentam secreções salivares ricas em enzimas (ROCHA, 2013) e pequenas frações de néctar ao pólen floral, aglutina-o, dando origem ao pólen apícola (CORREIA-OLIVEIRA et al., 2008; DEVI et al., 2010).

O pólen e outros produtos de origem apícola são tradicionalmente utilizados desde muito tempo, especialmente na medicina natural, por apresentar propriedades fitoterápicas e por sua quantidade de nutrientes que possui e vem tomando espaço diante do seu potencial nutricional (MENEZES, 2009).

Para o homem, muitos benefícios são atribuídos ao consumo do pólen, como fortificante do organismo, estimulante e gerador de bem estar e vigor físico, além de corrigir a alimentação deficiente, o que resulta em equilíbrio funcional (KROYER; HEGEDUS, 2001).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 3 da Regulamentação brasileira, 19 de janeiro de 2001, o pólen de abelha é o resultado da aglutinação de pólen de flores, realizada por mel trabalhador abelhas, com néctar (e/ou mel) e substâncias salivares, e recolhidos na entrada colmeia (BRASIL, 2001).

Segundo Carpes (2008), a composição do pólen varia da espécie floral, clima, região e estação do ano. Esses fatores são de extrema importância para que o pólen apícola tenha seus valores nutricionais padrão. Cada região geográfica terá suas espécies dominantes de acordo com o clima e o solo que a região oferecer para a produção floral (HERVATIN, 2009).

A vegetação do estado do Maranhão reflete os aspectos transicionais do clima e das condições edáficas da região, apresentando desde ambientes salinos com presença de manguezais, campos inundáveis, cerrados e babaçuais, até vegetação florestal com características amazônicas (MARQUES, 2011).

A Amazônia maranhense (baixada) apresenta significativo número de agricultores familiares criadores de abelhas da espécie *Melipona fasciculata* (tiúba), onde os produtos (mel, pólen e geoprópolis) são elaborados a partir da interação vegetação/clima/solo.

O perfil do pólen coletado pela abelha tiúba da Baixada maranhense ainda está sendo estudado sob o ponto de vista das suas propriedades físico-químicas e biológicas, visto que existe diferenças no produto final quando comparado à *Apis mellífera*. Além da necessidade de qualificação para possibilidade de comercialização na indústria alimentícia.

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado devido principalmente por conta da atividade antioxidante (COSTA; JORGE, 2011) destas substâncias em sequestrar radicais livres (DORMAN et al., 2003; NEVES et al., 2009), além de apresentar propriedades antibacteriana (CARPES et al., 2008), anti-inflamatória, antifúngica e imunomodulatória (NEVES et al., 2009).

Os produtos naturais desempenham um papel altamente significativo na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças humanas. Para o combate ao câncer e às doenças infecciosas, 60% a 75% dos fármacos utilizados são originários destas matérias-primas (NEWMAN et al., 2003).

Para explorar as potencialidades da bioprospecção dos produtos provenientes das abelhas criadas na Amazônia Maranhense (baixada) é essencial que se conheça as propriedades básicas e os elementos que constituem as matérias-primas, considerando as particularidades da região.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil físico-químico e biológico em pólen coletado pela abelha tiúba (*Melipona fasciculata*) da região da Amazônia Maranhense, no intuito de determinar o valor nutricional e possível atividade antimicrobiana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A atividade apícola pode ser importante fonte de renda para muitas famílias e conta com um produto principal, o mel, um grande número de coprodutos diretos que origina, além dos serviços ambientais (KERR, 2001). No Brasil, a atividade está estruturada basicamente em torno da produção de mel, com reduzido aproveitamento dos demais produtos que diversificariam e agregariam valor à toda a cadeia produtiva (OLIVEIRA, 2002).

O aumento do consumidor consciente tem impulsionado o mercado de alimentos funcionais e favorecido a redescoberta dos produtos fornecidos pelas abelhas africanas e nativas no Brasil.

A sociedade como um todo tem buscado alternativas alimentares mais saudáveis, assim, está ocorrendo um consumo crescente por produtos orgânicos, dentre estes estão os produtos decorrentes da criação de abelhas sem ferrão (Meliponicultura) (RODRIGUES & KELLER, 2008).

2.1 As Abelhas Indígenas Sem Ferrão (*Melipona fasciculata*)

As abelhas sem ferrão, conhecidas também como abelhas indígenas ou meliponínios, são nativas de florestas tropicais como a floresta Amazônica e estocam o pólen em potes de cerume no interior da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Existem mais de 129 espécies de meliponíneos (Figura 1) descritos na Amazônia (SILVEIRA et al., 2002). As principais espécies do gênero *Melipona* são: *Melipona Crinita* (AC), *M. eburnea fuscopilosa* (AC, AM), *M. flavolineata* (PA, AC), *M. fasciculata* (PA, MA, AP), *M. lateralis*, (AM), *M. manausensis* (AM, PA), *M. melanoventer* (PA), *M. nebulosa* (AM), *M. paraensis* (AM, PA, AP), entre outras. (ASSIS, 2001; VENTURIERI et al., 2003; CARVALHO-ZILSE et al., 2005 e CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006).

Figura 1: Localização de alguns Meliponíneos no Brasil.



(KERR et al., 1996).

A criação racional de abelhas nativas e, em particular, de *Melipona fasciculata* teve início com a domesticação dessas por parte das populações indígenas do Maranhão, provavelmente, desde o período pré-colombiano (KERR, 1996). Essas abelhas, que passaram por um processo de coevolução com a floresta nativa, especializaram-se em visitar determinadas flores da vegetação que compõe a floresta amazônica maranhense, de conviver com o sombreamento da mesma e de interagirem com as condições apresentadas (SILVA, 2007).

Melipona fasciculata é uma espécie nativa que atua como um polinizador potencial nos ecossistemas naturais do Maranhão. A espécie vem sendo explorada na meliponicultura da região gerando renda para a população local, e pode chegar a ser a segunda maior fonte de renda para diversas famílias do interior do Estado (BEZERRA, 2004).

A criação de abelhas sem ferrão, atividade econômica denominada meliponicultura, apresenta aspectos de sustentabilidade bastante atrativos: possui baixo custo com manejo das colônias (FRAZÃO; SILVEIRA, 2004); não exige grandes espaços e nem muito trabalho, comparados aos da roça, pesca e criação de gado; e constitui uma atividade rentável a médio e longo prazo (VIEIRA et al., 2008).

As abelhas encontradas no Brasil merecem destaque especial pelo fato de serem pouco estudadas e também por serem responsáveis pela polinização da maioria das espécies vegetais nativas brasileiras (PIANARO, 2007).

A importância das abelhas sem ferrão para região Amazônica não é apenas pelos produtos por elas produzidos (Figura 2): mel, pólen, cerume e própolis, mas também, pela polinização (KERR et al., 2001) de 40 a 90% da flora nativa (KERR et al., 1996).



Figura 2. Caixa modular de *Melipona fasciculata* da região de São Bento-Maranhão, Brasil

(Fonte própria, 2017)

A combinação da criação de abelhas, em pequena escala, com policultivo, quintais agroflorestais, vegetação de capoeira e campo de pastagem disponibiliza recursos tróficos para as abelhas, tornando mais eficiente a polinização das flores, aumentando a produção dos frutos e sementes e gerando mais produtos, tais como: mel e pólen (DUBOIS, 1996).

Os grãos de pólen manipulados pelas abelhas nativas recebem o nome de samora nos estados do Centro-Sul e Sudeste, e de saburá ou samburá na Amazônia e no Nordeste. Os meliponíneos empregam suas mandíbulas para trabalhar o produto, assim

utilizam neste processo secreções provenientes das suas glândulas mandibulares e hipofaríngeas (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O pólen é a principal fonte de alimento não líquido especialmente para as abelhas, pois este contém todos os nutrientes essenciais para a produção de geléia real, com a qual são nutridas as larvas da rainha e jovens operárias. O pólen é a principal fonte de proteínas e lipídios para as larvas, talvez para todas as espécies de gêneros de *Apidae*, pois a quantidade de proteínas e gorduras no néctar é insignificante (MORETI, 2006).

O pólen mais estudado é o coletado pela espécie de abelha *Apis mellífera*, e ainda pouco se sabe sobre a constituição química deste. Neste sentido, é importante conhecer suas características físico-químicas e composição química, afim de tipificar o produto obtido de diferentes regiões, climas e espécies de abelhas.

2.2 Pólen apícola

O pólen apícola é um produto relativamente novo que está ganhando mercado rapidamente. A produção no Brasil teve início no final da década de 80, atualmente o mercado favorável ao consumo de produtos naturais, complementares à dieta ou com propriedades terapêuticas vem estimulando e promovendo essa modalidade da cadeia produtiva apícola (BARRETO et al., 2005).

A China, Estados Unidos, Japão e a União Europeia (Alemanha, França e Reino Unido) são os principais países importadores e consumidores de pólen apícola. A Espanha se destacava como o maior produtor mundial até o ano de 2013, seguida pela China, Austrália e Argentina. Juntos esses países apresentavam uma produção de aproximadamente 1500 toneladas por ano (ESTEVINHO et al., 2012). Segundo Valdéz (2014), atualmente entre os países que mais produzem o pólen apícola estão, a Austrália, Argentina, Brasil, China, Espanha e Vietnã.

Quanto aos aspectos mercadológicos, Petersen et al. (2011) procuraram rastrear as possíveis vias e formas de comercialização do pólen apícola na América Latina, encontrando o produto na forma desidratada, misturada com mel, produtos cosméticos e concentrados na forma de óleo essencial.

Todos os estados brasileiros produzem pólen apícola, com oscilações na produção dependendo da região do país (BARRETO et al., 2005). A produção está concentrada em dois importantes polos, Santa Catarina e Bahia, que podem chegar a

produzir entre 900 a 4.000g por colônia/mês (BARRETO et al., 2006; NEVES et al., 2009).

Na Bahia, foi inaugurada em 2009 a primeira Unidade de Processamento Oficial de Pólen Apícola em Canavieiras e no ano seguinte houve a criação da Rede Nacional de Pesquisadores e Cadeia Produtiva do Pólen Apícola (RENAPOLEN) (BARRETO, 2011).

O pólen apícola mais estudado e comercializado é proveniente da coleta das abelhas *A. mellifera*, porém, muitas abelhas sociais, como as sem ferrão também coletam e armazenam pólen (SILVA et al., 2006). Apesar do crescente consumo dos produtos das abelhas brasileiras sem ferrão, e conseqüente aumento da sua produção, pouco se sabe sobre suas propriedades nutraceuticas (SOUZA et al., 2004).

As características extrínsecas à colônia como o conhecimento técnico por parte do produtor, a flora, o calendário apícola regional e as condições climáticas favoráveis as práticas apícolas podem também influenciar na obtenção de pólen (CORNEJO, 1994; SOUZA, 2007).

