UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SOLANGE TERESINHA CARPES

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO PÓLEN APÍCOLA DE *Apis mellifera* L. DA REGIÃO SUL DO BRASIL

CURITIBA
2008

SOLANGE TERESINHA CARPES

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO PÓLEN APÍCOLA DE *Apis mellifera* L. DA REGIÃO SUL DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Masson - UFPR
Co-orientador: Prof. Dr. Severino Matias de Alencar – ESALQ/USP

CURITIBA
2008

Carpes, Solange Teresinha
Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil / Solange eresinha Carpes. – Curitiba, 2008.
248 f.: il.; tabs., grafs.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Masson
Co-orientador: Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.
Inclui Bibliografia.

1. Abelha – Pólen. 2. Abelha - Produtos. 3. *Apis mellifera* L. 4. Antioxidantes. 5. Compostos fenólicos. I. Título. II. Masson, Maria Lúcia. I. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 638.1

SOLANGE TERESINHA CARPES

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO PÓLEN APÍCOLA DE *Apis mellifera* DA REGIÃO SUL DO BRASIL

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora: Profª. Drª. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR

Prof. Dr. CLAUDIO LIMA DE AGUIAR
Centro de Pesquisa em Ciência e Tecnologia do Leite, UNOPAR

Prof. Dr. ADHEMAR PEGORARO
Setor de Ciências Agrárias, UFPR

Profª. Drª. PATRÍCIA TEIXEIRA PADILHA DA SILVA PENTEADO
Setor de Ciências da Saúde, UFPR

Profª. Drª. AGNES DE PAULA SCHEER
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 09 de maio de 2008.

Dedico este trabalho a toda minha família e em especial aos meus amores Julia (in memoriam), Ana Luíza e Jailson.

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Maria Lúcia Masson, pela atenção, confiança, apoio, respeito e carinho durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, também pela confiança, amizade e oportunidade concedida em seus laboratórios de pesquisa na ESALQ/USP.

À Direção e Coordenação do Curso de Química Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Pato Branco, pelo companheirismo na liberação de minhas atividades acadêmicas para a execução desta tese.

À Coordenação do CNPq, pela ajuda financeira com bolsa de estudos PICDT.

Ao Sr. Ballardim, apicultor de Campos Novos, Santa Catarina pelo seu comprometimento com a pesquisa e envio das amostras de pólen apícola.

Ao Sr. Breyer, apicultor, empresário e cientista de União da Vitória, Paraná, pelas amostras de pólen apícola e por suas brilhantes sugestões durante a execução desse trabalho.

A todos os apicultores da região Sul do Brasil contatados na aquisição das amostras de pólen, pela sua generosidade, simplicidade e comprometimento nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, SP, (FOP/UNICAMP), pela confiança e oportunidade concedida ao ceder as instalações e infra-estrutura de seus laboratórios de microbiologia para a execução das análises de atividade antibacteriana.

Ao Prof. Dr. Elliot Kitajima, chefe do Laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ-USP, Piracicaba-SP, pela confiança e oportunidade no uso de seus laboratórios para a realização de todas as análises de microscopia.

A Dra. Cynthia Fernandes Pinto da Luz, pesquisadora do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, pelo seu conhecimento e ajuda na identificação dos tipos polínicos.

A Prof.ª Dra. Lys Mary Bileski Cândido pela confiança e por ceder as instalações de seus laboratórios no Departamento de Nutrição – UFPR, para a realização das primeiras análises desta Tese.

Ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão, do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ/USP; Severino, Tatiane, Ingridy, Adna, Lucimara, Ivani, Rosângela, Rodrigo, Letícia e Mirella; que compartilharam comigo toda a dor da perda de minha Julia. Deram-me força e apoio para continuar esse trabalho e participaram das alegrias da chegada de Ana Luíza. Obrigada por fazerem parte dessa história.

A Ingridy Ribeiro pela ajuda nas análises de microscopia de luz e microbiologia e Tatiane Oldoni pela colaboração nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos colegas de turma Osmar Dallasanta, pelo incentivo com o empréstimo dos tubos de ensaio para o preparo dos extratos de pólen. A Cristiane Schüler pela amizade, companheirismo durante todo o tempo do curso. À Danielle Dyminski pela amizade desde o tempo de Mestrado.

Ao casal de amigos de todas as horas, Elizabete e Junior, pelo companheirismo e acolhida inúmeras vezes em sua casa em Curitiba. Felipe e Derileia, Gustavo e Joana, pela amizade, passeios e churrascadas aos domingos. Vocês tornaram este trabalho bem mais leve e agradável.

À todos os professores do programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR, por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis para a minha formação profissional.

À todos os colegas do programa que foram aparecendo no caminho deixando sua marca e importância.

De uma maneira especial
a Deus, pela força, ânimo,
coragem e fé.

RESUMO

O pólen apícola possui uma composição química constituída por carboidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais, sendo considerado uma boa fonte nutricional com benefícios para a saúde, principalmente pela presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Neste estudo foi determinada a composição química, compostos fenólicos totais e flavonóides totais, atividade antioxidante e antibacteriana e análise palinológica do pólen apícola produzido da Região Sul do Brasil. Para a determinação da composição química foram realizadas análises pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A atividade antioxidante dos extratos etanólicos de pólen apícola (EPE) foi determinada e comparada à de antioxidantes comerciais (BHT, BHA e α-tocoferol) pelos métodos de seqüestro do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) e clareamento do sistema β-caroteno/ácido linoléico. Os teores médios de umidade, proteína e açúcares redutores foram de 4,19%, 20,47% e 48%, respectivamente, e os minerais predominantes foram fósforo (6923,63 mg/kg), potássio (5116,76 mg/kg), cálcio (1031,98 mg/kg) e magnésio (754,62 mg/kg). Os valores médios obtidos para os compostos fenólicos e flavonóides totais foram de 30,46 mg EAG/g pólen (EAG: equivalente em ácido gálico) e 8,92 mg de quercetina/g pólen, respectivamente. Foram encontradas altas atividades de seqüestro para o radical livre DPPH, com EC_{50} (concentração da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH•) médio de 1920 µg/mL. A atividade antioxidante média dos EPE foi de 73,44% pelo método do DPPH e 83,60% pelo sistema de clareamento do β-caroteno/ácido linoléico. Foi observada alta capacidade de seqüestro de radical livre para as amostras SC 03, SC 02, RS 07 e RS 09. A atividade antioxidante do EPE do Estado do Rio Grande do Sul foi superior à dos antioxidantes sintéticos (BHT, BHA) utilizados na indústria alimentícia, enquanto a do Estado de Santa Catarina foi maior que a do BHT. Foi observada correlação estatisticamente significativa (p<0,01) entre

atividade antioxidante pelo método do DPPH e teor de compostos fenólicos totais e flavonóides totais. A alta atividade antioxidante dos EPE SC 03 e RS 09 pode ser explicada pela presença dos flavonóides rutina e miricetina, identificados por CLAE/DAD. Pela técnica de CG-EM foi detectada a presença de ácidos fenólicos e vários ácidos graxos. Embora os EPE da Região Sul do Brasil analisados tenham apresentado alto teor de compostos fenólicos com atividade antioxidante, não demonstraram atividade antibacteriana pelos métodos utilizados.

STUDY OF PHYSICAL-CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BEE POLLEN EXTRACTED BY *Apis mellifera L.* IN THE SOUTHERN REGION OF BRAZIL

ABSTRACT – Bee pollen is constituted by carbohydrates, proteins, amino acids, vitamins, and minerals, and therefore is considered a good nutritional source that brings benefits to human health, mainly due to the presence of polyphenols presenting antioxidant activity. In this study, analyses to determine chemical composition, total phenolics, flavonoids, antioxidant and antibacterial activity, and palynological characterization were carried out for pollen produced in the Southern Region of Brazil. Analyses using high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) and gas-chromatography/mass spectrometer (GC-MS) were performed to determine the chemical composition. The antioxidant activity of the ethanolic extracts of bee pollen (EPE) was determined and compared to commercial antioxidants (BHT, BHA, and α-tocopherol) using the methods DPPH• (2,2 diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical scavenging activity and β-carotene/linoleic acid bleaching. The mean values of moisture, protein, and sugar were 4.19%, 20.47%, and 48%, respectively, and the main minerals were phosphorus (6923,63 mg/kg), potassium (5116,76 mg/kg), calcium (1031,98 mg/kg) and magnesium (754,62 mg/kg). The mean values of total phenolics and flavonoids were 30.46 mg GAE/g pollen (GAE: galic acid equivalent) and 8.92 mg quercetin/g pollen, respectively. High scavenging activity was found for DPPH•, presenting mean IC_{50} (the concentration of antioxidant substance necessary to reduce 50% of the initial concentration of DPPH•) of 1920 µg/mL. The mean antioxidant activity of EPE was 73.44% using DPPH and 83.60% using β-carotene/linoleic acid bleaching system. High scavenging activity was observed for samples SC 03, SC 02, RS 07, and RS 09. The antioxidant activity of EPE from the state of Rio Grande do Sul was higher than the synthetic antioxidants (BHT, BHA) used in the food industry, whereas the one from the state of Santa Catarina was higher than BHT. A significant statistical correlation (p<0.01) was observed between antioxidant activity using DPPH method and total phenolics and flavonoids. The high antioxidant activity of EPE SC 03 and RS 09 can be

explained by the presence of rutin and myricetin, flavonoids identified by HPLC-DAD. The presence of phenolic acids and several fatty acids was detected using GC-MS. Although the analyzed EPE from the Southern Region of Brazil presented high levels of phenolics with antioxidant activity, they did not show antibacterial activity through the methods used.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - ABELHA *Apis mellifera L.* SOBRE O FAVO DA COLMÉIA 30

FIGURA 02 - ESTAMES COM ANTERAS EVIDENTES, CARREGADAS DE PÓLEN 31

FIGURA 03 - ABELHA COLETANDO PÓLEN DAS FLORES 32

FIGURA 04 - GRÃO DE PÓLEN NA CORBÍCULA DA ABELHA 32

FIGURA 05 - COLETORES DE PÓLEN COLOCADO NA FRENTE DO ALVADO..... 34

FIGURA 06 - GAVETA DE RECOLHIMENTO DO PÓLEN 35

FIGURA 07 - COLETA DO PÓLEN POR APICULTORES 36

FIGURA 08 - ESTUFA SECADORA DE PÓLEN APÍCOLA 37

FIGURA 09 - SEPARADOR DE PÓLEN APÍCOLA 38

FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DE UM FENOL SIMPLES 42

FIGURA 11- VIA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO PARA BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS 46

FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO BENZÓICO 47

FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CINÂMICO 47

FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA 48

FIGURA 15 - ÁCIDOS FENÓLICOS GERALMENTE ENCONTRADOS EM PRODUTOS APÍCOLAS 51

FIGURA 16 - NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C 52

FIGURA 17 - NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE SEM ANEL C 53

FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE FLAVONÓIDES A PARTIR DE FENILPROPANÓIDES (P-CUMARIL CoA) E MALONIL CoA ... 57

FIGURA 19 - ESTRUTURAS QUÏMICAS DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE FLAVONÓIDES 58

FIGURA 20 - ALGUNS FLAVONÓIDES GERALMENTE ENCONTRADOS EM PRODUTOS APÍCOLAS 65

FIGURA 21 - POSSÍVEIS ROTAS METABÓLICAS DOS POLIFENÓIS EM DIETA HUMANA 67

FIGURA 22 - DOENÇAS E DANOS CAUSADOS PELAS ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (ERO_S) 74

FIGURA 23 - ESQUEMA DE SEQÜESTRO DE EROS (R) POR FLAVONÓIDES (FL) 85

FIGURA 24 - SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE METAIS EM FLAVONÓIDES 85

FIGURA 25 - ESTRUTURA DO FLAVONOL QUERCETINA MOSTRANDO CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES NA DEFINIÇÃO DE POTENCIAL ANTIOXIDANTE CLÁSSICO DOS FLAVONÓIDES. 87

FIGURA 26 - ESTRUTURA QUÍMICA DO BUTILIHIDROXIANISOL (BHA) E BUTILIHIDROXITOLUENO (BHT) 89

FIGURA 27 - ESTRUTURA QUÍMICA DO α – TOCOFEROL 91

FIGURA 28 - DISTRIBUIÇÃO INTERFACIAL DE ANTOXIDANTES LIPOFÍLICOS E HIDROFÍLICOS EM ÓLEO COMPARADO A EMULSÕES ÓLEO EM ÁGUA 99

FIGURA 29 - REAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH COM UMA MOLÉCULA ANTIOXIDANTE 107

FIGURA 30 - APARÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA a) ESTADO DO PARANÁ, b) ESTADO DE SANTA CATARINA, c) ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL 137

FIGURA 31 - APARÊNCIA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO PARANÁ 145

FIGURA 32 - APARÊNCIA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DE SANTA CATARINA 145

FIGURA 33 - APARÊNCIA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL 146

FIGURA 34 - ANÁLISE DE VARREDURA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO PARANÁ 148

FIGURA 35 - ANÁLISE DE VARREDURA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DE SANTA CATARINA 150

FIGURA 36 - ANÁLISE DE VARREDURA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL 151

FIGURA 37 - CROMATOPLACAS DE CCDAE-FR VISUALIZADAS SOB LUZ ULTRAVIOLETA A 366 nm DOS EPE DO ESTADO DO PARANÁ 153

FIGURA 38 - CROMATOPLACAS DE CCDAE-FR VISUALIZADAS SOB LUZ ULTRAVIOLETA A 366 nm DOS EPE DO ESTADO DE SANTA CATARINA 153

FIGURA 39 - CROMATOPLACAS DE CCDAE-FR VISUALIZADAS SOB LUZ ULTRAVIOETA A 366 nm DOS EPE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL 154

FIGURA 40 - COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DO PÓLEN APÍCOLA 156

FIGURA 41 - CINÉTICA DE REDUÇÃO DO DPPH (PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE) DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DO ESTADO DO PARANÁ EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO 161