2.3 Composição química e propriedades

O termo pólen se refere a estrutura reprodutiva da plantas, também conhecido por micrósporo, que produz e transporta o gameta masculino (RAVEN et al., 2007). O grão apresenta uma parede, formada por duas camadas protetoras, a exina e intina. A exina é constituída por uma substância altamente resistente denominada esporopolenina (ZETSCHKE, 1932). O produto final pode apresentar formas, cores e estruturas morfológicas diferentes de acordo com a espécie vegetal de origem (MORRE: WEBB, 1978; MIRANDA; ANDRADE, 1990; MORETI, 2002; SILVA, 2010, SILVA et al., 2012).

Possuem diâmetro entre 6 a 200µm, com formas e cores variando entre o branco, amarelo, laranja, vermelho e tons mais escuros, dependendo da sua origem botânica e da composição química dos pigmentos encontrados na exina. Alguns compostos são hidrossolúveis, representados pelos flavonóides e outros lipossolúveis como carotenóides e xantofilas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

A composição do material apícola varia de acordo com a espécie vegetal, condições ambientais, idade e estado nutricional da planta quando o saburá está se

desenvolvendo, em diferentes localidades, entre estações do ano e em diferentes anos (SZCZESNA et al., 2002).

De acordo com Marchini et al. (2006) o pólen analisado na região de Piracicaba no estado de São Paulo, apresentou a seguinte composição: proteínas (21,5%); cinzas (2,8%); umidade (23,6%); resíduo seco (76,3%); lipídios (3,5%); acidez titulável (20,7mEq kg⁻¹) e pH igual a 5,1.

O pólen apícola é considerado um alimento rico em sais minerais, como o cobre, magnésio, ferro, cloro, cálcio, iodo, zinco, enxofre, potássio, flúor, entre outros (FERREIRA, 2012).

É um produto de comercialização recente no Brasil, ainda não apresenta avaliações completas de sua qualidade nutricional, das características físico-químicas e microbiológicas, o que se mostra importante para uma possível utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica e também no meio ambiente como bioindicadores (REIS, 2001; BARRETO et al., 2006; NEVES et al., 2009).

A regulamentação brasileira preconiza que o pólen apícola para ser comercializado no Brasil deve atender os seguintes requisitos físico-químicos: umidade máxima de 30%; cinzas máximo de 4%; lipídeos, mínimo de 1,8%; proteínas, mínimo de 8%; açúcares totais de 14,5% a 55,0%; fibra bruta, mínimo de 2% e um pH de 4 a 6 e acidez livre de no máximo 300 mEq/kg. Além de apresentar aroma e cor característicos de acordo com a origem floral, os grãos devem ser heterogêneos de forma e tamanhos variados, tendendo a esféricos e o sabor deve ser característico (BRASIL, 2001).

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola diz que o pólen pode ser classificado de duas maneiras, forma original que deve conter no máximo 30% de umidade ou desidratado que é o produto submetido ao processo de desidratação em temperaturas superior a 42°C e com teor de umidade não superior a 4% (BRASIL, 2001).

A natureza química o torna um dos alimentos mais completos da natureza, com propriedades nutricionais e terapêuticas (bioativas) de interesse também na alimentação humana (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015).

2.4 Propriedades Biológicas

As substâncias antioxidantes são importantes devido à proteção exercida por esses compostos bioativos no corpo humano contra os efeitos nocivos dos radicais

livres, além disso podem retardar o progresso de muitas doenças crônicas e evitar a peroxidação lipídica.

2.4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza, com mais de 8000 detectados em plantas, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. São substâncias antioxidantes que inibem a oxidação lipídica e as espécies reativas de oxigênio (EROS), além de proteger a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), impedindo assim a formação de placas ateroscleróticas. Podem ser pigmentos, como as antocianinas, responsáveis por uma variedade de cores em hortaliças e frutas, ou outros produtos do metabolismo secundário, normalmente derivados de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos são considerados antioxidantes não somente por sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (RODRIGO et al., 2011; KAN et al., 2014; SHASHIRAKHA et al., 2015).

Os compostos fenólicos, principalmente flavonóides, são considerados como os principais ingredientes do pólen. Kroyer e Hegedus (2001) avaliaram as propriedades bioativas dos compostos fenólicos como sequestradores de radicais livres em pólen apícola e em extratos (aquoso, etanólico e metanólico). O pólen apícola apresentou 8,2 mg/g de compostos fenólicos totais que foi sensivelmente melhorada com a utilização do etanol como solvente (24,6mg/g). Embora o pólen apícola tenha apresentado considerável atividade antiradical (PI=35%, poder de inibição), essa propriedade passou para 53% no extrato etanólico.

Os vegetais são capazes de produzir substâncias antibióticas através de sua atividade metabólica secundária, estas substâncias são utilizadas como mecanismo de defesa contra ação de microrganismos (GONÇALVES et al., 2005).

2.4.2 Capacidade antioxidante

Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem, consideravelmente, a sua oxidação (THOMAS, 2000).

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana (DORMAN et al., 2003).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais). Alguns estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante dos flavonoides é maior que a das vitaminas E e C (RICE-EVANS et al., 1996).

Estudos de vários grupos de pesquisa relativas às propriedades antioxidantes de pólen apícola confirmam uma alta atividade anti-radicalar para esse produto. A atividade antioxidante do pólen tem sido correlacionada com a presença de flavonóides e de outros compostos fenólicos (DAUGUET et al., 1993; MARKHAM; CAMPOS, 1996; CAMPOS et al., 2003; ALMARAZ-ABARCA et al., 2004; ALMARAZ-ABARCA et al., 2007; CARPES et al., 2007)

Ensaio epidemiológicos têm mostrado correlação entre o aumento do consumo de compostos fenólicos com ação antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003) e a redução do risco de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (RICE-EVANS et al., 1996; COOK; SAMMAN, 1996).

A atividade antioxidante de 36 amostras de pólen apícola da região sul do Brasil, coletados nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul foi medida segundo a metodologia do sequestro do radical DPPH e comparada aos padrões comerciais BHA (Butil-hidroxianisol), BHT (Butil-hidroxitolueno) e α -tocoferol. Observou-se que os resultados foram expressivos, e exemplo do pólen do Rio Grande do Sul que mostrou atividade antioxidante superior aos padrões BHA e BHT e igual à do α -tocoferol. As amostras com alta atividade antioxidante foram as de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná (CARPES et al., 2008).

O radical DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidrazila) é muito utilizado para avaliar a capacidade sequestrante de produtos de abelhas, como o pólen, própolis e mel. Esse radical orgânico é muitas vezes adotado nas análises em função de sua rapidez e facilidade (KOLEVA et al., 2002; LU et al., 2003).

2.5 Benefícios do pólen para saúde humana

A demanda criada pelo consumidor consciente tem dado grande impulso ao mercado dos alimentos funcionais. Além de uma vida mais plena, o consumidor espera amenizar o sofrimento causado, assim como reduzir despesas com saúde (CARPES, 2008).

O pólen, o mel, o geoprópolis e outros produtos de origem apícola, são tradicionalmente utilizados na medicina natural, por apresentar propriedades fitoterápicas e por sua quantidade de nutrientes com características funcionais.

O pólen apícola apresenta substâncias bioativas que podem atuar como inibidor de tirosinase, que é enzima responsável pela síntese de melanina (ZHANG et al., 2015). Aumenta a captação de glicose, induzida por insulina, sugerindo potenciais utilizações do extrato de pólen, ou compostos derivados, contra diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (FENG et al., 2012). Além disso, desempenha importante papel no organismo, equilibrando a flora intestinal e melhorando o desempenho físico de idosos e atletas. Sendo recomendado como um suplemento dietético natural e apiterapêutico, podendo ser adicionado às refeições diariamente (RZEPECKA-STOJKO, 2012; FEÁS et al., 2012).

Além de sua utilidade como suplemento alimentício, o pólen é usado em outros setores, como na farmacologia servindo de ingrediente em produtos apifito-aromáticos (encapsulados, tinturas, óleos essenciais); cosmética: filtros solares, cremes, máscaras, batons, sabonetes, xampus; alimentos: barras de cereais, chocolates, bolachas, saladas, pastas; na atividade apícola como alimento para as abelhas em período de estiagem; no monitoramento da poluição ambiental (CASTRO et al., 2002; BARRETO et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar as características físico-químicas e antimicrobiana do pólen coletado pela abelha *Melípona fasciculata* da vegetação da Amazônia Maranhense.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil físico-químico das amostras de pólen e seu valor calórico;
- Quantificar os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais nas amostras de pólen;
- Avaliar as propriedades antioxidantes dos extratos de pólen de tiúba pelo método de sequestro de DPPH;
- Testar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de pólen de tiúba contra microrganismos patogênicos;

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo e local da pesquisa

O presente trabalho consistiu em um estudo experimental descritivo, realizado no Laboratório do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão – UFMA em parceria com a Faculdade Estácio São Luís.

4.2 Descrição da área de coleta

A Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense (APABM) está localizada na Amazônia Legal Maranhense com extensão de 1.755.035,6 ha (BRASIL, 1991). Apresenta influência dos ambientes costeiros e marinhos, com terras planas e de baixa altitude, matas de galeria, rios perenes e bacias lacustres (PINHEIRO, 2013). O clima da região é tropical semiúmido, com temperatura média anual de 26°C e índice pluviométrico variando de 1000 a 2000 mm, com predomínio de chuvas nos meses de Janeiro a Julho. O solo é do tipo hidromórfico, sendo periodicamente inundado, formando campos aluviais e assemelhando-se a um imenso lençol de água doce, chamado de “Pantanal Maranhense” (FEITOSA; TROVÃO, 2006).

A região ecológica da Baixada Maranhense está localizada à oeste da Ilha de São Luís, no norte do Estado do Maranhão (1°59' – 4°00' S e 44°21' – 45°33' W). É formada pelas bacias hidrográficas dos rios Mearim, Pindaré, Pericumã, Aurá e Turiaçu que anualmente transbordam e inundam as planícies baixas da região (Figura 3).