FIGURA 42 - CINÉTICA DE REDUÇÃO DO DPPH (PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE) DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DO ESTADO DE SANTA CATARINA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO..... 162

FIGURA 43 - CINÉTICA DE REDUÇÃO DO DPPH (PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE) DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO. 163

FIGURA 44 - EXEMPLO DE GRÁFICO PARA O CÁLCULO DO EC_{50} 164

FIGURA 45 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (EC_{50}) DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA 166

FIGURA 46 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) PELO MÉTODO DO β-CAROTENO- ÁCIDO LINOLEICO 171

FIGURA 47 - CORRELAÇÃO ENTRE FENÓLICOS TOTAIS E % ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAL (A) E ENTRE FLAVONÓIDES TOTAIS E % ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAL (B) 175

FIGURA 48 - TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA (EPE) (PR 01, PR 02, SC 01, SC 02, RS 02) CONTRA *Streptococcus mutans*..... 178

FIGURA 49 - TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA (EPE) (RS 01, RS 02, RS 03, SC 09, SC 10) CONTRA *Staphylococcus aureus* 178

FIGURA 50 - CROMATOGRAMAS EM CLAE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) - AMOSTRA PR 03 . 182

FIGURA 51 - CROMATOGRAMAS EM CLAE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) - AMOSTRA SC 03.. 183

FIGURA 52 - CROMATOGRAMAS EM CLAE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) - AMOSTRA RS 09.. 184

FIGURA 53 - (A) HOMOGENEIZAÇÃO DA RESINA XAD2 COM O EXTRATO DE PÓLEN, (B) EMPACOTAMENTO EM COLUNA E (C) EXTRATO METANÓLICO IRRADIADO COM LUZ U.V 366 nm .. 187

FIGURA 54 - PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) DA AMOSTRA PR 03 APÓS O USO DA RESINA XAD2 190

FIGURA 55 - PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA DA AMOSTRA SC 03 APÓS O USO DA RESINA XAD2..... 191

FIGURA 56 - PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA DA AMOSTRA RS 09 APÓS O USO DA RESINA XAD2 192

FGURA 57 - PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CG-EM DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA APÓS O USO DA RESINA XAD2. (A) PR 03; (B) SC 03; (C) RS 09..... 194

FIGURA 58 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. IMAGENS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: 1. EUPHORBIACEAE; 2. ASTERACEAE *ELEPHANTOPUS*; 3. ASTERACEAE *EUPATORIUM*; 4. ASTERACEAE *GOCHNATIA*; 5. ASTERACEAE *BACCHARIS*; 6. SAPINDACEAE *MATAYBA*; 7. MYRTACEAE *EUCALYPTUS*; 8. MIMOSACEAE *MIMOSA SCABRELLA* 208

FIGURA 59 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS NA AMOSTRA PR 14. MICROSCOPIA ÓPTICA (400 X) 209

FIGURA 60 - ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE ENCONTRADAS NO PÓLEN APÍCOLA DA REGIÃO SUL. MICROSCOPIA ÓPTICA, 50 µM, 400 X. A: ASTERACEAE *BACCHARIS*; B: ASTERACEAE *ELEPHANTOPUS*; C: ASTERACEAE *EUPATORIUM*; D: ASTERACEAE *GOCHNATIA* 209

FIGURA 61 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. IMAGENS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: 9 VERBENACEAE *AEGIPHILA*; 10. BRASSICACEAE; 11. ARECACEAE TIPO I, NA SETA PRETA *PINUS*; 12. ARECACEAE TIPO 2; 13. ANACARDIACEAE *SCHINUS*; 14. ANACARDIACEAE TIPO I; 15. ANACARDIACEAE *ASTRONIUM*; 16. LEGUMINOSAE 211

FIGURA 62 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. IMAGENS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: 17. BORAGINACEAE *CORDIA*; 18. ARECACEAE; 19. ANACARDIACEAE TIPO 2; 20. ROSACEAE *PRUNUS*; 21. ROSACEAE; 22. LORANTHACEAE

STRUTHANTHUS..... 213

FIGURA 63 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. MICROSCOPIA ÓPTICA (50 µ, 400 X). A: MYRTACEAE *EUCALYPTUS*; B: ROSACEAE; C: LORANTHACEAE *STRUTHANTHUS*; D: ANACARDIACEAE TIPO 1 214

FIGURA 64 ANACARDIACEAE *ASTRONIUM* PRESENTE NO PÓLEN APÍCOLA DAS AMOSTRAS PR 05 (< 3%) E PR 10 (3 – 15%). MICROSCOPIA ÓPTICA (400 X)..... 214

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS 44

TABELA 02 - COMPRIMENTO DE ONDA DE ABSORÇÃO DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDES 54

TABELA 03 - DIFERENTES CLASSES DE FLAVONÓIDES, SEUS SUBSTITUÍNTES E FONTES DIETÉTICAS 61

TABELA 04 - PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NAS FORMAS DE RADICAIS E NÃO RADICAIS..... 76

TABELA 05 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA QUALIDADE DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO 115

TABELA 06 - PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO PÓLEN APÍCOLA BRASILEIRO 115

TABELA 07 - LOCALIDADES DE ORIGEM DO PÓLEN APÍCOLA E DENOMINAÇÕES DAS AMOSTRAS 121

TABELA 08 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA 139

TABELA 09 - CONTEÚDO MINERAL DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA 143

TABELA 10 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL EC_{50} DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA..... 155

TABELA 11 - PORCENTAGEM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA (EPE) PELO MÉTODO DO DPPH 169

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PÓLEN (EPE) PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR..... 179

TABELA 13 - ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA APÓS O USO DA RESINA HIDROFÓBICA 188

TABELA 14 - COMPOSTOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PÓLEN APÍCOLA (AMOSTRA PR 03) 195

TABELA 15 - COMPOSTOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PÓLEN APÍCOLA (AMOSTRA SC 03)..... 197

TABELA 16 - COMPOSTOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PÓLEN APÍCOLA (AMOSTRA RS 09) 199

TABELA 17 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO PARANÁ 204

TABELA 18 TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DE SANTA CATARINA 205

TABELA 19 TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL 206

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BHT	Butilihidroxitolueno
BHA	Butilihidroxianisol
PG	Galato de propila
TBHQ	Butilhidroquinona terciária
ATCC	American Type Culture Collection
CLAE/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
MO	Microscopia Óptica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ERO_S	Espécies reativas ao oxigênio
ERN_S	Espécies reativas ao nitrogênio
RL	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GP_X	Glutationa peroxidase
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxil
$O_2^{\bullet -}$	Radical ânion superóxido
$HO_2^{\bullet}$	Radical hidroperoxil
$RO_2^{\bullet}$	Radical peroxil
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxil
β	Beta
α	Alfa

AH	Antioxidante
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
DPPH	2,2 difenil-1-picridrazina
ABTS+	2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
EC_{50}	A concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH•
EPE	Extratos Etanólico de Pólen
%AA	Atividade Antioxidante (%)
GAE/g	Equivalente em ácido gálico por grama de amostra de pólen apícola
CIM	Concentração mínima inibitória
Abs_a	Absorvância da amostra
Abs_b	Absorvância do branco
Abs_c	Absorvância do controle
DR_c	Taxa de degradação da amostra controle
DR_s	Taxa de degradação da amostra contento a substância teste
PD	Pólen predominante ou dominante
PA	Pólen secundário ou acessório
PII	Pólen de menor importância ou isolado
PIO	Pólen minoritário ou ocasional

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**24**
1.1	OBJETIVO GERAL	27
1.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	27
2	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	**29**
2.1	ABELHA *Apis mellifera*	29
2.2	PÓLEN APÍCOLA	31
2.2.1	Beneficiamento do Pólen Apícola	35
2.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PÓLEN APÍCOLA	39
2.3.1	Compostos Fenólicos em Plantas	41
2.3.2	Síntese e Classificação dos Compostos Fenólicos	43
2.3.2.1	Ácidos fenólicos	47
2.3.3	Compostos Fenólicos em Pólen	49
2.3.4	Flavonóides	52
2.3.5	Síntese e Classificação dos Flavonóides	55
2.3.6	Flavonóides Presentes no Pólen	62

2.4 ABSORÇÃO E METABOLISMO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS 66

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS 69

2.6 ANTIOXIDANTES 73

2.6.1 Radicais Livres 75

2.6.2 Sistema de Defesa Antioxidante 77

2.6.2.1 Sistema Antioxidante Enzimático 78

2.6.2.2 Sistema Antioxidante Não Enzimático 81

2.6.3 Peroxidação Lipídica 82

2.6.4 Mecanismo de Ação dos Antioxidantes Fenólicos 83

2.6.5 Antioxidantes Fenólicos Sintéticos 88

2.6.6 Antioxidantes Fenólicos Naturais 90

2.7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* 93

2.7.1 Método Direto - Habilidade em Inibir a Oxidação de Lipídeos em Sistemas Modelo 96

2.7.1.1 Paradoxo Polar 96

2.7.1.2 Método da lipoperoxidação pelo TBARS 100

2.7.1.3 Método do *β-caroteno*-ácido linoleico 101

2.7.2 Método Indireto - Seqüestro de Radical 104

2.7.2.1 Método do ABTS^{+} (2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) 105

2.7.2.2 Método do radical DPPH• (2,2 difenil-1-picrilhidrazina) 106

2.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO PÓLEN APÍCOLA 110

2.9 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DO PÓLEN APÍCOLA 114

2.10 ATIVIDADE E MERCADO DE PÓLEN APICOLA NO BRASIL 116

3 MATERIAL E MÉTODOS 120

3.1 MATERIAL..... 120

3.1.1 Amostras de Pólen 120

3.1.2 Preparo dos Extratos Etanólicos do Pólen (EPE) 121

3.1.2.1 Purificação dos extratos etanólicos de pólen em resina hidrofóbica 122

3.2 MÉTODOS 123

3.2.1 Proteína Total 123

3.2.2 Atividade de Água (A_w) 123

3.2.3 Umidade 123

3.2.4 Fibras 124

3.2.5 Lipídeos 124

3.2.6 Cinzas 124

3.2.7 Açúcares 125

3.2.8 Minerais 125

3.2.9 Compostos Fenólicos Totais 125

3.2.10 Flavonóides Totais 126

3.2.11 Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível 127

3.2.12 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa (CCDAE-FR) dos EPE..... 127

3.2.13 Análises Biológicas dos Extratos Etanólicos do Pólen Apícola 128

3.2.13.1 Atividade Antibacteriana dos Extratos de Pólen pelo Método de Difusão em Ágar 128

3.2.13.2 Concentração Inibitória Mínima (C.I.M.) em Meio Líquido .. 128

3.2.13.3 Atividade Antioxidante dos Extratos de Pólen 129

3.2.13.3.1 Atividade de Seqüestro do Radical DPPH• 129

3.2.13.3.2 Atividade Antioxidante pela Oxidação Acoplada do β-caroteno e Ácido Linoléico 131

3.2.14 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) 132

3.2.15 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG-MS) 133

3.2.16 Microscopia Óptica (MO) 134

3.2.17 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... 135

3.2.18 Análise Estatística 136

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 137

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PÓLEN APÍCOLA 138

4.2 EXTRATOS ETANÓLICOS DE PÓLEN (EPE) 144

4.2.1 Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível dos EPE 146

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa (CCDAE-FR) dos EPE 152

4.2.3 Compostos Fenólicos Totais e Flavonóides Totais dos EPE 154

4.2.4 Atividade Antioxidante dos Extratos de Pólen Apícola 158

4.2.4.1 Cinética de reação do DPPH: determinação do tempo de reação 158

4.2.4.2 Atividade de Seqüestro do Radical Livre DPPH 164

4.2.4.3 Atividade Antioxidante pelo Método do β-caroteno 170

4.2.5 Correlação entre Atividade Antioxidante e Compostos Fenólicos 174

4.2.6 Atividade Antibacteriana dos Extratos de Pólen Apícola (EPE) 176

4.2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) 181

4.2.8 Purificação dos Extratos Etanólicos de Pólen Apícola 186

4.2.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos de Pólen Apícola após o uso da resina

AMBERELITE XAD2 189

4.2.8.2 Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos etanólicos de pólen apícola após o uso da resina XAD2 193

4.2.9 Caracterização Palinológica 203

5 CONCLUSÕES 215

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 219

REFERÊNCIAS 220

ANEXO 1 248

1 INTRODUÇÃO

Os produtos apícolas tais como o mel, geléia real, própolis e pólen têm sido utilizados há muitos anos na medicina tradicional, assim como nas dietas e nutrição suplementar, devido a suas propriedades nutricionais e fisiológicas benéficas à saúde humana (PARK et al., 1998; KROYER e HEGEDUS, 2001).

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 por uma série de doenças que impingem na população, de forma aparentemente descontrolada, assim como reduzir despesas com saúde.

Entre os produtos naturais, o pólen vem se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas como atividade antioxidante (SOMERVILLE, 2005; ALMARAZ-ABARCA et al., 2007), quanto pela possibilidade de aplicação na indústria alimentícia, na forma de alimentos funcionais (SERRA BONVEHÍ e ESCOLÁ JORDÁ, 1997; MARCHINI et al., 2006). Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos presentes nesses produtos (KROYER e HEGEDUS, 2001; LEJA et al., 2007).

Os compostos sintéticos BHT e BHA são antioxidantes efetivos e muito utilizados na indústria de alimentos, porém podem apresentar atividades mutagênicas (NAMIKI, 1990). Neste sentido, a procura de

agentes antioxidantes naturais tem recebido atenção especial por parte dos pesquisadores de todo mundo e da indústria alimentícia.

O pólen coletado por abelhas, geralmente composto de pólen de várias espécies de plantas, pode ser considerado como uma fonte de energia e de nutrientes para o consumo humano. O pólen de abelhas contém substâncias nutricionais como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, minerais e traços de micronutrientes. Além destas, também possui quantidades significativas de substâncias polifenólicas, principalmente flavonóides.