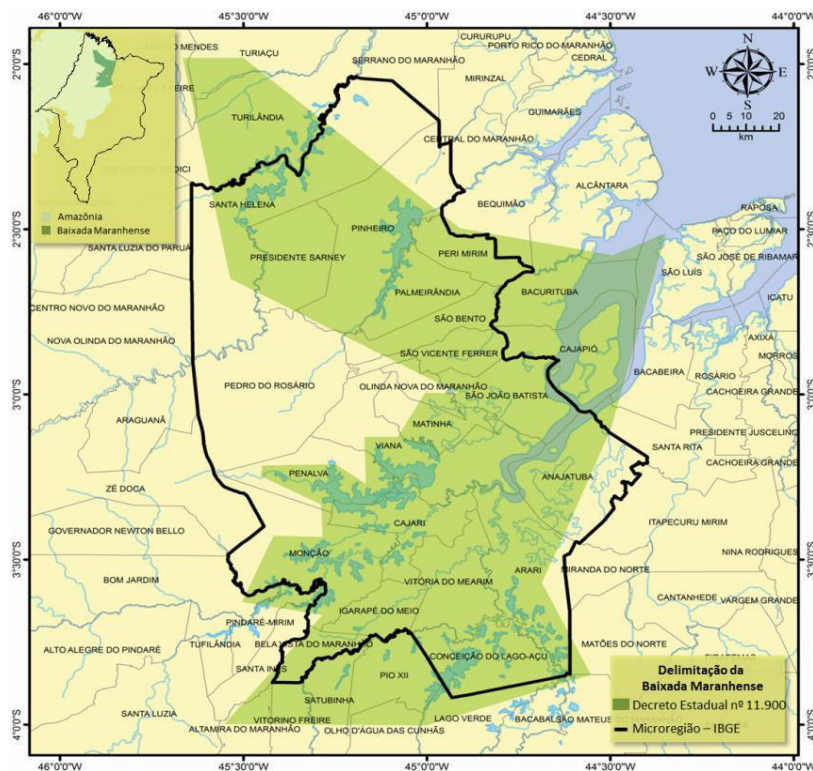


Figura 3. Localização da Baixada Maranhense, segundo IBGE.

4.3 Obtenção das amostras

A coleta das amostras de pólen foi realizada nos meliponários localizados nas cidades de São Bento (5 amostras), Palmeirândia (3 amostras), São Vicente de Ferrer (1 amostra), Bequimão (1 amostra) e Perimirim (1 amostra) (Quadro 1) nos anos de 2014 a 2016, obedecendo ao período de extração, que vai de junho a novembro. As massas de saburá foram coletadas diretamente dos meliponários e obtidas com os cuidados microbiológicos, sendo colocadas em sacos plásticos estéreis, e conduzidas ao laboratório, onde foram mantidas em congelador (- 20 °C) até o momento dos experimentos.

As análises de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos, pH e acidez foram feitas segundo Instituto Adolf Lutz (2005).

As determinações das análises físico-químicas foram realizadas em triplicata. Os ensaios foram realizados no laboratório de Bromatologia da Faculdade Estácio São Luís e no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) - UFMA.

Quadro 1: Identificação das amostras e descrição da origem do pólen coletado pela *Melipona fasciculata*.

AMOSTRAS	CIDADE
M1	SÃO BENTO
M2	SÃO BENTO
M3	SÃO BENTO
M4	SÃO BENTO
M5	SÃO VICENTE DE FERRER
M6	BEQUIMÃO
M7	PALMEIRÂNDIA
M8	PALMEIRÂNDIA
M9	PERIMIRIM
M10	SÃO BENTO
M11	PALMEIRÂNDIA

4.4 Análises físico-químicas

4.4.1 Umidade

Para a análise, foram pesadas 2g da amostra em cápsula de porcelana (previamente lavadas com água destilada e aquecidas em estufa a 105°C, durante uma hora sendo acondicionadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente). As cápsulas foram pesadas em balança analítica para aferição exata da massa da amostra. O conjunto cápsula e amostra foi então levado à estufa a 105°C onde permaneceu por quatro horas, em seguida foram conduzidas ao dessecador onde permaneceram até alcançarem temperatura ambiente e serem pesadas. O valor da umidade é expresso pela seguinte Equação (1).

$$100 \times N/m = \text{umidade\% a } 105 \text{ C, onde:}$$

N = perda de peso em gramas da amostra;

m = massa da amostra em gramas.

4.4.2 Cinzas

Duas gramas de pólen foram colocados em cadinhos de porcelana, realizada a carbonização em bico de bunsen e incinerados em mufla a 600 °C, por aproximadamente quatro horas, até obtenção de cinzas brancas. Após, foi resfriado em dessecador e pesadas novamente até peso constante. O resultado final foi obtido por diferenças de pesagens (método de gravimetria) entre a massa da amostra antes e após entrada na mufla. O valor da umidade é expresso pela seguinte Equação (2).

$$100 \times N/m = \text{cinzas\% a } 600 \text{ }^\circ\text{C, onde:}$$

N = massa em gramas da cinza;

m = massa da amostra em gramas.

4.4.3 Lipídios

Os lipídeos totais foram determinados pelo método de gravimetria. Foram colocados 2g de pólen moídos e extraídos com hexano à quente, em aparelho Soxhlet, por aproximadamente quatro horas. O valor da umidade é expresso pela seguinte Equação (3).

$$100 \times N/m = \text{lipídios\%, onde:}$$

N = massa em gramas da lipídio;

m = massa da amostra em gramas.

4.4.4 Proteína Bruta

As proteínas foram determinadas, utilizando o método Kjeldahl, pesando 0,1g de cada amostra de pólen, sendo digeridas em balão micro Kjeldahl com 1g de mistura catalítica (1:3 de CuSO_4 e K_2SO_4) e 2mL de H_2SO_4 concentrado e levadas ao digestor a uma temperatura de 350°C, por 2 horas ou até que surgiu a coloração verde translúcida. Posteriormente, com as amostras resfriadas, levou-as ao Destilador de Nitrogênio. A essa solução foi adicionada 15 mL de NaOH (40%) para liberação da amônia, e esta coletada dentro de um erlenmayer com 20 mL de um indicador misto (azul de metileno e vermelho de metila) e ácido clorídrico 0,02mol/L.

Após a destilação, foi feita a titulação com uma solução padronizada de NaOH 0,02mol/L com fator de correção de 0,95. Para determinar as proteínas totais, foram feitos os seguintes cálculos (Eq. 4):

$$\text{Constante} = N \times F \times 14 \times 100;$$

$$\%N = (VT - VB) \times \text{constante} / P_{\text{amostra}};$$

$$PB = \% N \times 6,25.$$

4.4.5 Carboidratos

Foi calculado subtraindo-se os valores de porcentagem de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas por 100%.

4.4.6 Valor Calórico

Para determinação do valor calórico, os valores de carboidratos, proteínas e lipídios foram multiplicados pelo fatores de conversão de grama em quilocalorias (kcal) 4, 4 e 9, respectivamente.

$$\text{Valor calórico (kcal/ 100g)} = (P \times 4) + (L \times 9) + (C \times 4) \text{ Eq. (5)}$$

Onde:

P = valor da proteína (%)

L = valor de lipídios (%)

C = valor de carboidratos (%)

4.4.7 pH e Acidez livre (mEq/kg)

Pesou-se 2,0 gramas de pólen de cada amostra, sendo diluídas em 50 mL de água destilada. Com auxílio de pHmetro previamente calibrado utilizando soluções tampão certificadas com pH 4,00 e 7,00, realizou-se a leitura direta do pH da amostra diluída. A acidez livre foi determinada a partir do método de titulação potenciométrica com solução de NaOH 0,05 mol/L padronizada. A acidez total é determinada pela seguinte Equação (6).

$$\text{mL de NaOH 0,05 N \%} = V \times f \times 10/m, \text{ onde:}$$

V = volume em mL gasto na titulação

f = fator de correção da solução de NaOH 0,1N

m = massa da amostra em gramas

4.5 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.5.1 Preparo do Extrato Metanólico de Pólen

O preparo dos extratos metanólicos das amostras de pólen apícola foram de acordo com a metodologia proposta por Carpes (2008). As amostras de pólen (2 g) foram trituradas, homogeneizadas extraídas com 15 mL de metanol a 60%. A extração foi feita a 50 °C, em banho de água termostaticado, por 30 min sob agitação constante. Após essa etapa as amostras foram centrifugadas a 7000x por 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio com tampa de rosca e armazenados a 5°C em freezer.

4.5.2 Teor de Fenólicos totais

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

4.5.3 Teor de Flavonoides totais

A determinação de teores de flavonoides totais foi realizado a partir do extrato metanólico de pólen baseado no método proposto por Park et al. (1995) sendo o cloreto de alumínio e o álcool metanólico os agentes modificadores do método. Para as análises foi realizada uma mistura em triplicata de 2 mL da solução do extrato de pólen e 2 mL de AlCl₃ a 2%. Após repouso de 40min à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da solução em espectrofotômetro a 415 nm de absorbância. Foi utilizado a catequina

como padrão para a construção da curva analítica, sendo o teor de flavonoides expresso em termos de concentração de catequina (mg / g).

4.5.4 Capacidade Antioxidante

Para a verificar a atividade antioxidante presente nos extratos de pólen, foi realizada análise da capacidade sequestrante do radical DPPH, adotando-se a metodologia de Brand-Williams et al. (1995) e modificado por Rufino et al. (2007). Preparou-se uma solução de DPPH na concentração 0,1mmol em álcool metílico absoluto PA, adicionara-se 3,7 ml dessa solução em tubos de ensaio contendo 0,3 ml do extrato de cada amostra. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517nm, após 90 minutos. Utilizou-se como branco álcool metílico absoluto PA. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a Equação 1 de Mensor et al. (2001):

$$\%AA = 100 - \{[(Absamostra - Absbranco) X 100] / Abscontrole\},$$

Aa = absorbância da amostra;

Ab = absorbância do branco;

Ac = absorbância do controle.

4.6 Capacidade antimicrobiana

4.6.1 Preparo dos Extratos Etanólicos de Pólen (EEP)

Duas gramas de pólen apícola foram extraídos com 15 mL de etanol (70% v/v) em banho-maria a 70°C, por 30 min. conforme descrito por Carpes et al. (2008). Após a filtragem em papel de filtro Whatman nº 5, os sobrenadantes (EEP) foram armazenados a -5°C, em tubos de ensaio com rosca, para posterior avaliação da atividade antimicrobiana.

4.6.2 Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Ágar

4.6.2.1 Microrganismos utilizados

As amostras utilizadas foram disponibilizadas pela Faculdade Estácio São Luís. Foram avaliadas amostras ATCC padrão de bactérias e fungos entre elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 22933, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400.

4.6.2.2 Padronização das suspensões bacterianas

Os micro-organismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia®) em estufa à 37°C por 24 horas para bactérias. Posteriormente, as amostras foram cultivadas em placas de Ágar Nutriente (Micromed®) a 37°C sob o mesmo tempo de incubação relatado anteriormente. Colônias isoladas foram então ressuspensas em 3 mL de solução fisiológica NaCl 0,89% estéril até atingir uma turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bact/mL).

4.6.2.3 Análise antimicrobiana pela técnica de perfuração em ágar

O potencial antimicrobiano dos EEP foram avaliados pela técnica de perfuração em meio Müller Hinton (Merk®). O meio foi perfurado com cilindros de (6mm) e em seguida foram colocados nos poços 50 µL (133,33 mg/mL) dos produtos a serem testados, do controle positivo (clorexidina 4% m/v) e controle negativo (etanol 70%). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas para amostras bacterianas e fúngicas até 48 horas. Após incubação, com o auxílio de uma régua realizou-se medições correspondentes à média de três medidas diametralmente oposta ao halo de inibição do crescimento quando presente, com realizações dos testes em triplicata (OSTROSKY et al., 2008). Foram utilizados como controle positivo de bactérias (BRASIL, 2003).

4.6.2.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como variação mínima e máxima e média \pm erro padrão das médias, comparando os valores da composição físico-química com a legislação brasileira para produtos apícolas. Utilizaram-se tabelas para descrever os dados encontrados nos experimentos dos compostos fenólicos e atividade antimicrobiana.

5 RESULTADOS

5.1 Composição físico-química das amostras de pólen

O conhecimento da composição nutricional do pólen de tiúba pode ser aplicado ao controle de qualidade e certificação para comercialização. Esse alimento, além de compostos fenólicos e flavonoides, possui em sua composição água, minerais, lipídeos, proteínas e glicídios. As mensurações de pH e acidez total são indicadores de crescimento microbiológico e consequente deterioração desse insumo.

Os resultados das análises físico-químicas de cada amostra (n=11) estão descritos na Tabela 1. Para fins comparativos, consta na tabela os valores preconizados pela legislação brasileira para pólen apícola, foi verificado que as particularidades do pólen de tiúba em conjunto com características edafoclimáticas coloca o produto alimentício em um patamar singular e demonstra a necessidade de uma legislação regional para controle de qualidade do mesmo.

Tabela 1. Composição físico-químico das amostras de pólen coletado pela *Melipona fasciculata* na região da Amazônia Maranhense.

AMOSTRA	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Valor calórico (kcal/100g)	pH	Acidez total (meq/kg)
M1	34,52±0,66	2,38±0,06	3,57±0,01	20,24±0,37	39,28±0,97	270,24±2,48	3,57±0,06	130,05±0,26
M2	34,52±0,66	2,38±0,06	3,57±0,01	21,46±1,01	38,06±1,56	270,24±2,48	3,77±0,06	64,19±0,00
M3	37,25±0,92	1,47±0,20	2,62±0,12	27,99±0,38	30,66±1,17	258,22±2,64	3,63±0,06	132,30±0,00
M4	36,19±0,22	2,28±0,06	2,44±0,60	24,18±1,17	34,91±1,23	258,29±4,03	3,73±0,06	122,50±0,00
M5	35,49±0,58	1,43±0,14	4,36±0,10	25,78±0,96	32,95±0,43	274,10±1,40	3,57±0,06	159,25±0,00
M6	34,84±1,47	2,14±0,12	2,31±0,13	24,23±0,46	36,49±1,64	263,64±6,09	3,73±0,06	100,78±0,57
M7	32,92±1,29	1,38±0,07	2,80±0,00	28,87±0,00	34,03±1,34	276,80±5,34	3,63±0,06	149,29±0,28
M8	38,65±0,60	2,10±0,07	2,09±0,18	13,91±0,00	43,25±0,43	247,48±2,86	3,63±0,06	149,29±0,28
M9	37,65±0,39	2,03±0,19	2,66±0,49	22,33±0,73	35,33±1,70	254,55±0,94	3,60±0,00	147,00±0,00
M10	34,50±0,36	2,14±0,06	2,70±0,00	24,67±0,00	35,98±0,30	266,91±1,21	3,70±0,00	122,50±0,00
M11	38,16±0,22	2,50±0,03	5,46±0,00	24,46±0,99	29,43±0,83	264,67±0,76	3,80±0,00	161,70±0,00
Mínimo	32,92±1,29	1,38±0,07	2,09±0,18	13,91±0,00	29,43±0,83	247,48±2,86	3,57±0,06	64,19±0,00
Máximo	38,65±0,60	2,50±0,03	5,46±0,00	28,87±0,00	43,25±0,43	276,80±5,34	3,80±0,00	161,70±0,00
Média ±DP	35,88±1,83	2,02±0,41	3,14±1,02	23,47±4,07	35,49±3,89	264,11±8,84	3,63±0,08	132,30±28,62
Legislação brasileira	Máximo 30%	Máximo 4%	Mínimo 1,8%	Mínimo 8%	14,5 - 55%	-	4 a 6	Máximo 300 mEq/kg

5.1.1 Umidade

A umidade é um parâmetro de grande relevância na avaliação do pólen apícola ou de qualquer outro tipo de alimento, pois está relacionada à sua conservação podendo comprometer a qualidade final do produto reduzindo sua vida útil, pois teores elevados de umidade deixam o alimento passível à deterioração microbiana. Sattler (2013) relata que o valor de umidade no pólen apícola pode variar tanto de acordo com características regionais e ambientais quanto, pelos métodos utilizados para sua determinação.

Os teores de umidade, das amostras analisadas neste estudo, variaram de $32,92 \pm 1,29$ a $38,65 \pm 0,60$, com a média de $35,88 \pm 1,83$. O pólen apícola fresco possui uma composição média de umidade de 20 a 30%. Este alto índice de teor de água é ideal para o crescimento microbiológico, devendo-se tomar medidas para que não ocorra contaminação e mantenha-se a qualidade da matéria-prima (BOGDANOV, 2004).

Modro et al. (2007) estudando pólen apícola no estado de Minas Gerais encontraram valores de umidade variando entre 25,57 e 40,44%. Vit e Santiago (2008), estudando a composição de pólen fresco coletado nos Andes Venezuelanos constaram umidade média variando de 13,24 a 17,93%.

Marchini (2006) Thomasi (2010) e Rocha (2013) estudando pólen de *Apis* em, São Paulo, Santa Catarina e Trás-os-Montes em Portugal, acharam o teor de umidade de 15,1%, 23,6% e variação de 15 a 17%, respectivamente.

O percentual médio de umidade encontrado nas amostras de pólen fresco no trabalho realizado em áreas urbanas de Manaus por Rebelo (2010) apresentou médias de $53,39\% \pm 0,50$ e $37,12\% \pm 0,60$ para abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta*, respectivamente.

Ferreira (2012) estudando o pólen de *Melipona scutellaris Latreille* da região de Camaçari-BA encontrou para teor de umidade uma média de 51,73% para o pólen in natura.

Barreto et al. (2012) ao avaliar a umidade do pólen de abelhas africanizadas proveniente de sete diferentes municípios da região do Vale do Paraíba, estado de São Paulo, encontrou variação entre 18,8 a 32,6, com média de 26,0%.

É conveniente a realização da desidratação do pólen apícola e no Brasil existe regulamento específico que apresenta qual deve ser o valor máximo de umidade do produto in natura, desidratado e a que temperatura deve ser feito processo tecnológico, contudo a maioria dos meliponicultores da Baixada maranhense pertencem a classe de

agricultores familiares, e atividade apresenta-se em alguns casos apenas como complemento da renda ou herança familiar.

No momento da visita técnica aos criadores de abelha tíuba foi observado que alguns utilizavam da técnica de secagem natural no pólen coletado para diminuição dos teores de umidade, visto que o alimento possui um grande potencial fermentativo. Em outros casos os criadores acabavam por congelar o material retirado das colmeias.

A pesquisa demonstrou que todas as amostras estão acima do preconizado pela legislação brasileira de produtos apícolas, o que dificulta a certificação do pólen e sua utilização na alimentação humana, já que o mesmo possui alta higroscopicidade gerado pelas condições ambientais.

5.1.2 Cinzas

O índice de cinzas é um forte indicativo da presença de sujidades provenientes de contaminantes inorgânicos, tais como terra, areia, fuligem ou metais que acidentalmente possam ter soltado de partes enferrujadas pertencentes às colmeias (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2012).

O Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001) preconiza o máximo de 4% de cinzas, para pólen apícola, portanto o pólen analisado neste trabalho atende a esta legislação.

O conteúdo total de cinzas variou, nas amostras analisadas, de $1,38 \pm 0,07$ a $2,50 \pm 0,03$, com média de $2,02 \pm 0,41$, atendendo ao limite máximo da legislação (4%). Os valores apresentaram semelhança aos estudos conduzidos por Almeida-Muradian et al. (2005), Arruda et al. (2013), Carpes et al. (2009) e Melo et al. (2010) descritos a seguir respectivamente: 2,4%; 3,0%; 2,9% e 3,1%.

Souza et al. (2004) encontraram a média de 2,1% em pólen de meliponínios no Amazonas. Carpes et al. (2009) encontraram um percentual médio de 2,9% em pólen de *A. mellifera* na região sul do Brasil. Em estudo realizado por Modro et al. (2007), encontraram o percentual de 2,1% de cinzas no pólen coletado por *A. mellifera* em uma região de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais.

No estudo de Barreto et al. (2012) com pólen do estado de São Paulo no parâmetro de cinzas encontrou variação de 1,9 a 2,4, com média de 2,1% (m/m), semelhante ao presente estudo.

Ferreira (2012) estudando o pólen de *Melipona scutellaris Latreille* da região de Camaçari-BA encontrou para teor de cinzas uma média de 2,40% para o pólen in natura.

O conteúdo de cinzas também está relacionado à origem botânica ao solo da região e a capacidade do vegetal em armazenar minerais (BONVEHI; JORDÀ, 1997).

Os minerais são elementos inorgânicos amplamente distribuídos na natureza e que, no organismo, desempenham uma variedade expressiva de funções metabólicas que incluem ativação, regulação, transmissão e controle (LOBO; TRAMONTE, 2004). Nessa perspectiva, o pólen aparece como um alimento rico em minerais e a composição mineral também sofre influência das condições ambientais, inclusive existem poucos estudos na determinação de minerais em pólen de abelha sem ferrão.

5.1.3 Lipídios

Os valores de lipídios assim como de outros nutrientes presentes no pólen apícola podem apresentar variações que estão relacionadas especialmente a origem botânica da planta (ESTEVINHO et al., 2012), condições ambientais e climáticas (LEJA et al., 2007)

O conteúdo total de lipídios variou, nas amostras analisadas, de $2,09 \pm 0,18$ a $5,46 \pm 0,00$, com média de $3,14 \pm 1,02$, atendendo ao limite máximo da legislação vigente.

Os valores de lipídios, encontrado nas amostras de pólen analisadas neste trabalho, está de acordo com o recomendado pelo Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001), que estabelece o percentual mínimo de 1,8%, mas nenhum limite máximo para lipídios de pólen apícola.

O percentual médio de lipídios encontrado nas amostras de pólen fresco no trabalho realizado em áreas urbanas de Manaus por Rebelo (2010) apresentou médias de 6,47% e 10,8% para abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta*, respectivamente.