Os flavonóides e ácidos fenólicos são considerados como os principais ingredientes do pólen apícola, podendo ser usado para padronizá-lo em relação às suas propriedades nutricionais fisiológicas e para controlar a qualidade das preparações de pólen apícola distribuídas no comércio (KROYER e HEGEDUS, 2001).

As propriedades bioativas como a atividade de seqüestro dos radicais livres (atividade antioxidante), podem ser aumentadas utilizando um solvente adequado para sua extração. Desta forma, extratos adequados de pólen apícola podem ser utilizados como alimento funcional ou suplemento alimentar, devido a quantidade de compostos fenólicos e de sua capacidade de sequestrar os radicais livres responsáveis pelo estresse oxidativo e a carcinogênese (KROYER e HEGEDUS, 2001).

Entretanto, vários autores relatam a necessidade de maiores estudos para avaliar a composição relativa das substâncias polifenólicas

no pólen apícola brasileiro e nos extratos de pólen, assim como as diferenças em suas especificidades, visando avaliar sua função e contribuição no que diz respeito a atividade antioxidante (BARRETO et al., 2006; MARCHINI et al., 2006; ALMARAZ-ABARCA et al., 2007).

Dessa forma, a caracterização físico-química e biológica do pólen se faz importante em um controle de qualidade e, até mesmo, em uma padronização do pólen brasileiro, para uma efetiva aplicação terapêutica.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto foi avaliar as características físico-químicas, biológicas e tipos polínicos do pólen apícola de *Apis mellifera* produzido na região sul do Brasil.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar a composição centesimal do pólen apícola (umidade, proteínas, lipídeos, minerais, fibras e carboidratos);

2) Determinar a concentração ótima dos extratos etanólicos de pólen para a máxima extração de compostos bioativos;

3) Determinar os teores de compostos fenólicos e flavonóides totais nas amostras de pólen;

4) Avaliar a composição química dos compostos bioativos do EPE por meio das técnicas cromatográficas de CLAE/DAD e CG-EM;

5) Avaliar as propriedades antioxidantes dos extratos de pólen apícola pelo método de seqüestro do radical DPPH e pelo método de clareamento do β-caroteno/ácido linoléico;

6) Avaliar atividade antibacteriana do EEP contra cinco microrganismos patogênicos (*Bacillus subillis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e *Klebsiella pneumoniae*) e quatro bactérias

fitopatogênicas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas vesicatoria* pv vesicatoria, *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria, *Pseudomonas syringae* pv. tomato).

7) Determinar os tipos polínicos presente nas amostras de pólen apícola por Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ABELHA *Apis mellifera* L.

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores. Durante esse processo evolutivo surgiram várias espécies de abelhas. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam mais de 40 mil espécies ainda não descobertas (PEREIRA et al., 2002).

As abelhas da espécie *A. mellifera* foram introduzidas no Brasil em 1839, oriundas do Porto, Portugal (CAMARGO,1972). Em 1956, W. E. KERR introduziu no Brasil a abelha *Apis mellifera scutellata*, originária do continente africano. A disseminação dessa abelha foi rápida pelos apiários e pastagens apícolas do Brasil, com predominância sobre as raças de abelhas existentes. Em função do rápido processo de africanização das abelhas presentes no Brasil e da ampla substituição das abelhas européias pelas africanizadas não existe mais linhagens puras dessa raça no País (KOO e PARK, 1997; FUNARI et al., 2003; BARRETO et al., 2006). As várias subespécies de *A. mellifera* foram adaptadas às diversas condições ambientais e, atualmente, tem uma enorme população fora de controle. A Figura 1 mostra abelhas da espécie *A. mellifera* em sua colméia.

FIGURA 1 - ABELHA *Apis mellifera L.* SOBRE O FAVO DA COLMÉIA
FONTE: BREYER (2007)

A colônia de abelhas é constituída por uma grande sociedade que é variável de acordo com a disponibilidade de alimento, época do ano e com a região. Em cada colônia existe cerca de 80.000 abelhas, a grande totalidade sendo operárias, uma rainha e de 0 a 400 zangões. A abelha rainha tem por função a postura dos ovos e a manutenção da ordem social na colméia, as operárias realizam todo o trabalho para a manutenção da colméia, executam atividades distintas de acordo com a idade por conta do desenvolvimento glandular e das necessidades diferenciadas da colônia e os zangões são os indivíduos machos da colônia cuja única função é fecundar a rainha durante o vôo nupcial (WIESE, 1995).

A produção de mel, assim como também a produção de geléia real, cera, pólen e própolis aumentaram consideravelmente com as abelhas africanizadas. Além disso, as abelhas do gênero *Apis* são as que mais se prestam para a polinização, ajudando enormemente a agricultura (PEREIRA et al., 2002). Recentemente, colônias de abelhas africanizadas têm sido alugadas por produtores brasileiros e de outros países para a

polinização de uma grande variedade de culturas: café, maçãs, pêras, frutas cítricas, melões e kiwis, além de outras frutas e vegetais. Abelhas melíferas, auxiliadas por técnicas de criação bem desenvolvidas, são também usadas como o principal agente de polinização agrícola no Hemisfério Norte (MC GREGOR, 2006).

2.2 PÓLEN APÍCOLA

Pólen é o elemento fecundante masculino da flor, que atraído pelo ovário da mesma fertiliza para formar as sementes, garantindo a reprodução da planta. Polens são pequenos grânulos de dimensões microscópicas, em média 50 µm. É o elemento reprodutivo das plantas, produzido pelas anteras nos estames, órgão masculino da flor (Figura 2). É formado por minúsculos grãos, localizados nas anteras dos estames da flor de onde é coletado pelas abelhas e levados para a colônia para utilização no preparo do alimento das larvas jovens em decorrência do alto valor nutritivo, rico em proteínas, minerais e vitaminas (WIESE,1995).

.

FIGURA 2 - ESTAMES COM ANTERAS EVIDENTES, CARREGADAS DE PÓLEN.
FONTE: TIOSAM (2007)

As abelhas (*A. mellifera*) coletam o pólen das flores que adere aos pelos do seu corpo quando em contato com os estames. Em seguida eles são escovados com os **pentes tibiais**, e os grãos aglutinados em **bolotas** ou grânulos (BREYER, 2007) (Figura 3).

FIGURA 3 - ABELHA COLETANDO PÓLEN DAS FLORES
FONTE: BREYER (2007)

Depois de pousar em várias flores a abelha começa a recolher os grãos de sua cabeça, tórax e abdômen, transferindo-os com ajuda das patas dianteiras e intermediárias e colocando-os na corbículas (Figura 4).

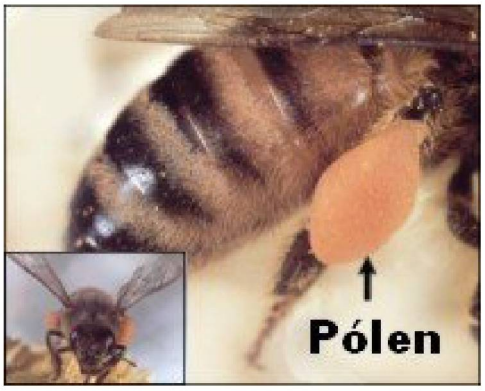


FIGURA 4 - GRÃO DE PÓLEN NA CORBÍCULA DA ABELHA
FONTE: BREYER (2007)

A abelha transporta o pólen até a colméia, onde é depositado nos alvéolos dos favos, comprimido com a cabeça das operárias para obter uma massa compacta que sofre transformações sob ação da temperatura, umidade e enzimas salivares, sendo misturado com o néctar para formar o *pão das abelhas*.

O pólen é a utilizado no preparo do alimento das larvas jovens em decorrência do alto valor nutritivo, rico em proteínas, minerais e vitaminas (WIESE,1995). As abelhas só produzem geléia real a partir da matéria liberada pela digestão do pólen, que é metabolizado pelas células das glândulas hipofarígeanas das abelhas nutrizes.

As pesquisas mostram que uma colméia populosa chega a consumir 35 kg de pólen para alimentação das crias. Para coletar 250g de pólen as abelhas necessitam de 17 mil vôos. A necessidade diária de pólen de uma abelha operária é da ordem de 145 mg e é necessária a visita a 84 flores para uma abelha completar uma carga de pólen, que pesa até 15mg (BREYER, 2007).

Cada pólen tem suas características específicas ligadas às espécies florais e cultivares visitadas pelas abelhas. O pólen pode ser monofloral, quando há uma única origem botânica mantendo as propriedades organolépticas e bioquímicas da planta original. Quando a oferta de plantas poliníferas na área em volta do apiário não é suficiente, as abelhas visitam outras flores ou misturam *pellets* de pólen de várias flores. Esse pólen passa a ser chamado de heterofloral ou polifloral e possui propriedades bioquímicas variadas (BARRETO et al., 2006).

O pólen é necessário às abelhas como alimento protéico e desta forma ele é consumido pelas operárias para a produção de cera e geléia real. É ainda fornecido às larvas que possuem um desenvolvimento rápido, pois em apenas seis dias as larvas que eclodiram dos ovos multiplicam muitas vezes seu peso e tamanho. Desta forma elas necessitam de um alimento rico para que possam conseguir este grande desenvolvimento num período de tempo tão curto (BREYER, 2007).

Ao retornar à colméia as abelhas atravessam armadilhas, deixando cair o pólen nos coletores colocados pelos apicultores que é recolhido diariamente para ser processado. Os coletores de pólen são constituídos essencialmente por trampas com perfurações de aproximadamente 4,5 mm de diâmetro para permitir que as abelhas ao atravessarem deixem cair as bolotas de pólen presas em suas patas traseiras (MAGALHÃES, 2005) (Figura 5).

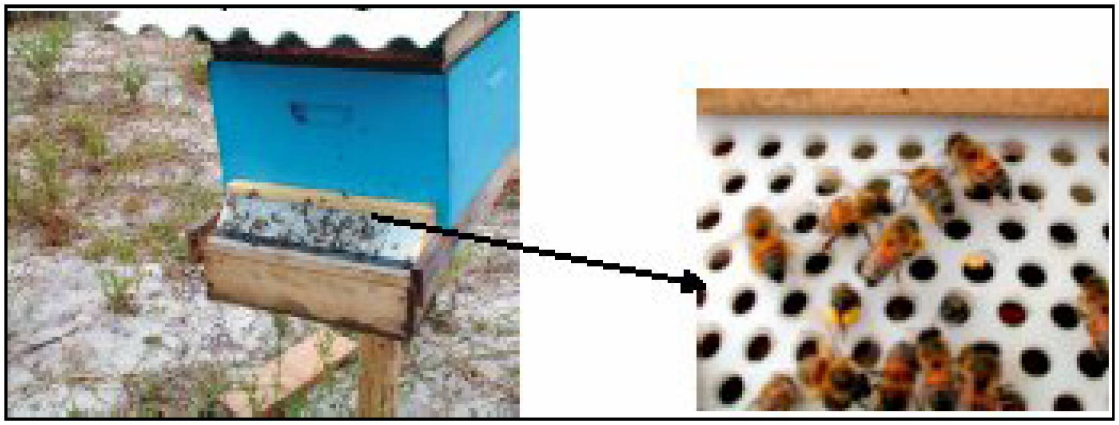


FIGURA 5 - COLETORES DE PÓLEN COLOCADO NA FRENTE DO ALVADO
FONTE: MAGALHÃES (2005)

Essas bolotas de pólen são recolhidas em uma bandeja (caixa ou gaveta) que é recoberta por uma tela de arame, de forma que

permaneçam isoladas da colméia e as abelhas não possam recolhê-las novamente (Figura 6).

FIGURA 6 - GAVETA DE RECOLHIMENTO DO PÓLEN
FONTE: MORETI (1995)

2.2.1 Beneficiamento do Pólen Apícola

A coleta do pólen apícola é feita diariamente e ao final da tarde. O pólen, depois de retirado das gavetas coletoras, é transferido para baldes de polietileno com tampas de pressão e colocados em freezer, onde permanecerá até o prazo máximo de 15 dias (Figura 7) (MAGALHÃES, 2005). Segundo Barreto et al. (2006) o pólen apícola dever permanecer congelado por no mínimo 48 horas, para destruição de possíveis ácaros, ovos ou larvas de traças de cera (*Galleria* sp.) e de outros insetos. O congelamento imediato controla o desenvolvimento de microrganismos relacionados à microflora normal contida no pólen.

FIGURA 7 - COLETA DO PÓLEN POR APICULTORES
FONTE: MAGALHÃES, 2005

Cada pólen tem suas características específicas ligadas à origem floral, mas a qualidade do produto final também depende do processo de limpeza, secagem, embalagem e armazenagem. O processamento do pólen consiste de várias etapas e tem a função de transformar o pólen apícola em pólen apícola desidratado, como forma de aumentar a vida-de-prateleira e manter as suas propriedades (BARRETO et al., 2006).

Após o descongelamento gradativo e em geladeira (4 a 8 horas) o pólen é seco em estufa de circulação forçada com temperatura entre 40 a 42ºC. O pólen chega do campo com umidade variável entre 12 a 30% e deve ficar no mínimo com 2% e no máximo com 4% de umidade. O tempo de secagem depende da umidade inicial e varia de 12 a 70 horas. O pólen é distribuído uniformemente em bandejas com espessura de 1,5cm (Figura 8).

FIGURA 8 - ESTUFA SECADORA DE PÓLEN APÍCOLA
FONTE: MAGALHÃES, 2005.

De acordo com Marques (2000), após a desidratação os grãos de pólen são classificados por tamanho em uma seqüência de peneiras granulométricas. É também aplicado um jato de ar seco para a remoção de sujeiras. Os grumos maiores de pólen são desfeitos e o pó de pólen é retirado pela parte inferior do equipamento. Após a limpeza mecânica é feita uma limpeza manual para a retirada de eventuais materiais estranhos e sujidades como asas e pernas de abelhas, larvas secas, bolotas de própolis que possuem a mesma densidade do pólen e que não são retiradas pela caixa de aeração (Figura 9).

Após a limpeza manual o pólen é envasado em potes de vidros ou plásticos para a comercialização. O armazenamento deve ser em ambiente seco com temperatura amena e ao abrigo da luz (BARRETO et al., 2006).

FIGURA 9 - SEPARADOR DE PÓLEN APÍCOLA
FONTE: MAGALHÃES (2005)

A produção de pólen apícola no Brasil representa uma atividade recente que teve início no final da década de 80. Segundo vários autores, o País tem potencial para ser um grande produtor de pólen, devido principalmente a riqueza e a diversidade da flora aliada ao clima tropical e a eficiência das abelhas africanizadas (SALOMÉ e SALOMÉ, 1998; BARRETO et al., 2006).

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PÓLEN APÍCOLA

A composição química do pólen varia com a origem floral, condições ambientais, climáticas, geográficas, idade e estado nutricional da planta e estações do ano. O pólen apícola contém substâncias nutricionais como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, macro e microelementos minerais. Além disto, o pólen também contém quantidades significativas de substâncias polifenólicas, principalmente da classe dos flavonóides (ANDRADE et al., 1999).

Em geral, o pólen apícola possui 15 a 30% de proteínas, sendo que grande parte da composição protéica do pólen se apresenta na forma de aminoácidos livres (10 a 13%). Além de proteínas o pólen possui 20 a 40% de açúcar total, 20 a 26% de açúcar redutor e baixo teor de lipídeos, entre 1,0 a 5%. O pólen possui 3 a 5% de fibras e 2,5 a 3,5% de sais minerais (DONADIEU, 1979).

O pólen também contém vitaminas como tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxina, meso-inositol, biotina e ácido fólico, além de aminoácidos como alanina, arginina, cisteina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina entre outros. No entanto, Almeida-Muradian et al. (2005) analisaram dez amostras de pólen apícola da Região Sul do Brasil e não encontraram vitamina C e β-caroteno.

Analisando 20 amostras de pólen apícola de várias regiões da Espanha, Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997) encontraram altos índices

de prolina, 63,1% dos aminoácidos livres totais, 15,3% de proteínas, 32,9g/100g de açúcares redutores e baixos teores de ácidos graxos saturados, que faz do pólen um complemento alimentar de excelente qualidade nutricional. Os mesmos autores também encontraram uma grande variedade de minerais, onde o potássio foi predominante (59% do total), seguido pelo fósforo, cálcio, sódio e magnésio (39,9%). Os elementos ferro e zinco encontrados no pólen perfazem 15% da dose diária recomendada (RDA), sendo que o teor de zinco chega a se apresentar em maior proporção do que em outros produtos apícolas. Segundo Wesh e Marston (1983), a presença de zinco, cobre, ferro e uma alta taxa de potássio/sódio tornam o pólen apícola um alimento interessante para dietas com um balanço eletrolítico definido.

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 seqüestradores 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% com no extrato etanólico.

Uma quantidade mínima de 2g/100g de aminoácidos livre foi sugerida para padronização do pólen no mercado europeu. A determinação de flavonóides são um indicador de qualidade do produto assim como o índice de aminoácidos livres. O estabelecimento dos

parâmetros e o desenvolvimento de um marcador da qualidade podem facilitar a inclusão do pólen apícola no mercado europeu (SERRA BONVEHÍ et al., 2001).

Alencar (2002) avaliando a composição química do mel de diferentes regiões do Brasil verificou que os flavonóides presentes eram exclusivamente agliconas que podem ser parcialmente oriundos dos flavonóides contidos no pólen, resultantes da hidrólise pelas enzimas presentes na saliva das abelhas. O autor relata a importância de mais estudos para se verificar a existência de flavonóides, principalmente a quercetina, no néctar do alecrim do campo. Este parâmetro poderá funcionar como um marcador químico da origem botânica dos produtos apícolas.

2.3.1 Compostos Fenólicos em Plantas

Em termos de ação biológica, a principal classe de constituintes do pólen é a dos compostos fenólicos. Essas substâncias caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligada diretamente a um anel aromático. O composto mais simples é o fenol (Figura 10) e está amplamente distribuído no reino vegetal e em microrganismos, fazendo parte também do metabolismo animal (BRAVO, 1998).

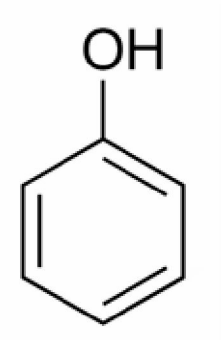


FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DE UM FENOL SIMPLES
FONTE: BRAVO (1998).

No entanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, neste caso, a síntese dos compostos fenólicos em pequena quantidade é feita utilizando o anel benzênico de substâncias ingeridas na dieta. Por outro lado, os vegetais e a maioria dos microrganismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico e, a partir dele, produzir diferentes tipos de compostos fenólicos (SIMÕES, 2001).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no estado livre, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Esses compostos são muito reativos quimicamente, possuem em geral características ácidas e podem ser isolados por meio da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (por exemplo, solução de carbonato de sódio).

Os compostos fenólicos podem formar pontes de hidrogênio, e estas podem ser tanto intramoleculares quanto intermoleculares. Os compostos fenólicos apresentam intensa absorção na região do ultravioleta e uma característica importante é a complexação com metais,

sendo que muitos desses quelatos metálicos são importantes em diversos sistemas biológicos. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, luz, calor ou em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou composto isolados (SIMÕES, 2001).

2.3.2. Síntese e Classificação dos Compostos Fenólicos

Bravo (1998) classificou os compostos fenólicos presente nos alimentos em 13 categorias distintas, enquanto que Harborne (1989) classificou-os de acordo com o número de carbonos conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Classe de compostos fenólicos	Estrutura básica
Fenóis simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos fenólicos	C_6-C_1
Acetofenonas e ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_4
Xantonas, benzofenonas	C_6-C_1-C_6
Estilbenos, antraquinonas	C_6-C_2-C_6
Flavonóides, isoflavonóides e chalconas	C_6-C_3-C_6
Lignanas	$(C_6$-$C_3)_2$
Diflavonóides	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$
Melaninas vegetais	$(C_6)n$
Ligninas	$(C_6$-$C_3)n$
Taninos hidrolisáveis	$(C_6$-$C_1)n$
Taninos condensados	$(C_6$-C_3-$C_6)n$

FONTE: HARBORNE (1989)

Segundo Harborne (1989), os compostos fenólicos podem ser formados por meio de duas rotas biogenéticas: a via do ácido chiquímico a partir de carboidratos ou a via do acetato-polimalato que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas

dispostos em *meta* (DEWICK, 1998). Tirosina e ácidos cinâmicos são formados a partir da fenilalanina amônio liase (PAL) pela via do ácido chiquímico (Figura 11).

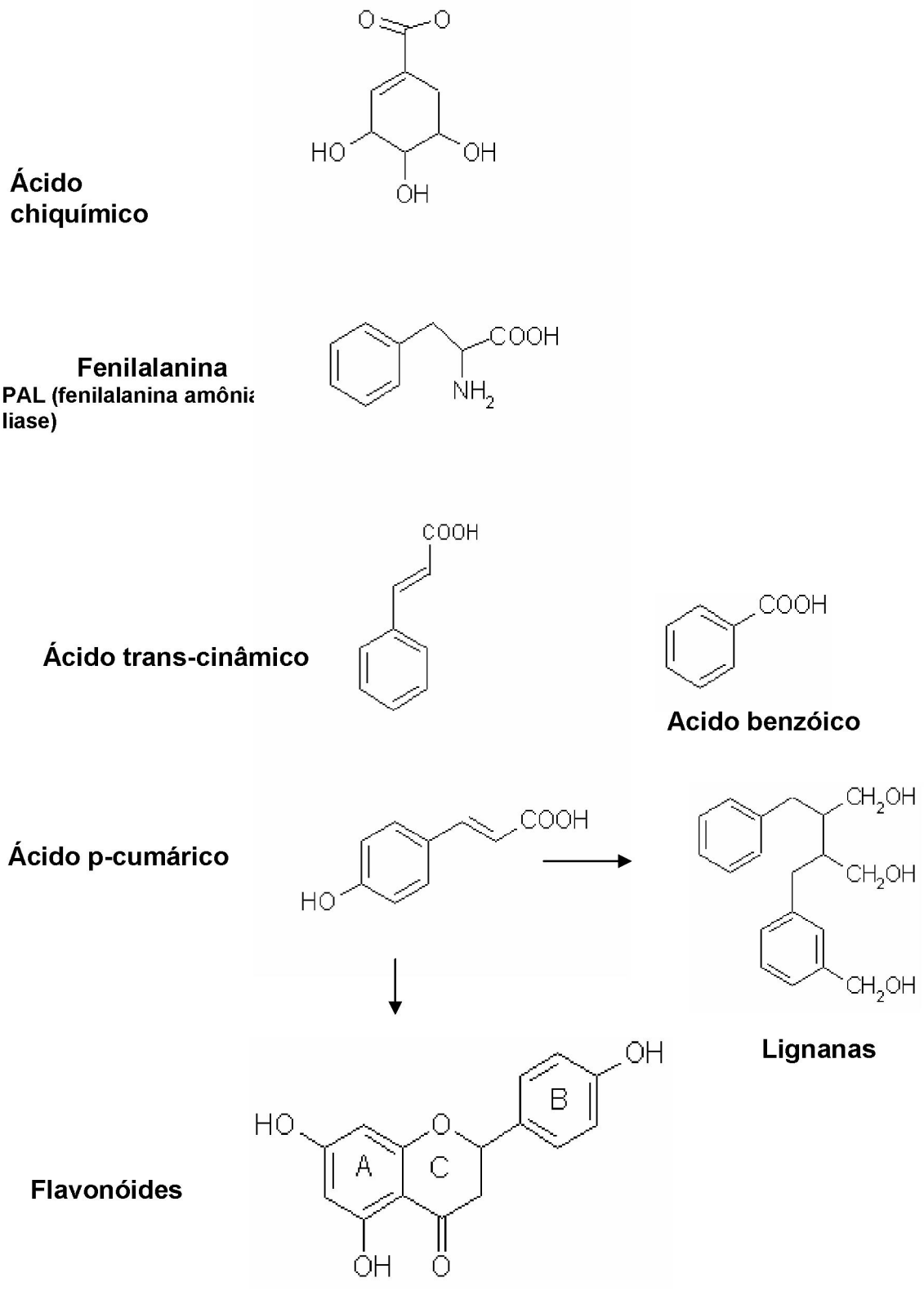


FIGURA 11 - VIA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO PARA BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.
FONTE: SHAHIDI e NACZK (2004)

2.3.2.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos principais: ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e cumarinas. O primeiro possui sete átomos de carbono (C6-C1) e, são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza (Figura 12). O segundo é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos e possuem nove átomos de carbono (C6-C3) (Figura 13). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 14) (SOARES, 2002).

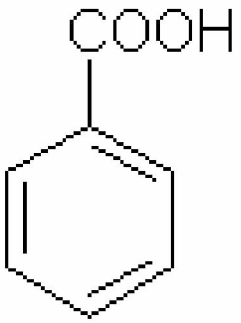


FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO BENZÓICO
FONTE: SOARES (2001).

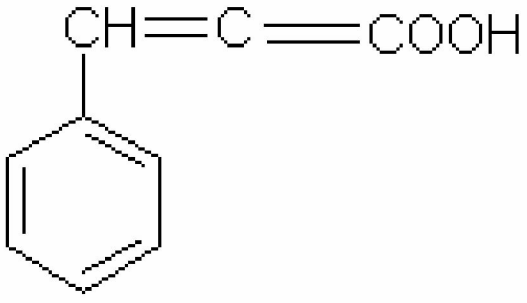


FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CINÂMICO
FONTE: SOARES (2001).

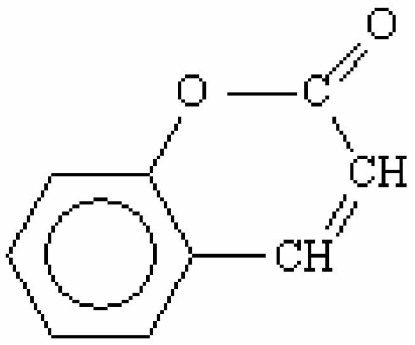


FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA
FONTE: SOARES (2001).

Os ácidos derivados do ácido benzóico sofrem substituições nas posições *meta* e *para* dando origem, por exemplo, ao ácido gálico (MAMEDE e PASTORE, 2004). O ácido hidroxicinâmico e seus derivados como *p*-cumárico, caféico, ferrúlico e sinápico são originados do metabolismo da fenilalanina ou tirosina.

Os ácidos p-cumárico, ferrúlico, caféico e sinápico são os ácidos cinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos são encontrados nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico (álcool-ácido-cíclico) esterificado ao ácido caféico. Alguns ésteres do ácido caféico são alergênicos e responsáveis pela ocorrência de dermatites em indivíduos sensíveis. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (HARBORNE, 1973; BELITZ e GROSCH, 1987). Os fenóis ácidos encontram-se distribuídos na casca e na polpa da uva e seus teores diminuem com o amadurecimento e também durante a fermentação do vinho (MACHEIX et al., 1991).

No grupo dos ácidos benzóicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Esses dois grupos de ácidos fenólicos possuem atividade antioxidante (HARBORNE, 1973). Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula e também com a proximidade do grupo -CO_2H com o grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição *meta* (BRAVO, 1998).

Em geral, a atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzóicos. A presença do grupo –CH=CH-COOH na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Provavelmente, há conjugação da dupla ligação do grupo –CH=CH-COOH com as duplas do anel. Deve-se destacar que o ácido gálico apresenta atividade antioxidante maior do que a catequina (flavonóide), que conta com cinco grupos hidroxilas em sua estrutura (RICE-EVANS et al., 1996).