Estes valores são relativamente altos, quando comparados com os resultados de Souza et al. (2004), que analisaram o conteúdo de lipídios do pólen coletado por estas mesmas abelhas, obtendo média de 4,0%, e de Marchini et al. (2006) que analisaram o pólen de abelhas do gênero *Apis mellifera* (3,6%), ambos os autores utilizaram o método Soxhlet.

Barreto et al. (2012) ao avaliar a qualidade físico-química do pólen apícola proveniente de sete diferentes municípios da região do Vale do Paraíba, estado de São Paulo, encontraram variação de 2,2 a 7,1, com média de 3,7%.

Pinto et al., (2012) estudando o perfil físico-químico do pólen apícola produzido em Taubaté, Vale do Paraíba, sudeste do Brasil definiu a concentração de lipídeo no pólen in natura variando de 0,9 a 5,8% com média de 2,8%.

Ferreira (2012) estudando o pólen de *Melipona scutellaris Latreille* da região de Camaçari-BA encontrou para teor de lipídios uma média de 2,50% para o pólen in natura.

Barreto (2004) reporta que teores de lipídios inferiores aos estipulados pela legislação vigente pode sinalizar a degradação dos lipídios presente no pólen apícola, principalmente se os meliponicultores realizarem algum tipo de secagem natural como é visto em alguns municípios da Baixada maranhense.

5.1.4 Proteínas

O teor de proteína no pólen apícola assim como os demais nutrientes está relacionado à sua origem floral (CORONEL et al., 2004). Pesquisas relatam que depois dos carboidratos as proteínas formam o grupo de nutrientes mais representativos no pólen apícola.

Os teores proteicos encontrados neste trabalho variaram de $13,91 \pm 0,00$ a $28,87 \pm 0,00$, com média de $23,47 \pm 4,07$. Valores semelhantes foram encontrados por Arruda et al. (2013) que obtiveram média de $23,38 \pm 1,24\%$ para proteína bruta de sete amostras de pólen apícola coletados na região de Pariquera-Açu, (SP), entretanto Barreto et al. (2012) ao avaliar a qualidade físico-química do pólen apícola proveniente de sete diferentes municípios da região do Vale do Paraíba, estado de São Paulo, encontraram variação de 9,3 a 21,8% para proteína bruta.

Um aspecto a ser considerado em relação às análises de proteínas de pólen pelo método de Kjeldahl, é a falta de padronização dos fatores utilizados para conversão do conteúdo de nitrogênio em proteína, que não é definido pelo Regulamento atual (BRASIL, 2001). Autores como Souza et al. (2004), Modro et al. (2007), Vit e Santiago (2008) utilizaram o fator 6,25 e obtiveram respectivamente o percentual médio de 19,5%, 26,2% e 24,17 a 52,56% de proteínas em amostras de pólen coletado por abelhas.

Pinto et al., (2012) estudando o perfil físico-químico do pólen apícola produzido em Taubaté, Vale do Paraíba, sudeste do Brasil encontrou valores de proteína em pólen apícola *in natura* que variaram entre 3.9 a 17.1% com valor médio de 13.02%

Ferreira (2012) estudando o pólen de *Melipona scutellaris Latreille* da região de Camaçari-BA encontrou para teor de proteína uma média de 19,67% para o pólen in natura. Após secagem, 34,32% para o pólen liofilizado, 32,89% para o pólen desidratado via corrente de ar frio e 33,47% para o pólen desidratado via refrigerador *frost-free*.

É importante enfatizar que fatores ambientais, geográficos, coleta, manipulação, acondicionamento (ORZÁEZ VILLANUEVA et al., 2002), ou ainda variações naturais que existe na composição de cada espécie de planta, podem provocar variações no teor deste nutriente. Almeida-Muradian et al. (2005) explica que diferenças na composição nutricional podem ocorrer entre plantas das mesma espécies que são submetidas a condições ambientais distintas.

Os resultados elevados de proteína bruta evidencia o produto como uma importante fonte proteica que pode ser utilizada na alimentação da população brasileira e no combate a enfermidades.

5.1.5 Carboidratos

Os teores de carboidratos, das amostras analisadas neste estudo, variaram de $29,43 \pm 0,83$ a $43,25 \pm 0,43$, com a média de $35,49 \pm 3,89$, demonstrando que todas as amostras estão dentro do preconizado pela legislação brasileira.

O Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001) estabelece apenas o conteúdo de açúcares totais, que deve ser de no máximo 55%.

Souza et al. (2004) encontraram percentual médio de 37,5% de carboidratos em pólen de meliponíneos.

Grande parte dos carboidratos constituintes no pólen apícola se deve ao néctar e o mel, os quais são misturados pelas abelhas para formarem os grãos. Este valor encontrou-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, o que é justificado pela diversificação das espécies florais da região, visto que é o fator de maior influência para a qualidade e composição química do pólen de tíuba

5.1.6 Valor calórico

O cálculo simplificado do valor energético de um alimento depende do percentual de macronutrientes que este apresenta. Os carboidratos e as proteínas fornecem quatro calorias/grama, enquanto os lipídios fornecem nove calorias/grama.

Os valores de calorias, das amostras analisadas neste estudo, variaram de $247,48 \pm 2,86$ a $276,80 \pm 5,34$ kcal, com a média de $264,11 \pm 8,84$ kcal para 100g do pólen de tiúba.

O percentual médio de lipídios encontrado nas amostras de pólen fresco no trabalho realizado em áreas urbanas de Manaus por Rebelo (2010) apresentou medias de 311,3 kcal/100g e 310,7 kcal/100g para abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta*, respectivamente.

Souza et al. (2004) encontraram valores diferentes em amostras de pólen coletado por abelhas sem ferrão do mesmo gênero das abelhas aqui estudadas, também no estado do Amazonas, que apresentaram média de 264,4 kcal por 100 g de pólen.

Considerando que uma porção de 25 g de pólen de tiúba fornece de 66,02 kcal, ou seja, supre cerca de 3,3% da necessidade diária de um indivíduo adulto (considerando-se a dieta de 2.000 kcal), demonstrando o baixo valor calórico do alimento quando comparado ao pólen da abelha africanizada e servindo de alimento substituto em várias dietas para perda de peso.

5.1.7 pH e Acidez Total

A medida de pH ou potencial hidrogeniônico é um parâmetro de grande relevância em análise de alimentos, pois exerce influência sobre o desenvolvimento microbiano, estando associado ao processo de deterioração dos alimentos (FIORDA; SIRQUEIRA, 2009).

O índice de acidez é um indicativo do frescor da amostra (BARRETO, 2004), que no presente estudo indica um pólen recém coletado e processado.

Os teores de pH, das amostras analisadas neste estudo, variaram de $3,57 \pm 0,06$ a $3,80 \pm 0,00$, com a média de $3,63 \pm 0,08$. Para acidez os valores tiveram uma variação de $64,19 \pm 0,00$ a $161,70 \pm 0,00$ mEq/kg, com média de $132,30 \pm 28,62$ mEq/kg. Esses valores de pH e acidez evidenciam uma substância ácida gerada da fermentação que ocorre dentro da favos como forma de maturação.

O percentual médio de pH encontrado nas amostras de pólen fresco no trabalho realizado em áreas urbanas de Manaus por Rebelo (2010) apresentou medias de 3,7 e 3,34 para abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta*, respectivamente.

Marchini et al. (2006) estudando pólen de *A. mellifera* obtiveram média de 5,1, com valor mínimo de 4,8 e máximo de 5,3, entre os meses de março de 1999 a março de 2000. Bastos et al. (2003) constataram valores de pH mais próximos ao encontrado no presente trabalho, variando entre 3,7 e 5,5.

Em estudo conduzido por Barreto et al. (2012) com pólen apícola do estado de São Paulo foi observado valores para pH de 4,0 a 5,5, com média de 4,8 e acidez de 100 a 160, com média de 135,0 mEq/kg, esses encontram-se também dentro das conformidades preconizadas pela legislação atual.

No estudo de Barreto et al. (2012) com pólen do estado de São Paulo no parâmetro de pH de 4,8 a 5,6, com média de 5,3 e acidez de 120 a 185 mEq/kg, com média de 156,4 mEq/kg, encontram-se dentro dos parâmetros preconizados pela legislação brasileira.

O pólen sofre alterações químicas desde sua retirada da flor até a maturação do produto dentro da colmeia diminuindo seu pH de aproximadamente 7.2 para 3.5-4.2 dentro da colmeia (ISIDOROV et al., 2009), portanto o pH do pólen apícola sofre alterações frente a fatores bióticos e abióticos (PERNAL; CURRIE, 2000).

Considerando-se que produtos mais ácidos são naturalmente mais estáveis quanto à deterioração (SOUZA, 2010), pode-se entender que a elevada acidez seja proveniente dos processos fermentativos ocorridos na preparação e conservação do pólen de tiúba.

5.2 Compostos Fenólicos, Flavonoides e Atividade Antioxidante

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana (DORMAN et al., 2003). As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais).

Na Tabela 2 são apresentados os teores de fenólicos totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante das amostras do pólen coletado pela abelha tíuba.

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante do pólen coletado pela tíuba.

AMOSTRA	Fenólicos Totais (mg GAE*/g \pm SD)	Flavonoides totais (mg Catequina/g \pm SD)	DPPH (%)
M1	10,37 \pm 0,51	0,97 \pm 0,07	93,48 \pm 0,94
M2	14,17 \pm 0,91	1,28 \pm 0,05	91,03 \pm 0,78
M3	11,03 \pm 0,76	1,10 \pm 0,20	94,19 \pm 0,32
M4	10,60 \pm 0,10	0,92 \pm 0,05	93,88 \pm 0,21
M5	21,90 \pm 0,26	2,56 \pm 0,04	94,32 \pm 0,20
M6	15,80 \pm 0,72	1,42 \pm 0,02	93,68 \pm 0,29
M7	12,70 \pm 0,61	1,21 \pm 0,03	93,31 \pm 0,44
M8	22,37 \pm 1,29	2,24 \pm 0,06	94,76 \pm 0,31
M9	10,13 \pm 0,55	1,34 \pm 0,12	92,14 \pm 0,12
M10	12,80 \pm 0,56	1,34 \pm 0,02	94,42 \pm 0,10
M11	18,53 \pm 0,84	2,30 \pm 0,20	93,65 \pm 0,45
Valor mínimo	10,37 \pm 0,51	0,92 \pm 0,05	91,03 \pm 0,78
Valor máximo	22,37 \pm 1,29	2,56 \pm 0,04	94,76 \pm 0,31

O resultado de fenólicos totais apresentou valor mínimo de 10,37 \pm 0,51 mg AGE/10g e máximo de 22,37 \pm 1,29 mg GAE/g. Os compostos fenólicos são o grupo de fotoquímicos mais significativos no pólen apícola (MENEZES, 2009), sendo a eles atribuída sua ação terapêutica.

Nogueira et al. (2012) encontrou valores de fenóis totais variaram entre 16,07 e 45,95 mg AGE/g. Freire et al.(2012) avaliando amostras de pólen proveniente da região de Canavieira-Ba, encontrou valores oscilando entre 41,50 a 213,20 mg AGE/g de pólen.

Valor médio diferente foi encontrado por Carpes (2009) para 36 amostras de pólen apícola desidratado de diferentes localidades da região Sul do Brasil, com um teor médio de 30,77 mg em GAE.g-1 de pólen, entretanto houve uma variação menor (19,28 a 48,90 mg GAE.g-1 de pólen).

Kroyer e Hegedeus (2001) obteve concentração média de 24,6 mg/g de compostos fenólicos em pólen de *Apis* proveniente de Amsterdam, Holanda.

Os teores de flavonoides totais oscilaram com valor médio de $0,92 \pm 0,05$ e valor máximo de $2,56 \pm 0,04$ expressos em miligramas de catequina/g de pólen de tíuba coletados pela *Melipona fasciculata*.

Neves et al. (2009) observou as seguintes variações 4,68 a 6,87 mg quecetina/g em amostras de pólen apícola proveniente de diferentes estados do Brasil.

Menezes (2009) estudando pólen de abelhas africanizadas encontrou teores de flavonoides totais expressos em miligramas de epicatequina/g de polen apícola variando de 0,72 a 1,99 mg.g-1, com média de $1,10 \pm 0,03$ mg.g-1 de pólen.

O pólen das plantas contém uma importante quantidade de flavonóis glicosídicos, que estão localizados na superfície da exina. As secreções das glândulas hipofaríngeas das abelhas hidrolisam os flavonóides heterosídeos a agliconas livres, aumentando a possível atividade biológica do pólen (BONVEHÍ et al., 2001).

Os flavonóides podem ser utilizados na determinação da origem botânica do pólen apícola (TOMÁS-LORENTE *et al.*, 1992), porém, segundo Almaráz-Abarca et al. (2004), o perfil de compostos fenólicos das amostras de pólen apícola é mais importante que o de conteúdo de flavonóides na avaliação da ação antioxidante desses polens.

O resultado da capacidade antioxidante, obtido pelo método de DPPH apresentou valor mínimo $91,03 \pm 0,78$ % e máximo de $94,76 \pm 0,31$ %, demonstrando a possibilidade do pólen da abelha tíuba ser considerado um alimento funcional e grande aliado no combate a doenças crônicas e envelhecimento celular.

No estudo conduzido por Menezes (2009), a neutralização do radical DPPH variou de 37,94 a 91,81% nas amostras com ocorrência do tipo polínico *Mimosa pudica* e de 78,96 a 93,21% nas amostras com ocorrência do tipo polínico *Eucalyptus*, com uma média de $83,3 \pm 1,44$ % e de $88,66 \pm 0,60$ %, respectivamente, para *Mimosa pudica* e *Eucalyptus*.

Carpes et al (2009) encontraram atividade antioxidante nos extratos de pólen mensurada pelo método do DPPH que variou de 30,54 a 94,73%, com uma média de $73,44 \pm 21,10$ %.

As condições ambientais da Amazônia maranhense tornam o pólen coletado pela abelha *Melipona fasciculata* um produto imprescindível no plano alimentar da população brasileira.

5.3 Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de pólen (EEP)

A atividade antimicrobiana pode estar relacionada a ação de compostos fenólicos, que atuam na inativação de enzimas, promovendo alterações na permeabilidade das membranas e perda de material celular, ou ainda, na inativação ou destruição do material genético. Quanto maior o grau de hidroxilação dos compostos, maior seria a sua toxicidade (ALMEIDA, 2007).

O pólen apícola possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram negativas (MORAIS *et al.*, 2011, NOGUEIRA *et al.*, 2012; CABRERA; MONTENEGRO, 2013).

A Figura 4 ilustra a ação antimicrobiana do extrato etanólico do pólen frente as bactérias *Streptococcus pyogenes* (A) e *Salmonella typhi* (B). O teste controle utilizado demonstrou que o etanol usado nas extrações não apresentou nenhuma ação inibitória, enquanto que a clorexidina (4%), usada como controle positivo, apresentou ação com as diferentes bactérias testadas.

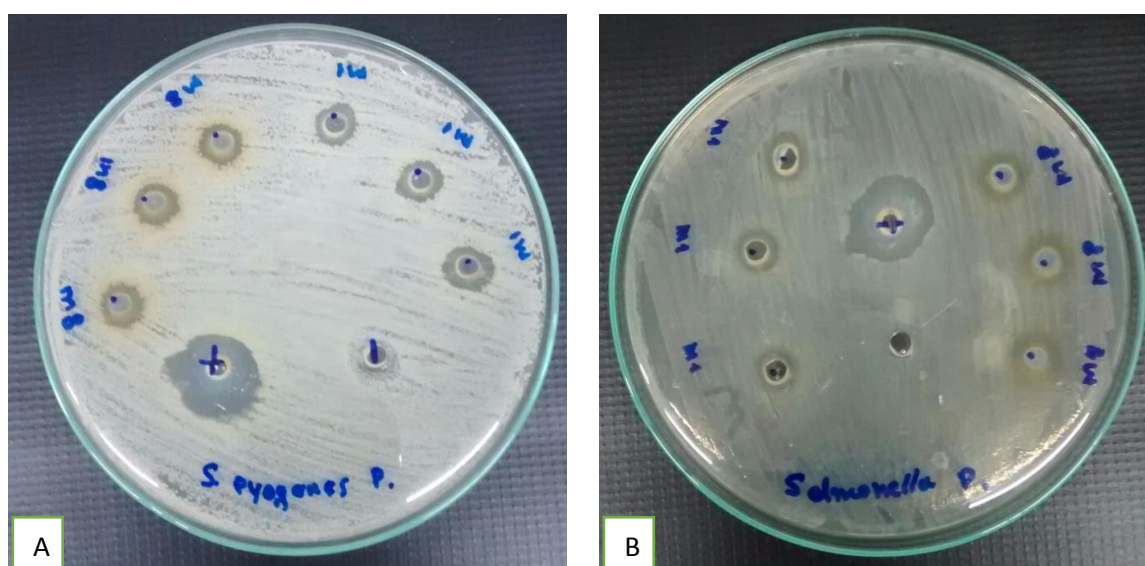


Figura 4: Teste de difusão em meio sólido com perfuração de poços realizado com os extratos de pólen de tíuba coletados na Amazônia maranhense.

A técnica de difusão em ágar com perfuração foi utilizada como parâmetro para quantificar os efeitos negativos induzidos pelo pólen coletado pela tíuba no crescimento das bactérias testadas, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de pólen (EEP) pelo método de difusão em meio sólido com perfuração de poços em milímetros (mm)

EEP	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
M1	14	10	15	10	16	0	9	0
M2	16	14	10	0	0	0	10	15
M3	13	10	17	5	9	0	0	10
M4	10	10	0	10	6	0	0	9
M5	14	12	12	0	10	0	12	10
M6	14	13	15	0	14	0	0	10
M7	12	15	13	10	14	10	10	11
M8	10	10	10	0	0	0	0	15
M9	10	10	10	0	10	15	0	0
M10	15	14	11	0	6	10	10	15
M11	20	13	13	0	8	0	0	15
CN(-)	15	10	0	0	0	15	0	0
CP(+)	30	25	18	16	20	25	18	17

Controle negativo(CN): etanol 70%; Controle positivo (CP): clorexidina 4%; Extratos etanólicos de pólen (EEP): 133,33 mg/ml.

Dos onze extratos testados pela metodologia de difusão em ágar, oito (72,7%) demonstraram atividade antimicrobiana positiva contra, pelo menos, um microrganismo testado, enquanto três (27,3%) extratos apresentaram inibição pelo uso de etanol a 70%, contudo algumas amostras obtiveram um halo maior que o controle feito pelo solvente, indicando um possível sinergismo entre o pólen coletado pela tiúba e o controle negativo.

Em relação a bactérias gram-positivas, o estudo mostrou atividade de dez extratos de pólen para *Streptococcus pyogenes* e nas gram-negativas, destaca-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* que sofreram inibição de crescimento feita por oito extratos de saburá.

Basim et al. (2006) verificaram atividade antimicrobiana de extrato metanólico de pólen apícola da Turquia para 13 diferentes espécies de fitopatógenos, concluindo que este tipo de extrato poderia ser utilizado como protetores de sementes.

Carpes *et al.* (2007), analisando extratos etanólicos de pólen de diferentes regiões do Brasil em concentrações de 40%, 50%, 60%, 70%, 80 e 90%, encontraram inibição para as espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* sp.

Carpes *et al.* (2008) observaram que a ação antimicrobiana do pólen apícola varia entre microrganismos e, de maneira geral, as bactérias são mais sensíveis aos compostos que as leveduras.

Graikou *et al.* (2011) analisaram extratos metanólico e aquoso de pólen apícola desidratado produzido na Grécia e observaram que as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram mais sensíveis que as leveduras *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*.

Carpes *et al.* (2009) testando extratos etanólicos de pólen apícola da Região Sul do Brasil não observou inibição no crescimento dos microrganismos testados. O teste controle utilizado demonstrou que o etanol usado nas extrações também não apresentou nenhuma ação inibitória, enquanto que a clorexidina (0,12%), usada como controle positivo, apresentou forte atividade, inibindo o crescimento de todos os microrganismos, tendo como diâmetro das zonas de inibição valores que variaram entre 3 e 3,5 mm.

Os extratos hidroetanólicos de pólen apícola de Alagoas utilizados por Vasconcelos (2009), não apresentaram ação bactericida na concentração testada frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*.

Pascoal *et al.* (2014), que testaram oito extratos metanólicos de pólen desidratado na inibição de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *C. glabrata*, constataram que as cepas de *S. aureus* foram as mais sensíveis aos extratos, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 1,81 e 4,28 mg/mL. Para os demais microrganismos, os autores observaram 3,71 a 6,96 mg/mL (*P. aeruginosa*), 4,08 a 9,42 mg/mL (*E. coli*) e 16,00 a 33,92 mg/mL (*C. glabrata*).

A amostra M8 apresentou o maior teor de compostos fenólicos (22,37 mg GAE/g), contudo foi o extrato etanólico que menos inibiu o crescimento microbiano nos testes de difusão em ágar por perfuração de poços.

A divergência entre os resultados de atividade antimicrobiana e a concentração de fenólicos sugere que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante do pólen apícola podem não ser os mesmos compostos responsáveis pela sua atividade

antimicrobiana. Isto pode ser explicado também pela natureza lipofílica dos fenóis, que pode muitas vezes reduzir as propriedades antimicrobianas.