2.3.3 Compostos Fenólicos de Pólen

Serra Bonvehì et al. (2001) identificaram treze compostos fenólicos no pólen apícola da Espanha, entre eles sete foram ácidos fenólicos como: ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *p*-

cumárico, ácido *o*-cumárico, éster etílico do ácido 4-hidroxibenzóico, ácido trans-cinâmico e os flavonóides rutina, quercetina, miricetina, kanferol e isoramnetina.

Atualmente, o interesse nos compostos fenólicos tem aumentado devido às habilidades antioxidantes e de seqüestrar os radicais livres, prejudiciais à saúde humana (GARCÍA et al., 2001). O pólen apícola contém nutrientes essenciais e são indicados para serem usadas pela considerável quantidade de substâncias polifenólicas com possível atividade antioxidante. Os principais ácidos fenólicos encontrados em pólens apícolas estão apresentados na Figura 15.

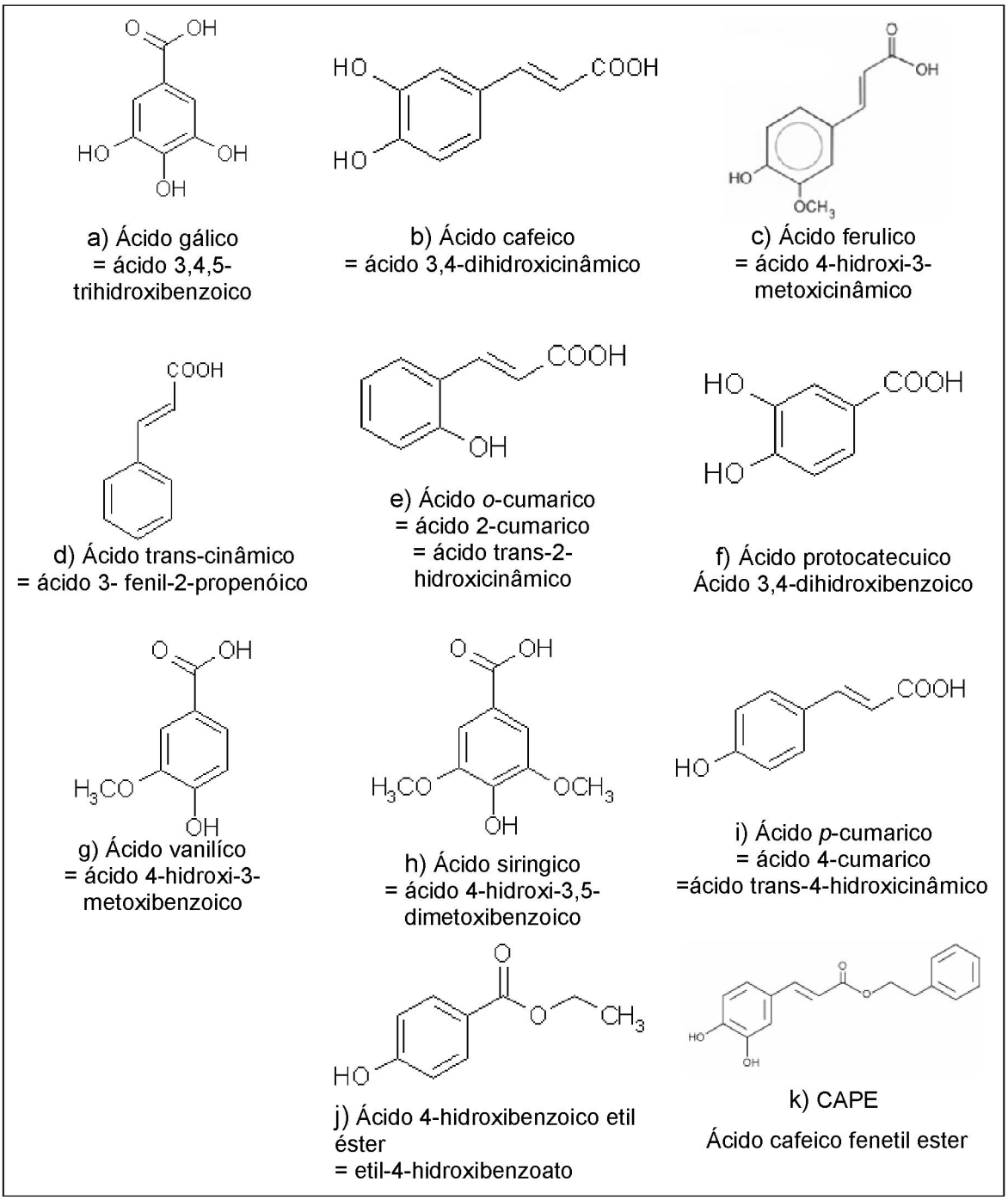


FIGURA 15: ÁCIDOS FENÓLICOS GERALMENTE ENCONTRADOS EM PRODUTOS APÍCOLAS.

FONTE: SERRA BONVEHÍ et al. (2001).

2.3.4 Flavonóides

Os flavonóides são os mais importantes grupos de compostos fenólicos em alimentos. Sua estrutura comum é o difenil propano (C_6-C_3-C_6), e consistem de dois anéis aromáticos interligados por três carbonos que geralmente forma uma estrutura heterocíclica oxigenada (BRAVO, 1998).

O sistema de numeração usado para diferenciar as posições dos carbonos ao redor da molécula dos flavonóides, por conveniência, utiliza numeral ordinário para os anéis A e C, sendo seguidos de apóstrofo para o anel B (Figura 16).

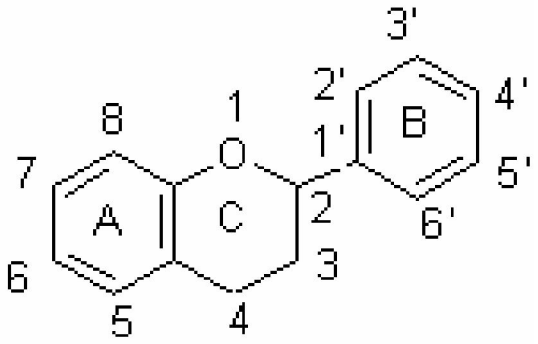


FIGURA 16 – NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C
FONTE: COOK e SAMMAN (1996).

Para os flavonóides em que o anel C não é formado, a numeração seguida de apóstrofo é utilizada para o anel A, e os carbonos que unem os anéis A e B são designados α e β, em relação à carbonila (Figura 17). Os flavonóides ocorrem na forma de agliconas, embora mais comumente se encontre como derivados de glicosídeos (BRAVO,1998). As atividades

bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de suas estruturas químicas e da orientação das várias posições na molécula (COOK e SAMMAN, 1996).

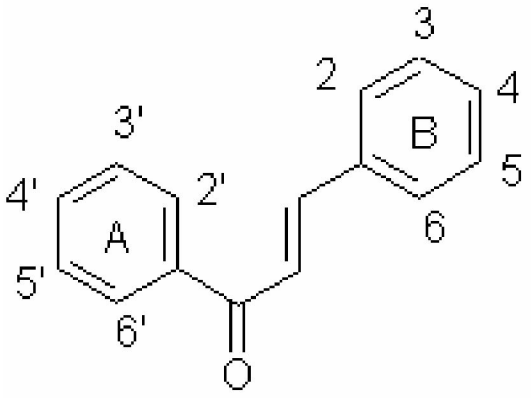


FIGURA 17 – NUMERAÇÃO DE UM FLAVONÓIDE SEM ANEL C.
FONTE: COOK e SAMMAN (1996).

A estrutura química dos flavonóides favorece sua ação antioxidante. Os hidrogênios dos grupos hidroxilas adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) de algumas moléculas de flavonóides fornecem a estes compostos alta atividade antioxidante (RICE-EVANS et al. 1996).

Os flavonóides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) visível e dessa maneira apresentam um papel de defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar. Uma idéia da riqueza espectral dos compostos fenólicos e flavonóides foram sumarizadas por Adelmann (2005) e apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - COMPRIMENTO DE ONDA DE ABSORÇÃO DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDES

Classe dos Flavonóides	Exemplos	Solvente	Faixa espectral da absorção (nm)	$\lambda_{máx}$ (nm) principal e (secundário)
Antocianinas	Cianidina-3-rutinosídeio	0,01% HCl em metanol	269-289 310-333 495-538	523 (290)
Flavonas	Leteolina	Etanol	248-286 332-356	350 (255;268)
Flavonóis	Quercetina; Canferol; Miricetina	Etanol	252-268 345-379	368 (268)
Flavononas	Naringenina	Etanol	215-233 278-290 312-335	325 (290;224)
Isoflavonas	Genistina	Etanol	241-275 296-302 320-335	262 (330)
Chalconas	Neoplatimenina	95% etanol	235-266 320-385	393 (268;320)
Auronas	Hispidol	95% etanol	234-272 254-355 388-413	388 (234;254)
Xantonas	Mangiferina	95% etanol	230-245 250-265 305-330 340-400	258 (242;316;364)

Fonte: ADELMANN (2005).

Os flavonóides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser considerada como devido à existência do anel A e a banda I devido ao anel B. O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (MARCUCCI, 1998). Então, de um

modo geral, apresentam uma maior absorção na faixa entre 250 e 350 nm (PARK et al., 1995).

2.3.5 Síntese e Classificação dos Flavonóides

Alguns compostos fenólicos de massa molecular intermediários, tais como, os flavonóides (C_6-C_3-C_6), são produzidos pela combinação dos dois mecanismos (pela via do ácido chiquímico e via do acetato-polimalato). Segundo O'connel e Fox (2001), o anel aromático A dos flavonóides é derivado do acetato (resorcinol ou fluoroglucinol), enquanto o anel B é produzido pela via metabólica do ácido chiquímico (Figura 11).

Com mais de 8000 compostos individuais conhecidos, os flavonóides são biosintetizados a partir de um derivado do ácido cinâmico (*trans*-4-coumarato), sintetizado a partir do metabolismo dos aminoácidos, fenilalanina ou tirosina, que age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de malonato (malonato coenzima A), a qual leva a formação de chalconas que posteriormente ciclizam-se sob condições ácidas (SAHIDI e NACZK, 2004) (Figura 18). Desta forma os flavonóides têm o esqueleto básico de difenilpropano (C_6-C_3-C_6) com diferentes níveis de oxidações do anel pirano central (BRAVO, 1998).

As atividades bioquímicas dos flavonóides e seus metabólitos dependem da estrutura química e da orientação relativa das várias posições das moléculas. De acordo com as características químicas e

biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes. As classes dos flavonóides variam em sua estrutura característica ao redor do anel C, e são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não do anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado (MARCUCCI, 1998).

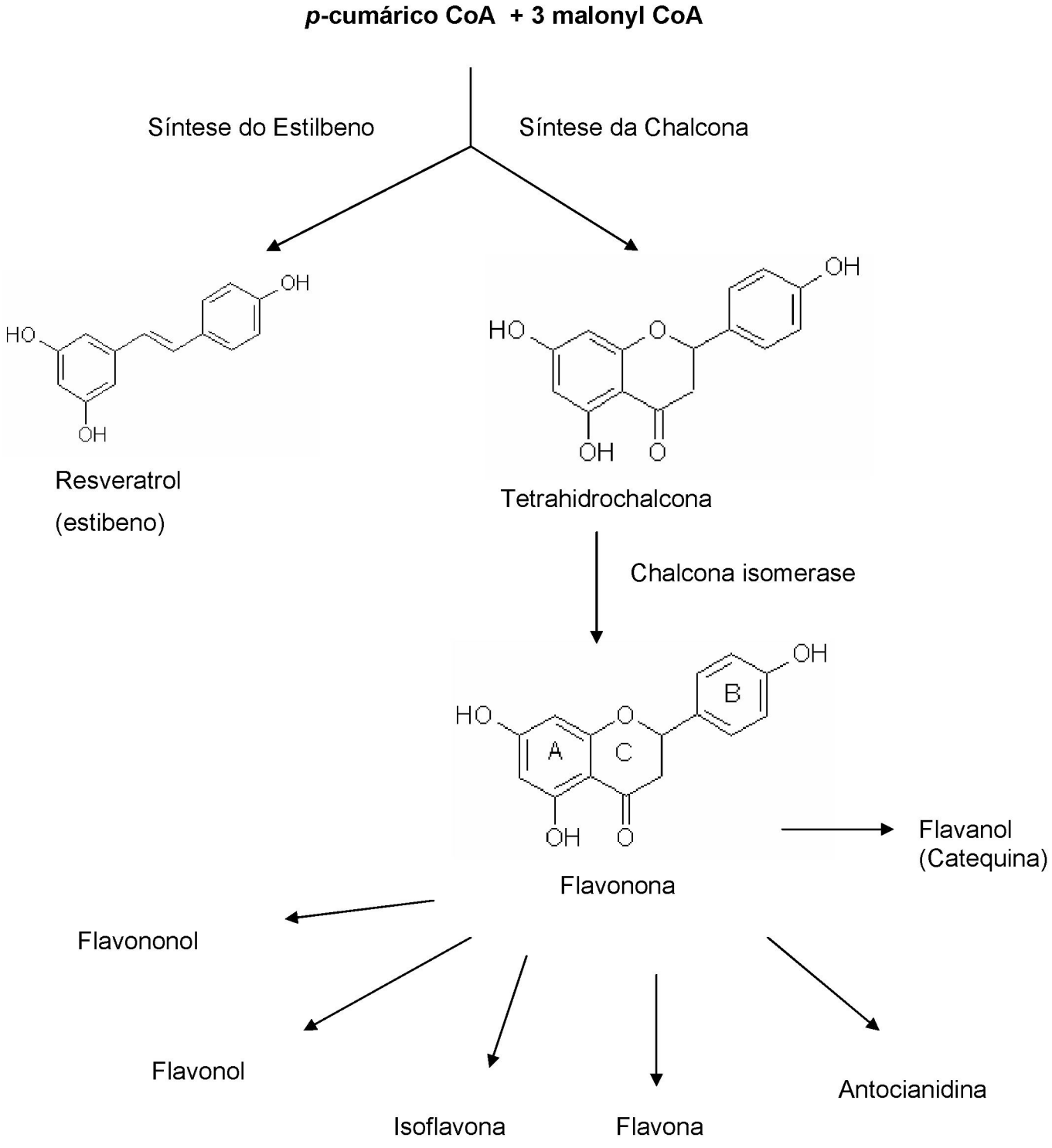


FIGURA 18 – PRODUÇÃO DE FLAVONÓIDES A PARTIR DE FENILPROPANÓIDES (P-CUMARIL CoA) E MALONIL CoA.
FONTE: SHAHIDI e NACZK (2004).