O isolamento e identificação dos compostos biologicamente ativos pode ser utilizado para estabelecer marcadores químicos para o pólen apícola com esses potencial antimicrobiano, tornando viável a aplicação deste produto na indústria de alimentos e farmacêutica.

A variação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de pólen pode ser atribuída a diversidade vegetal da Amazônia maranhense em que as abelhas coletam seu material, bem como a estação climática em que os compostos em questão estão sendo produzidos e coletados, uma vez que, a ação antimicrobiana da pólen está diretamente relacionada com os seus constituintes bioativos.

O trabalho apresentou dados nunca apresentados sobre a característica físico-química, potencial antioxidante e atividade antimicrobiana do pólen coletado pela abelha tíuba, colocando o produto na prateleira dos novos alimentos funcionais e com aplicações frente a enfermidades. Além disso, atestou a necessidade da conservação do ambiente da Amazônia maranhense e maior apoio ao meliponicultores da região para proporcionar uma produção sustentável.

6 Conclusão

- O pólen apícola é fonte de energia e proteínas. O presente trabalho demonstrou a necessidade de uma legislação regional para o pólen coletado pela tíuba, devido o recurso florístico da Amazônia Maranhense conter organismos mistos e a abelha interferi com secreções enzimáticas no produto final.
- Em relação aos fenólicos totais e flavonóides totais quantificados, as amostras M5 ($21,90 \pm 0,26$) e M8 ($22,37 \pm 1,29$) apresentaram os maiores valores em relação aos padrões estabelecidos no experimento;
- Quanto às propriedades biológicas, destaca-se que todas as amostras apresentaram capacidade antioxidante acima de 90%, valor muitas vezes superior ao observado em frutas vermelhas reconhecidas como fontes de antioxidantes na dieta.
- O estudo demonstrou que dos onze extratos de pólen testados, oito (72,7%) inibiram o crescimento de pelo menos um dos microrganismos utilizados no experimento. Os extratos de pólen apícola podem ser uma promessa no combate a proliferação microbiana, uma vez que um número crescente de bactérias têm desenvolvido resistência aos antibióticos comerciais, mais estudos devem ser conduzidos para determinar quais compostos bioativos atuam nesse processo.

REFERÊNCIAS

ALMARAZ-ABARCA, N., CAMPOS, M. G., ÁVILA-REYES, J. A., NARANJOJIMÉNEZ, N., CORRAL, J. H., GONZÁLEZ-VALDEZ, L. S. Antioxidante activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, *Leguminosae*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 119-124, 2007.

ALMARAZ-ABARCA, N.; CAMPOS, M.G.; AVILA-REYES, J.A.; NARANJO-JIMENEZ, N.; HERRERA-CORRAL, J.; GONZÁLEZ-VALDEZ, L.S. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. **Interciencia**, v. 29 (10), 574- 578. 2004.

ALMEIDA, A.A.P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. Belo Horizonte, 2007, 137p. Tese de Doutorado - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Produtos Apícolas. In: ALMEIDAMURADIAN, L. B.; PENTEADO, M. D. V. C. (Eds.). **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 10. p. 183-198.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v.18, n. 1, p. 105 -111, 2005.

ASSIS, M. da G. P. **Criação prática e racional de abelhas sem ferrão da Amazônia**. Manaus: INPA/SEBRAE. 2001. 46p

BASIM, E., BASIM, H., ÖZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and própolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 992-996, 2006.

BASTOS, D. H.; ROCHA, C. I; CUNHA, I. B; CARVALHO, P. O; TORRES, E. A. S. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 62, n. 3, p. 239-244, 2003.

BARRETO L.M.R.C., NORDI J.C., DIB A.P.S., CÉSAR V.S., ALVARELI L.G., NORDI N.T., CANELLA J.B. (2012) - Qualidade físico-química do pólen apícola produzido no Vale do Paraíba-SP. *Rev. Biocienc.* 18: 64-70.

BARRETO L. M.; ORSI, R. C.; OLIVEIRA, R.; NEGRÃO, A. F. , Pólen apícola: tendências na produção e diversificação do produto. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 23, número especial, outubro, 2011.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O.; DIB, A.P.S. **Produção de pólen no Brasil**. Taubaté: Cabral, p.100, 2006.

BARRETO, L. M. R. C., FUNARI, S. R. C.; OLIVEIRA O, R. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Federal. **Boletim de Indústria Animal**, v. 62, n. 2, p. 167-175, 2005.

BARRETO, L. M. R. C. **Pólen apícola: beneficiamento, armazenamento e legislação**. 2004.150p. Tese (Doutorado Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

BEZERRA, M. D. B. Meliponicultura: uma atividade essencial para a economia familiar do trópico úmido. In: E. G. Moura (Ed.), *Agroambientes de transição: entre o trópico úmido e o semiárido maranhense*. pp. 144-203, 2004. São Luís: Resumos. São Luís: Universidade Estadual do Maranhão.

BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and Beeswax. **Apiacta**, v.38, p. 334-341, 2004.

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. São Paulo, 2006. 178p. Tese de Doutorado - Faculdade de Nutrição - Universidade de São Paulo.

BONVEHI, J. S.; JORDÀ, R. E. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n.3, p. 725 -732, 1997.

BONVEHÍ, J. S., TORRENTÓ, M. S., LORENTE, E. C. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1848-1853, 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Propolis e Extrato de Própolis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**. Norma Aprovada – Oitava edição. 2003.

BRASIL. **Decreto nº 11.900 de 11 de junho de 1991**. Cria, no Estado do Maranhão, a Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, compreendendo 03 (três) Subáreas: Baixo Pindaré, Baixo Mearim-Grajaú e Estuário do Mearim-Pindaré – Baía de São Marcos incluindo a Ilha dos Caranguejos. São Luís: D.O.E, de 09.10.1991, Ano LXXXV, n. 195.

CABRERA, C.; MONTENEGRO, G. Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.40, n.1, p.223-230, 2013.

CAMPOS, M. G. R. et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Ageinduced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, 742-745, 2003.

CARPES ST, CABRAL ISR, LUZ CFP, CAPELETTI JP, ALENCAR SM, MASSON ML. Palynological and physical-chemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region. **Int J Food Agric Environ**. 2009;7:132-8.

CARPES, Solange Teresinha. **Estudos das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil**. 2008. 255f. Tese (Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARPES, S.T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M.L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.6, p. 1818-25, 2007.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; SILVA, C. G. N. Da; ZILSE, N.; VILAS-BOAS, H. C.; SILVA, A. C. Da; LARAY, J. P.; FREIRE, D. Da C. B.; KERR, W. E. **Criação de abelhas sem ferrão**. Manaus: IBAMA/PRÓVARZEA. 2005. 27p.

CASTRO, R. N. et al. Aplicação da presença de vitaminas C, D e E por cromatografia líquida de alta eficiência, em amostras de polens comercializados no estado do Rio de Janeiro, após análise palinológica. In: **Congresso Brasileiro de Apicultura**, 14, 2002. Campo Grande/MS. Anais...p. 69.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition Biochemistry**, Woburn, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996

CORNEJO, L.G. **Pólen: tecnología de su producción, procesado, y comercialización**. Buenos Aires: IPTEA, p.114, 1994.

CORONEL, B.B.; GRASSO D.; PEREIRA S.C.; FERNÁNDEZ G.A. Caracterización bromatológica del pólen apícola Argentino. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, Republica Argentina, v. 15, p. 141–181, 2004.

CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; FERREIRA, A.F.; PODEROSO, J.C.M.; LESSA, A. C.V.; ARAÚJO, E.D.; CARNELOSSI, M.A.G.; RIBEIRO, G.T. Atividade de água (Aw) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do estado de Sergipe. **Revista da Fapese**, Aracaju, Sergipe, v.4, n. 2, p. 27-36, 2008.

COSTA, T.; JORGE N. Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Saúde**, Arapongas, PR, v.13, n.3, p. 195-203, 2011.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., ROUBIK, D.W., DOLLIN, A., HEARD, T., AGUILAR, I., VENTURIERI, G.C., EARDLEY, C. & KERR, W. E; CARVALHO, G. A. & NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu - Biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte (MG), Fundação Acungau. 1996.

DAUGUET, J.C.; BERT, M.; DOLLEY, J.; BEKAERT, A.; LEWIN, G. 8-methoxykaempferol 3- neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. **Phytochemistry**, v. 33(6), 1503-1505, 1993.

DEVI, K.A.; SUKRASNO & FIDRIANNY, I. Characterization of bee pollen from ranca bungur, bogor. **Proceedings of the Third International Conference on Mathematics and Natural Sciences**, 2010.

DORMAN, H. J. D.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

DUBOIS, J.C.L. **Manual Agroflorestal para a Amazônia**. Rio de Janeiro: REBRAF, 228p. ,1996.

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

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988

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

FEITOSA, A. C., TROVÃO, J. R. (Eds.). 2006. **Atlas Escolar do Maranhão: Espaço Geo-histórico e Cultural**. João Pessoa: Grafset: p. 202.

FENG, X. T. et al. Pollen *Typhae* total flavone improves insulin-induced glucose uptake through the β -arrestin-2-mediated signaling in C2C12 myotubes. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 4, p. 914-922, 2012.

FERREIRA, Rodrigo da Cruz. **Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen *Melipona scutellaris* Latreille submetido a diferentes processos de desidratação**. 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

FIORDA, F. A.; SIQUEIRA, M. I. D. Avaliação do pH e atividade de água em produtos cárneos, **Estudos**, Goiânia, v. 36, n. 5/6, p. 817-826, 2009.

FRAZÃO, R.; SILVEIRA, O. T. Levantamento preliminar das abelhas sem ferrão das ressacas de Macapá e Santana para um aproveitamento sustentável (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: Luis Roberto Takiyama; Arnaldo de Queiroz da Silva. **Diagnóstico de ressacas do estado do Amapá: Bacias do igarapé da Fortaleza e do rio Curiaú**. 21 ed. Macapá, AP: JM Editora Gráfica, 2004, v. 1, p. 249-255.

FREIRE, K. R. L.; LINS, A. C. S.; DÓREA, M. C.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, Basel Suíça, v. 17, n. 2, p. 1652-1664, 2012.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A.A.F.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GRAIKOU, K.; KAPETA, S.; ALIGIANNIS, N.; SOTIROUDIS, G.; CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E.; CHINO, L. Chemical analysis of Greek pollen - antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. **Chemistry Central Journal**, v.5, n.33, p.1-9, 2011.

HERVATIN, Heloisa Litholdo. **Avaliação Microbiológica e Físico-Química do Pólen Apícola in natura e Desidratado sobre Diferentes Temperaturas**. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, v. 4, p.533, 2005.

ISIDOROV, V. A., A. G. ISIDOROVA, L. SCZCZEPANIAK, AND U. CZYZEWSKA. 2009. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. **Food Chem.** 115:1056–1063.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J. M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. **Food Chemistry**, Oxon, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.

KAN, T.; GUNDOGDU, M.; ERCISLI, S.; MURADOGLU, F.; CELIK, F.; GECER, M. K. et al. Phenolic compounds and vitamins in wild and cultivated apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruits grown in irrigated and dry farming conditions. **Biol Res**, v. 47, n. 1, p. 46, 2014.

Kerr WK, Carvalho GA, Nascimento VA (1996) Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. Paracatu: Acangaú.

KERR, W. E, CARVALHO, G. A. DA SILVA, A. C, DE ASSIS, M. G. P. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Revista Parcerias Estratégicas**. n. 12. Setembro 2001.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v.13, p.8-17, 2002.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. et al. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-6, 2015

KRELL, R. Value-added products from beekeeping. **FAO Agricultural Services Bulletin**, 1996. v. 124, p. 87-113.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.2, p.171-174, 2001.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYŻOLIK; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKOŃ, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, Oxford, v.100, n. 1, p. 237-240, 2007.

LOBO, A. S. & TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutr.** vol.17. 2004.

LU, L. C., CHEN, Y. W. and CHOU, C. C. Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.11, p.277, 2003.

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

MARQUES, Luiz Junior Pereira et al. Levantamento da flora apícola em Santa Luzia do Paruá, Sudoeste da Amazônia, Maranhão. **Acta Bot. Bras.**, Feira de Santana, v. 25, n. 1, p. 141-149, Mar. 2011.

MARKHAM, K.R.; CAMPOS, M. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. **Phytochemistry**, v. 43(4), 763-767, 1996.

MENEZES, Jeane Denise de Souza. **Compostos bioativos do pólen apícola**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009. 63f.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

- MIRANDA, M. M. B; ANDRADE, T. A. P. **Fundamentos de palinologia**. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, 1990.
- MODRO, A. F. H.; MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P.; NETO, J. A. A. M. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1057-1065, 2007.
- MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.5, p.1096-1101, 2011.
- MORETI, A.C.de C.C. **Pólen: alimento protéico para as abelhas – Complemento alimentar para o homem**. Instituto de Zootecnia de São Paulo, 2006.
- MORETI, A. C. C. C. et al. **Atlas do pólen de plantas apícolas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual, 2002. 93 p.
- MORRE, P.D.; WEBB, J.A. **An Illustrated Guide to Pollen Analysis**. London, Hodder and Stoughton, 1978.
- NEVES, L. C.; ALENCAR S. M.; CARPES S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. VII BMCFB, Lorena – SP. **Brazilian Journal Food Technology**, p. 107-10, 2009.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022-1037, 2003.
- NOGUEIRA, C.M.P. **Estudo do pólen apícola comercial**. Bragança, 2012. 62p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Bragança.
- NOGUEIRA, C.; IGLESIAS, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. **International Journal of Molecular Sciences**, asel Suíça, v.13, n.9, p.11173-11187, 2012.
- NOGUEIRA-NETO, P. Global Meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**. v.37, p.275-292, 2006.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Ed. Nogueirapis, 446 p. 1997.
- OLIVEIRA, C. D. de S. **Percepção de agricultores familiares na adaptação do sistema de cultivo de corte e trituração**. 2002. 140 f. Dissertação (Mestrado em Agriculturas Familiares e Desenvolvimento Sustentável), Centro Agropecuário, Embrapa Amazônia Oriental. UFPA, Belém, 2002.

ORZÁEZ VILLANUEVA, M.T.; DIAZ MARQUINA, A.; BRAVO SERRANO, R. BLAZQUEZ - ABELLÁN, G. The importance of bee collected pollen in the diet: a study of its composition. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 53, n. 3, p. 217-224, 2002.

OSTROSKY, ELISSA A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p.301-307, jun. 2008.

PARK, Y.K., KOO, M.H., SATO, H.H., CONTADO, J.L. Survey of some components of própolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, n.1, p.1253–1259, 1995

PASCOAL, A., S. RODRIGUES, A. TEIXEIRA, X. FEÁS AND L. M. ESTEVINHO. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food Chem. Toxicol.** 63: 233-239. 2014.

PERNAL, S. F. AND R. W. CURRIE. Pollen quality in fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie** 31:387–409, 2000.

PETERSEN, J. *et al.* Comercialização do pólen apícola em 11 países da America Latina. **Revista Magistra**. Cruz das Almas, Bahia, v. 23, número especial, out. 2011.

PIANARO, A. 2007. **Ecologia química de abelhas brasileiras: *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Pebeia droryana*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Centris trigonoides***. Dissertação de Mestrado, Instituto de química UNICAMP, São Paulo, 138 p.

PINHEIRO, C. U. B. 2013. Matas Ciliares: recuperação e conservação em áreas úmidas do Maranhão. 1ª ed. São Luís, MA: Gráfica e Editora Aquarela: p. 192.

PINTO, F. A.; CAMPOS, C. N.; BARRETO, L. M. R. C. Perfil físico-químico do pólen apícola produzido em Taubaté, Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, v. 20, n. 1:2-1:6, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7.ed, 2007. 728 p.

REBELO, K.S. **Caracterização química, físico-química e espectroscópica do pólen coletado por abelhas sem ferrão amazônicas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, 2010.67 f.

REIS, V.D.A. **Fatores que influenciam na coleta de pólen por *Apis mellifera* L. e análises físico-químicas do pólen coletado**. Dissertação Mestrado – ESALQ, USP, Piracicaba, p.76, 2001.

ROCHA J.F.M. **Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola**. 2013. 96 f. Dissertação (mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) Escola Superior Agrária de Bragança – Instituto Politécnico, IPB, Portugal, 2013.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 412, n. 5-6, p. 410-424, 2011.

RODRIGUES, A. A.; KELLER, K. M.; Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 30, n. 4, p. 249 - 253, out/dez 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996

RUFINO MSM, ALVES RE, BRITO ES, MORAIS SM, SAMPAIO CG, JIMENEZ JP, CALIXTO FDS. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, 127: 1-4, 2007.

RZEPECKA-STOJKO, A. et al. Antioxidative properties of bee pollen extracts examined by EPR spectroscopy. **Journal of Apicultural Science**, v. 56, n. 1, p. 23-31, 2012.

SATTLER, J.A.G. **Quantificação das vitaminas antioxidantes E (α -, β -, γ -, δ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitaminas A (α -, β - caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Alimento e Nutrição Experimental) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2013.

SILVA, C. I. et al. O uso da palinologia como ferramenta em estudos sobre ecologia e conservação de polinizadores no Brasil. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. (Org.). **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: EDUSP, 2012, p. 369-384.

SILVA, C. I. et al. **Catálogo polínico: Palinologia aplicada em estudos de conservação de abelhas do gênero *Xylocopa* no Triângulo Mineiro**. Uberlândia: EDUFU, 2010. 154p.

SILVA, R. A. da; RODRIGUES, L. M. de F. M.; LIMA, A. de; CAMARGO, R. da C. R. Avaliação da qualidade do mel de abelha *Apis mellifera* produzido no município de Picos, Estado do Piauí, Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 20, n. 144, p. 90- 94, set. 2006.

SILVA, JOSÉ MALHEIROS. **Recursos alimentares utilizados por abelhas *Apis mellifera* L e *Melipona fasciculata* Smith em São Bento** – Baixada maranhense. São Luís, 2007. 60 p.: iI Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Estadual do Maranhão, 2007.

Silveira, F. A.; Melo, G. A. R.; Almeida; E. A. B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte, MG, Min. Meio Ambiente/Fund. Araraucária. 2002, 253p.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, California, v. 299, n.1, p.152-178, 1999.

SOUZA, L. M.; CORREIA, K. C. ; SANTOS, A. M. G. ; BARRETO, L.P. ; BEZERRA NETO, E. . Comparação de metodologias de análise de pH e acidez total titulável em polpa de melão. In: **X Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão**, 2010, Recife.

SOUZA, D. C.Org. **Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural /organizado por Darcet Costa Souza**. 2º ed.rev. Brasília: Sebrae, 2007. 186p.:il

SOUZA, R. C. de S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, F. P. M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 333-336, 2004.

SCHMIDT, J.O. BUCHMANN, S.L. Other products of hive. In: GRAHAM, J.M.; AMGROSE, J. T.; LANGSTROTH, L.L., eds. **The Hive and the honey bee: a new book on beekeeping which contines the tradition of “Langstroth on the hive and the honeybee”**. Hamilton: Dadant, 1992. p.928-977.

SHASHIREKHA, M.N.; MALLIKARJUNA, S.E.; RAJARATHNAM, S. Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1324 – 1339, 2015.

SZCZESNA, T.; RYBAK-CHIELEWSKA, H.; CHMIELEWSKI, W. Sugar composition of pollen loads harvested at different periods of the beekeeping season. **Journal of Apicultural Science**, v.46, n.2, p.107–115, 2002.

TÓMAS-LORENTE, F., GARCIA-GRAU, M. M., NIETO, J. L., TOMÁSBARBERÁN, F. A. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. **Phytochemistry**, v.31, p. 2027-2029, 1992.

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, New York, v. 16, n. 7/8, p. 8-16, 2000.

THOMASI, Tamires Minatto. Verificação dos parâmetros físico-químicos em amostras de pólen apícola. 2010. 14f. Monografia (Curso de Farmácia) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, 2010.

VALDÉZ, P. Polen apícola: una alternative de negócio. *Agrimundo*, v.1, p.1-9, 2014.

VASCONCELOS, M. R. dos S. Pólen apícola do estado de Alagoas: composição físico-química, origem botânica e atividade antioxidante. Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2009. 102f.

VENTURIERI, G. C. et al. **Caracterização e avaliação de abelhas indígenas e de plantas milíferas utilizadas para produção de mel entre os pequenos agricultores da Amazônia Oriental**. Relatório de pesquisa. Belém: EMBRAPA. 2003. 84p.

VIEIRA, F. C. B.; ARAUJO, D. M.; CARVALHO, Y. M. B.; SANTOS, A. V. Meliponicultura: uma alternativa sustentável/rentável para as comunidades ribeirinhas/rurais do estado do Amazonas. In: **Iv Fórum Ambiental Da Alta Paulista**, Tupã, 2008: Anais... 2008.

VIT, P.; SANTIAGO, B. Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, p. 411-415, 2008.

ZETSCHE, F. "**Sporopollenine**". In Kelein, G. (ed). *Handbuch de Pflanzenanalyse*. Wien, Verlag von Julius Springer, 1932, pp.205-239.

ZHANG, H. et al. Antioxidant and tyrosinase inhibitory properties of aqueous ethanol extracts from monofloral bee pollen. **Journal of Apicultural Science**, v. 59, n. 1, p. 119-128, 2015.