Cook e Samman (1996) classificaram os flavonóides em 8 grandes grupos, conforme mostrado na Figura 19. Com exceção das chalconas, todos os flavonóides possuem um anel pirânico (com heteroátomo de oxigênio).

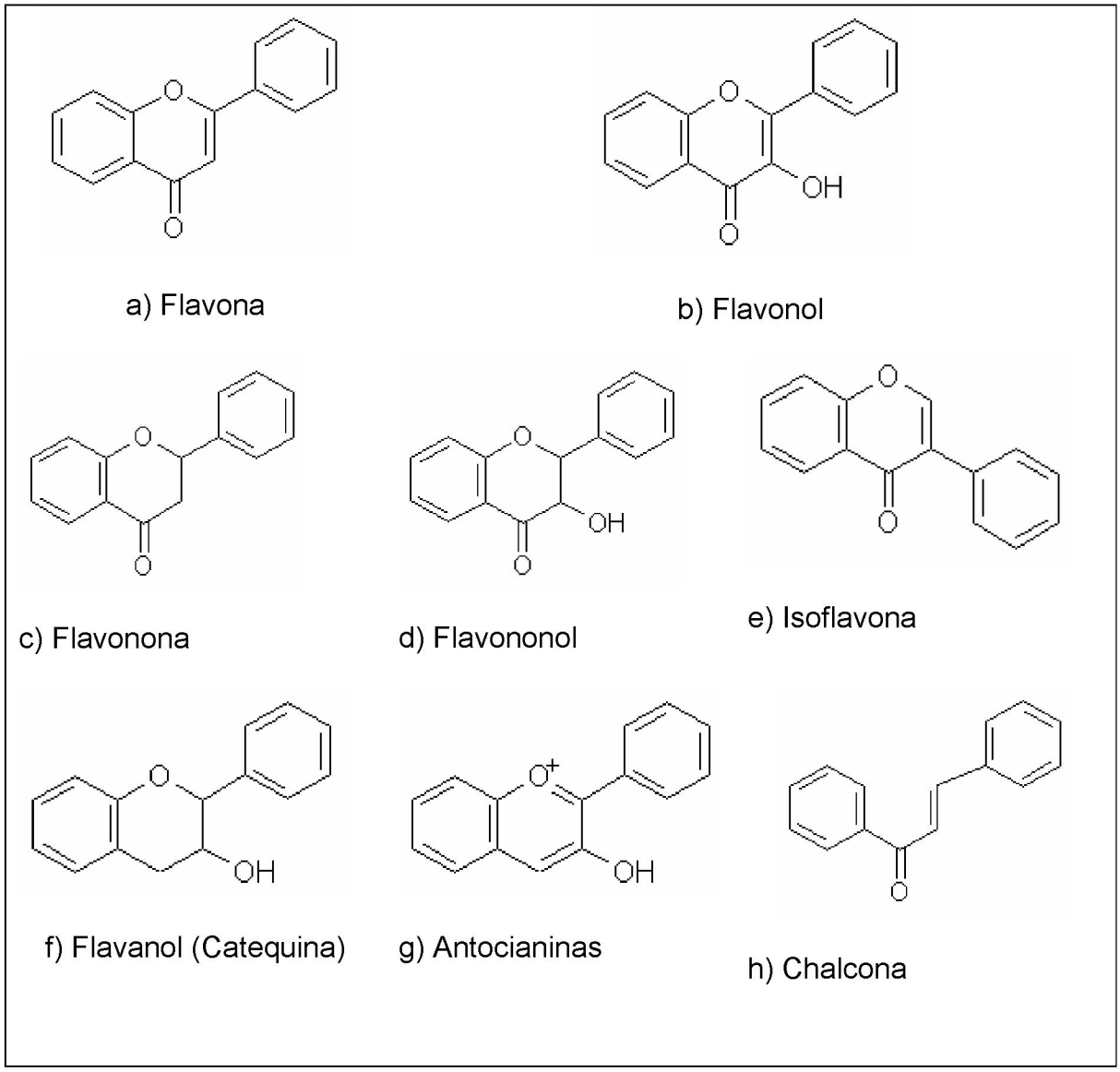


FIGURA 19 – ESTRUTURAS QUÏMICAS DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE FLAVONÓIDES.
FONTE: COOK e SAMMAN (1996).

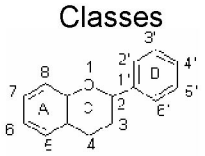
Segundo Shaidi e Naczk (2004), no caso dos flavonóides e isoflavonóides, dependendo dos pontos de substituições e de insaturações podem-se formar as flavonas, flavononas, flavonóis, flavononóis, flavanóis (flavan-3-óis) e compostos a estes relacionados. As flavonas e flavonóis ocorrem como agliconas em alimentos; aproximadamente 200 flavonóis e um pouco mais de 100 foram identificadas em plantas. Estes compostos possuem uma dupla ligação entre o C-2 e C-3. Os flavonóis são diferenciados das flavonas por possuírem uma hidroxila na terceira posição.

Dentro de cada classe, flavonóides individuais podem variar em função do número e da distribuição das hidroxilas, assim como do grau de alquilação ou de glicosilação. As flavononas e flavononóis são caracterizados pela presença de uma ligação saturada entre os C-2 e C-3 e de um grupo carbonila na posição 4. Os flavononóis diferem das flavononas por possuírem uma hidroxila no posição 3 e são muitas vezes referenciadas como 3-hidroxiflavononas ou dihidroflavonóis (COOK e SAMMAN, 1996) (Figura 19).

O termo flavonóide é derivado do latim *flavus*, que significa amarelo, porém observa-se que o grupo flavonona (ex. pinocembrina) é incolor e que a classe das antocianinas possui substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (LOPES et al., 2000). As antocianinas são antocianidinas que possuem grupos glicosídicos e estão presentes em muitas flores e frutos. As chalconas e flavonas possuem coloração amarela e as antocianinas são pigmentos solúveis em água responsáveis pela cor vermelha, azul e violeta das frutas e de outros

alimentos (MAZZA e MINIATI, 1993; MAZZA, 1998). A Tabela 3 fornece alguns exemplos de flavonóides que ocorrem naturalmente em alimentos e seus substituintes na estrutura molecular do flavonóide.

TABELA 3 - DIFERENTES CLASSES DE FLAVONÓIDES, SEUS SUBSTITUÍNTES E FONTES DIETÉTICAS.

Classes 	Nomes	Substituintes	Fonte dietética
Chalcona	Buteína	2,4,3', 4' –OH	Vegetais variados
(sem ligação 1-2)	Ocanina	2, 3, 4,3', 4' –OH	Vegetais variados
Flavona	Crisina	5,7 – OH	Peles das frutas
	Apigenina	5,7,4' –OH	*parsley*, *celery*
	Rutina	5,7,3',4' –OH; 3 – rutinose	Trigo mourisco, frutas cítricas, pimenta vermelha, vinho tinto, pele de tomate
Flavonona	Naringin	5,4'-OH; 7-ramnoglucose	Frutas cítricas, uva
	Naringeninia	5,7,4'- OH	Frutas cítricas
	Taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	Frutas cítricas
	Hesperidina	3,5,3'-OH, 4'-OMe; 7-rutinose	Laranjas
	Isosacuranetina	5,7-OH; 4'-OMe	Frutas cítricas
Flavonol	Canferol	3,5,7,4'-OH	*Leek*, brócolis, endives, uva, chá preto
	Quercetina	3,5,7,3'4'-OH	Cebola, berries, alface, brócolis, tomate,chá, macã, azeite de oliva
Flavononol	Engeletin	3,5,7,4'-OH; 3-*O*-ramnose	Pele de uva branca
	Genistin	5,4'-OH; 7- glucose	Soja
Isoflavona	Genisteína	5,7,4'-OH	Soja
	Daidzina	4'-OH, 7-glucose	Soja
Flavanol	Catequina	3,5,7,3',4'-OH	Chá
	Galocatequina	3,5,7,3',4',5'-OH	Chá
Antocianidina	Epigenidina	5,7,4'-OH	Frutas estocadas Cereja, *raspberry*,
	Cianidina	3,5,7,4'-OH;3,5-OMe	morango

FONTE: SHAHIDI e NACZK (2004).

2.3.6 Flavonóides Presentes no Pólen

A maioria dos flavonóides existente no pólen está na forma glicosilada, ou seja, um açúcar é ligado em uma ligação semiacetal em um ou mais grupos hidroxílicos da molécula. Os compostos fenólicos livres são chamados de agliconas e aparecem *in vivo* pela ação das enzimas glicosidases. A D-glicose, D-galactose e L-ramnose são os açúcares mais freqüentemente encontrados nos flavonóides. Alguns dissacarídeos e trissacarídeos são ocasionalmente ligados aos flavonóides, como é o caso da rutina (SERRA BONVEHI et al. 2001).

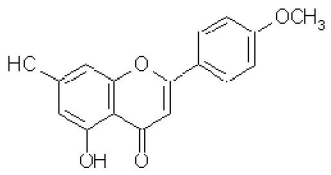
Na colméia, as bolotas de pólen são misturadas com mel e secreções glandulares hipofarigeanas das abelhas com a presença de enzimas hidrolíticas do tipo α- e β-glicosidase. Desta forma, agliconas são encontradas no estado livre e o acúmulo de quercetina no pólen desidratado é evidentemente devido à atividade da glicosidase. Várias teorias sugerem que os flavonóides estão envolvidos no metabolismo e crescimento, outros têm focado a proteção passiva e como um atrativo para algum vetor de polinização. A determinação quantitativa dos flavonóides glicosilados é difícil porque a maioria dos padrões não estão comercialmente disponíveis. A hidrólise de todos os glicosídeos a agliconas oferece um procedimento prático para a determinação quantitativa dos flavonóides. No pólen apícola este procedimento não é necessário porque as secreções glandulares hipofaringeanas das abelhas hidrolizam os flavonóides heterosídeos a agliconas livres, aumentando assim a possível atividade biológica do produto.

Os flavonóides, por serem pigmentos presentes em todas as células fotosintetizadoras, são encontrados em ervas, legumes, frutas, mel e por conseqüência dentre outros produtos de consumo cotidiano (LOPES et al. 2000; HAVSTEEN, 2002). As flavononas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, as flavonas em plantas utilizadas para condimentos, os isoflavonóides em legumes, as antocianinas e catequinas em frutas e flavonóis em todas as frutas e vegetais (PETERSON e DWYER, 1998). Os nutricionistas estimam que a ingestão média de flavonóides em uma dieta normal é de 1–2g por dia (HAVSTEEN, 2002), e por serem consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular, esses compostos desempenham um importante papel na saúde humana.

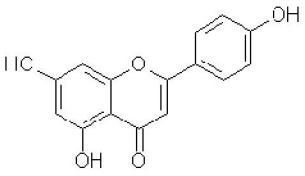
Tomas-Barberan et al. (1989) mostraram que o pólen apícola de *jara* contém principalmente quercetina e isoramnetina-3-glicosídeo e traços de miricetina e canferol-3-glicosídeo. Estes flavonóides são iguais aos encontrados no pólen de *jara*, sugerindo que estes flavonóides podem ser usados como marcadores químicos. Similarmente o composto 8-metoxicanferol-3-glicosídeo pode ser considerado um marcador químico de pólen, desde que esteja presente somente no pólen de amêndoas. Assim, os padrões de flavonóides característicos dos pólens apícolas podem ser usados como marcadores bioquímicos da planta que deu origem (CAMPOS et al., 1997; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1989).

Na Figura 20 são mostradas as estruturas de flavonóides comumente encontrados em produtos apícolas: o canferol, a miricetina, a quercetina, isoramnetina e a galangina que são flavonóis; a rutina,

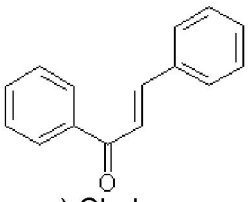
canferide, a apigenina, a acacetina e crisina são exemplos de flavonas; a naringenina, naringina, pinocebrina e sakuranetina são flavononas (SERRA BONVEHI et al., 2001).



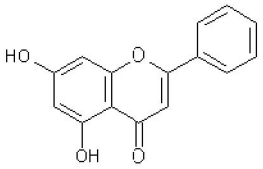
a) Acacetina
= 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona



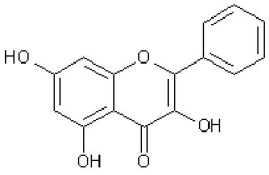
b) Apigenina
= 4',5,7-trihidroxiflavona



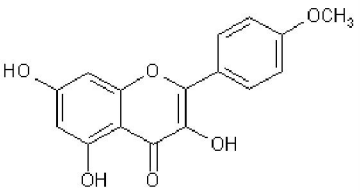
c) Chalcona
= 2-Benzilidenoacetofenona



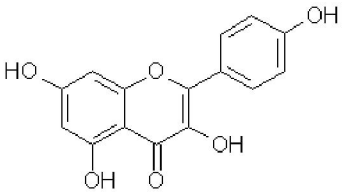
d) Crisina
5,7-dihidroxiflavona



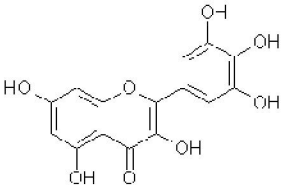
e) Galangina
= 3,5,7-trihidroxiflavona



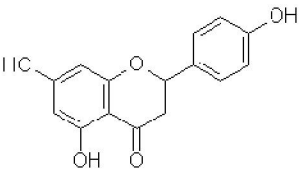
f) Canferide
= 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavone



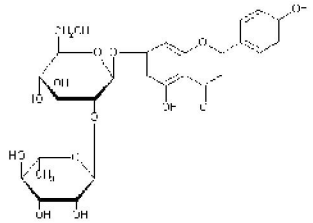
g) Canferol
= 3,4',5,7-tetrahidroxiflavona



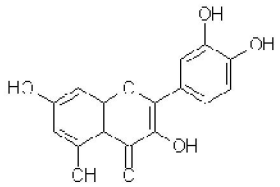
h) Miricetina
= 3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona



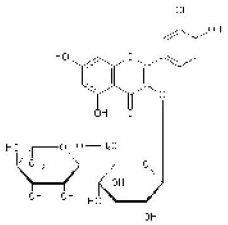
i) Naringenina
= 4',5,7-trihidroxiflavanona



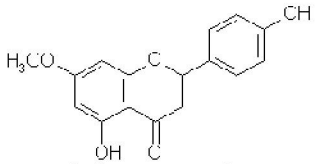
j) Naringina
= naringenin-7-O-neohesperidoside



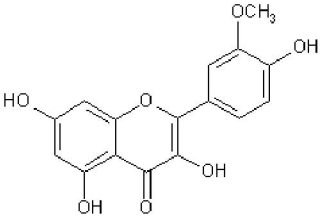
l) Quercetina
= 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona



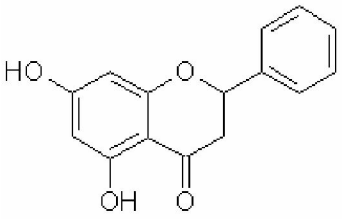
m) Rutina
Quercetin-3-O-rutinosideo



n) Sacuranetina
= naringenina-7-metileter
= 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanona



m) Isoramnetina
= 3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxi flavona



n) Pinocembrina
=5,7-Dihidroxiflavanona

FIGURA 20 - ALGUNS FLAVONÓIDES GERALMENTE ENCONTRADOS EM PRODUTOS APÍCOLAS.

FONTE: SERRA BONVEHÍ et al. (2001).

2.4 ABSORÇÃO E METABOLISMO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A ingestão de compostos fenólicos na dieta é afetada pelos hábitos alimentares e preferências individuais. A média diária de ingestão de polifenóis na dieta é de 1g por pessoa; as principais fontes são bebidas, frutas e em menor quantidade, os vegetais e legumes. Entretanto fatores como, diversidade estrutural, a falta de padronização e de métodos disponíveis para a quantificação, a variação no teor e a distribuição desigual dos fenólicos em cada planta, além do processamento tecnológico torna difícil a avaliação exata das quantidades de polifenóis ingeridas (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Hertog et al. (1993) relataram que o chá preto, uma das maiores fontes de flavonóides, contribui com 61% da dieta, enquanto que cebolas e maçãs fornecem 13 e 10% da ingestão total de flavonóides na dieta, respectivamente.

As informações a respeito da biodisponibilidade e absorção dos fenólicos são diversas, fragmentadas e muitas vezes contraditórias. A Figura 21 mostra possíveis rotas para o metabolismo dos polifenólicos ingeridos na dieta humana. Nessas rotas metabólicas estão envolvidas enzimas, fenolsulfotransferase, catecol-*O*-transferases, β-glucosidases, lactase-floridizina oxidasesglucoronosil transferase entre outras. A absorção e a biodisponibilidade dos polifenóis no organismo dependem do seu metabolismo no intestino delgado e são influenciados por diversos fatores tais como, masa molecular, lipofilicidade, solubilidade e pKa,

assim como o tempo de trânsito no intestino e estômago, a permeabilidade da membrana, lúmem e pH. Somente os polifenóis não absorvidos no estômago e no intestino delgado e os metabólicos excretados são degradados pela microflora intestinal (SHAHIDI e NACZK, 2004).

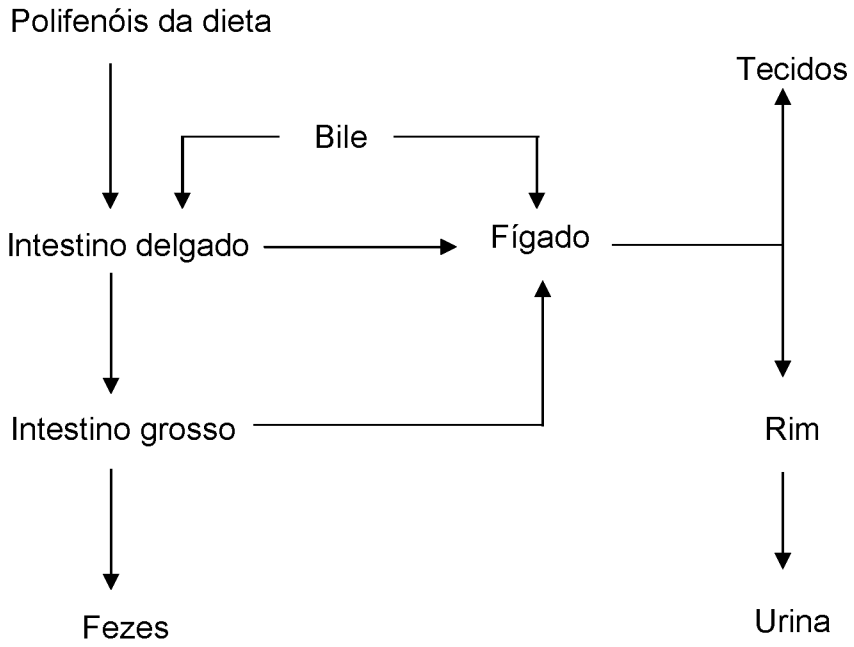


FIGURA 21 – POSSÍVEIS ROTAS METABÓLICAS DOS POLIFENÓIS EM DIETA HUMANA.
FONTE: SHAHIDI e NACZK (2004).

Os polifenóis glicosilados podem ser absorvidos assim como estão ou após hidrólise por enzimas intestinais. Crespy et al. (1999), usando modelo de perfusão *in situ*, mostraram que a quercetina é absorvida, metabolizada e parcialmente reexcretada pelo intestino delgado. Denovan et al. (2001) relataram que após a absorção nas paredes intestinais as catequinas são extensivamente metabolizadas. Metabolismo adicional de polifenóis envolve sua conjugação por glucoronidação, *O*-metilação,

sulfatação ou uma combinação que pode ocorrer no fígado. Os metabólicos conjugados são depois transferidos aos tecidos ou excretados na urina ou bile.

Pouco é conhecido sobre os metabólitos de antocianinas, entretanto alguns autores sugerem que elas são pouco absorvidas (MORAZZONI et al., 1991). Entretanto, vários autores relatam que as catequinas e epicatequinas são extensivamente metabolizadas e conjugadas durante a transferência do lúmen até a superfície serosal. Kuhnle et al. (2000) e Donavan et al. (2001) verificaram que os metabólicos de catequina são encontrados no plasma após o consumo de vinho tinto.

Segundo Miyake et al. (1997), o eriodictiol-7-rutinosidase presente em limões foi metabolizado por 18 bactérias intestinais cultivadas a partir das fezes humanas. Os metabólitos primários da eriocitrina foram identificados como eriodictiol, o qual foi depois metabolizado em ácido 3,4-dihidroxicinâmico e floroglucinol pelo *Clostridium butyricum*. Não foi detectada a presença de eriodictiol após 15 horas de cultura, porém a presença de eriodictiol e ácido 3,4-dihidroxicinâmico após 6 e 9 horas de incubação, respectivamente.

A quercetina-3-glucosidase e a quercetina-4'-glucosidase são rapidamente absorvidas pelo corpo humano, sendo alcançada uma concentração máxima desses compostos no sangue após 37 ± 12 e 27± 5 minutos de ingestão, respectivamente (OLTHOF et al. 2000). Vries et al. (2001) estudaram a absorção de quercetina em humanos após o

consumo de quantidades similares de vinho tinto, cebolas amarelas ou chás. A absorção da quercetina foi estimada baseada em suas concentrações no plasma e na urina, sendo que os resultados sugeriram que a biodisponibilidade da quercetina do vinho é menor do que das cebolas, mas maior do que dos chás.

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Muitos compostos fenólicos são adicionados aos alimentos como agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos (ATROSHI et al., 2003), entretanto, a natureza lipofílica dos fenóis pode reduzir suas propriedades antimicrobianas (BARANOWSKI e NAGEL, 1984).

A ação antimicrobiana dos compostos fenólicos está relacionada com a inativação das enzimas celulares, além de mudanças na permeabilidade das membranas celulares.

Ensaios com polifenóis de chás demonstraram inibição do crescimento de bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (HAMILTON-MILLER, 2001). A quercetina encontrada em um grande número de frutas como maçã, *apricot*, figo, ameixa, morango e tomate demonstrou atividades antivirais contra herpes simples tipo 1, parainfluenza tipo 3 e polio tipo 1 em estudos *in vivo* e *in vitro* (MIDDLETON, 1986).

Pierson e Reddy (1982) avaliaram a atividade de alguns antioxidantes contra o crescimento e a produção de toxinas de *Clostridium* tipos A e B em carnes enlatadas, inoculadas com 8000 esporos/g de carne e adicionadas de ésteres de ácido gálico e ácido *p*-hidroxibenzóico. Neste estudo foi verificado que o estufamento tóxico foi retardado por três dias de armazenamento quando comparado ao controle.

Durante os últimos anos tem sido relatada *in vitro* a atividade antimicrobiana da própolis que se deve aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural (GEBARA et al., 2002). A galangina, pinocembrina e pinostrombina são tidos como os flavonóides mais efetivos contra bactérias (KORU et al., 2007). Os ácidos ferrúlico e caféico também contribuem para a ação bactericida da própolis. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana (BOSIO, 2000), podendo decorrer de um efeito sinergístico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995).

A atividade antibacteriana das chalconas e seus derivados contra microrganismos Gram positivos são freqüentemente maiores do que contra bactérias Gram negativas, no entanto, alguns análogos também podem inibir o crescimento de microrganismos Gram negativos (OPLETALOVA, 2000). Já foram relatadas inibições para as bactérias: *Micrococcus luteus* (INAMORI et al., 1991), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ALCARÁZ et al., 2000), *Escherichia* coli

(ALCARÁZ et al., 2000; ALVAREZ et al., 2004) e *Staphylococcus* epidermidis (DIMMOCK et al., 1999).

Proestos et al. (2005) encontraram os ácidos *p*-hidroxibenzóico, gálico, caféico, *p*-cumárico, vanílico, ferrúlico e siríngico, além dos flavonóides quercetina, apigenina, luteolina, naringenina, eriodictiol, rutina, catequinas e epicatequinas, em vinte e sete extratos de plantas da Grécia que foram testadas contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogena* e *Bacillus cereus*. Os extratos de plantas mais efetivos na inibição contra essas bactérias foram a *Asperoulla odorata* e *Vinca rosea*. Neste estudo as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos de plantas do que as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *S. enteridis*).

Asolini et al. (2006) avaliaram as propriedades antibacterianas e antioxidantes de compostos fenólicos encontrados em fitoterápicos comumente consumidos na região sudoeste do Paraná, como: arruda (*Ruta graveolens*), camomila (*Matricaria chamomilla*), macela (*Achyrocline satureioides*), alcachofra (*Cynara scolymus*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), tanchagem (*Plantago major*), malva (*Malva silvestris*), sálvia (*Salvia officinalis*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Os resultados obtidos indicaram que existe uma grande variação na concentração dos compostos fenólicos nos diversos tipos de chás analisados, tanto nos extratos etanólicos quanto nos aquosos. Somente o extrato aquoso de alcachofra demonstrou atividade antibacteriana, diferentemente dos extratos etanólicos em que todos apresentaram alguma atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Özcan et al. (2004) examinaram o efeito da ação inibitória de extratos de pólen apícola de cinco regiões diferentes da Turquia contra as bactérias *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporium*. Neste estudo os extratos de pólen de Taskent não apresentaram inibição contra a *Alternaria alternata* entre o terceiro e o quarto dia de incubação, porém após esse período o efeito inibitório foi sensivelmente melhorado. Entretanto, esse mesmo pólen só apresentou alguma atividade contra o *Fusarium oxysporium* após cinco dias de incubação. Por outro lado, o pólen de Alanya teve um efeito máximo no terceiro dia de incubação, decrescendo após esse período com ambos os microrganismos. A grande variabilidade no efeito inibitório desses pólens pode ser em parte explicada pelas diferenças químicas, principalmente compostos fenólicos e flavonóides da flora das diferentes regiões.

2.6 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de diminuir ou previnir significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração quando comparado a substância oxidável de interesse (HALLIWELL e GUTERIDGE (1990). Outra definição é o de antioxidantes em alimentos, como uma substância que em pequena quantidade é capaz de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, como as gorduras (BECKER et al., 2004).

Estas definições gerais não limitam a atividade antioxidante a um grupo específico de compostos químicos e nem se referem a um mecanismo particular de ação. Para a situação *in vivo,* o conceito de antioxidante é amplo, incluindo enzimas antioxidantes, ligações de ferro e proteínas transportadoras e outros compostos que afetam o sinal de expressão gênica.

Para alimentos e bebidas, antioxidantes podem ser relacionados a proteção da oxidação de substratos específicos ou a formação de produtos de oxidação específicos, e valores podem ser definidos para diferentes produtos. De um ponto de vista termodinâmico, a ação antioxidante depende de parâmetros bem definidos, como a energia de ligação e potenciais de redução padrão, e, desta forma é possível deduzir se um dado radical pode ser seqüestrado por um antioxidante específico ou não (BECKER et al., 2004).

O mecanismo pelos quais estes antioxidantes exercem seus efeitos pode variar dependendo das características de cada alimento, inclusive da presença dos compostos minoritários. Além disso, os efeitos benéficos do consumo de vegetais a saúde tem sido atribuído, em parte, a presença de compostos fenólicos, os quais estão associados com a neutralização dos riscos de doenças cardiovasculares, câncer, catarata e outras doenças degenerativas. Isto é conseguido pela prevenção da oxidação lipídica, mutação do DNA, modificação na estrutura das proteínas (protein cross linking) e danos aos tecidos. Nas últimas décadas, os antioxidantes têm sido de grande interesse pelos profissionais da saúde, porque eles ajudam o corpo humano a se proteger contra os danos causados pelas

espécies reativas ao oxigênio e ao nitrogênio, associadas com doenças degenerativas (Figura 22).

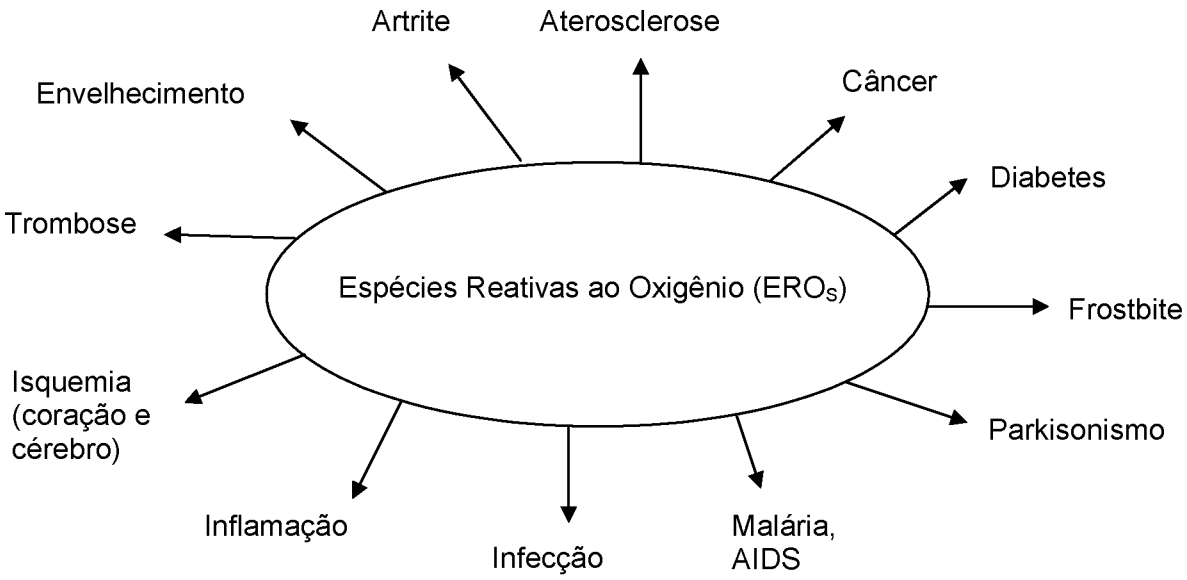


FIGURA 22 – DOENÇAS E DANOS CAUSADOS PELAS ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROS).
FONTE: SHAHIDI e NACZK (2004).

Os danos causados por radicais livres podem ter um papel importante na formação da aterosclerose mediante à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. As LDL oxidadas são facilmente adsorvidas por macrófagos e formam células espumosas que, ao crescerem dão lugar às placas ateroscleróticas que obstruem os vasos, impedindo o fluxo sanguíneo ou sofrendo uma ruptura, o que desencadeia em uma trombose (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

2.6.1 Radicais Livres

Radicais livres é um átomo ou grupo de átomos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular mais externo. Nos átomos, os elétrons ocupam uma região no espaço conhecida como orbitais. Cada orbital "*s*" pode ter no máximo dois elétrons com *spins* em direções opostas. Para que uma molécula permaneça estável é necessária a presença de elétrons pareados na sua órbita externa. Entretanto, esta falta de paridade forma moléculas altamente instáveis, de vida média muito curta, os radicais livres (OLSZEWER, 1995).

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, geralmente formado pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Em meio biológico a maioria das moléculas não se encontram na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados, entretanto em determinadas situações os RL, também denominados de espécies reativas são formados e podem causar efeito fisiológico e patológico (OLSZEWER, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

As espécies reativas é um termo coletivo que inclui as espécies reativas de oxigênio (ERO_S), bem como outras espécies reativas, como, por exemplo, de nitrogênio (ERN_S) (Tabela 4). *Reativo* não é sempre um termo apropriado uma vez que H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) reagem diretamente com poucas moléculas no corpo humano, enquanto $^{\bullet}OH$ pode reagir com qualquer molécula (HALLIWELL, 2001).

TABELA 4. PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NAS FORMAS DE RADICAIS E NÃO RADICAIS.

Espécies reativas de oxigênio (ERO_S)	
Radicais	Não Radicais
Superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxil ($^{\bullet}OH$)	Ácido hipocloroso (HClO)
Peroxil ($RO_2^{\bullet}$)	Ácido hipobromoso (HOBr)
Alcoxil ($RO^{\bullet}$)	Ozônio (O_3)
Hidroperoxil ($HO_2^{\bullet}$)	Oxigênio Singleto (^1O_g)
Espécies reativas de nitrogênio (ERN_S)	
Radicais	Não Radicais
Óxido nítrico ($NO^{\bullet}$)	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$)	Alquil peroxinitrito (ROONO)

FONTE: HALLIWELL (2001).

O oxigênio molecular (O_2) em seu estado fundamental é um bi-radical, contendo dois elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo (estado este também conhecido como triplete). Entretanto, estes dois elétrons desemparelhados apresentam spins de mesma orientação, tornando o O_2 uma molécula pouco reativa, podendo reagir com apenas um elétron por vez. Por outro lado, se um dos dois elétrons desemparelhados for excitado e mudar sua orientação de spin, o resultado será uma espécie altamente oxidante conhecida como oxigênio singlete, capaz de reagir com outros pares de elétrons, especialmente duplas ligações. Os radicais estão sempre procurando por um outro elétron com o qual eles possam formar pares. Alguns radicais, como o

radical hidroxila, reagem com a maioria das moléculas próximas ao seu sítio de formação, reagindo quase que a cada colisão ($10^{10}M^{-1}s$-1). Entretanto, outras espécies são menos reativas ou ainda, muito pouco capazes de reagir devido a sua alta estabilidade, como o radical trifenilmetila, capaz até de se manter num tubo de ensaio.

2.6.2 Sistema de Defesa Antioxidante

As células são capazes de se defender contra os efeitos deletérios das EROs por mecanismos de defesa antioxidante. Em organismos aeróbios saudáveis, os níveis de EROs estão em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante. Entretanto, o desbalanço metabólico entre a produção de EROs e o sistema de defesa antioxidante caracteriza o estresse oxidativo celular. Esse desequilíbrio pode ser causado pelos seguintes fatores: (i) diminuição da defesa antioxidante causada por mutações nas enzimas de defesa; (ii) diminuição da ingestão de vitaminas e outros constituintes na dieta; (ii) aumento da produção de EROs causada por fatores ambientais como, por exemplo, fumo, radiação (ultravioleta, raios X etc.); (iii) excesso de atividade física; (iv) ingestão de gorduras; (v) consumo de álcool; (vi) estresse físico e mental; (vii) inflamações e infecções, entre outros. O sistema antioxidante de um organismo pode ser didaticamente dividido em *enzimático* e *não enzimático* (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

2.6.2.1 Sistema Antioxidante Enzimático

Como parte do sistema de defesa antioxidante enzimático, pode-se citar as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas por meio da redução parcial do oxigênio até a água através de sucessivas reações. A transferência de um elétron para o O_2 produz o primeiro intermediário reativo, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (Equação 01), catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), o qual sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é um RL (Equação 02). O H_2O_2 sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de O_2 formando o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), catalisada por metais de transição (reação de Fenton) (Equação 03), ou pela combinação do $O_2^{\bullet -}$ com o H_2O_2 (Haber-Weiss) (Equação 04), (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

$$O_2 + e^- \xrightarrow{SOD} O_2\bullet- \qquad (0\ 1)$$

$$2\ O_2\bullet- + 2H+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 \qquad (02)$$

$$Fe^{2+}/Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{3+}/Cu^{2+} \qquad (03)$$

$$H_2O_2 + O_2\bullet^- \xrightarrow{Fe/Cu} OH\bullet + OH- + O_2 \qquad (04)$$

A catalase (CAT) é uma hemoproteína, presente na maior parte dos tecidos e age removendo tanto o H_2O_2 gerado pela redução de dois elétrons do O_2, quanto indiretamente pela dismutação do $O_2^{\bullet -}$ (via SOD).

Essa enzima apresenta-se ligada em organelas denominadas peroxissomos e é específica para H_2O_2, não apresentando atividade para hidroperóxidos orgânicos, como descrito na Equação 05 (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O + O_2 \qquad (05)$$

Segundo Raggi (1998), a glutationa peroxidase (GPx) pode ser considerada fundamental no metabolismo do peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos, bem como EROs, pois age como doadora de elétrons nas reações catalisadas e dessa forma, ela protege as células dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Essa enzima está presente tanto em células animais, quanto de plantas e bactérias, sintetizando intracelularmente a partir do ácido glutâmico, cisteína e glicina. Desempenha um papel importante em muitos processos biológicos, entre eles, a síntese de proteínas e de DNA, como cofator de várias enzimas, na proteção celular contra agentes ionizantes e compostos exógenos e, principalmente, contra as EROs.

Segundo Nepomuceno et al. (1999) o organismo está sujeito a reações de desequilíbrio que levam a formação de radicais livres, que por sua vez podem provocar vários danos celulares como a degeneração de membranas lipídicas. Para impedir ou equilibrar esse tipo de dano celular, o organismo tem a proteção de enzimas endógenas já citadas anteriormente (como superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase) capazes de catalisar reações para inativação de radicais livres.

Muitas vezes, ocorre grande desequilíbrio entre a produção e a inativação de radicais livres, seja pela queda na capacidade do sistema enzimático ou pelo excesso de produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO_S). Nesses casos, o organismo encontra-se em situação de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2001). Segundo Aruoma (1994), o estresse oxidativo está envolvido na incidência de doenças degenerativas como Parkinson e Ahlzeimer que surgem com a idade.

Os radicais livres podem provocar também modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, *cross linking*, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas devido à reação dos radicais livres com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica. A reação de radicais livres com ácidos nucléicos também foi observada, gerando mudança em moléculas de DNA e acarretando certas aberrações cromossômicas. Além destes efeitos indiretos, há a ação tóxica resultante de altas concentrações dos íons superóxido e peróxido de hidrogênio na célula (HALLIWELL et al., 1995).

2.6.2.2 Sistema Antioxidante Não Enzimático

Existem várias moléculas que podem agir como antioxidantes celulares através de diferentes mecanismos. Algumas destas moléculas, como o β-caroteno e o licopeno podem atuar como supressores de oxigênio singlete e de $OH^{\bullet}$ e muitas impedindo a fase de propagação no processo de lipoperoxidação (KEKRER 1993).

O β-Caroteno e o licopeno são carotenóides que exercem funções antioxidantes nas fases lipídicas, através da supressão de radicais livres, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet -}$) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Normalmente, os carotenóides são conhecidos por esta função antioxidante, contudo, podem também diminuir a formação de oxigênio singlete reagindo diretamente com ele e liberando energia na forma de calor.

Por sua vez, o α-tocoferol (vitamina E) interrompe a abstração de hidrogênio neste processo, agindo assim como supressor de radicais peroxila e alcoxila. Entretanto, sua maior ação antioxidante reside na sua eficiente propriedade de suprimir radicais peroxila ($ROO^{\bullet}$) das porções lipídicas de membranas biológicas, interrompendo assim, a reação em cadeia da lipoperoxidação. Inúmeros são os trabalhos relatando que o α-tocoferol pode atenuar o estresse oxidativo, principalmente por proteger membranas contra a lipoperoxidação. Por este fato, é uma vitamina amplamente utilizada tanto como suplemento oral, como em produtos de uso tópico, para a prevenção de doenças. Além da biotransformação que pode ocorrer durante a digestão, outros fatores como a composição da dieta, podem interferir na biodisponibilidade dos suplementos administrados por via oral. A vitamina E, por ser uma molécula lipossolúvel, necessita de ingestão concomitante de gordura para que seja absorvida, e assim possa atuar na pele (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Existem também as moléculas responsáveis por quelar metais. Quanto à solubilidade, estas moléculas podem ser divididas em dois grupos: lipossolúveis e hidrossolúveis, o que assegura à célula, defesas antioxidantes tanto no citossol quanto nas membranas celulares. Dentre as vitaminas hidrossolúveis que compõem o sistema antioxidante não enzimático, a vitamina C, é sem dúvida, uma das mais conhecidas por sua freqüente utilização em cosméticos.

2.6.3 Peroxidação Lipídica

O processo de oxidação lipídica em alimentos envolve uma reação em cadeia de radicais livres que é geralmente inicializada pela exposição dos lipídeos à luz, calor, radiação ionizante e íons metálicos como catalisadores. As enzimas lipooxigenases podem também iniciar a oxidação. A rota clássica de oxidação inclui reação de iniciação (produção de radicais livres lipídicos) (Equação 06), propagação (Equação 07 e 08) e terminação (produção de compostos não radicais) (Equação 09) (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Iniciação $RH \longrightarrow R\bullet + H\bullet$ (06)

Propagação $R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet$ (07)

$ROO\bullet + RH \longrightarrow R\bullet + ROOH$ (08)

Terminação $R\bullet + R\bullet$

$R\bullet + ROO\bullet$ } produtos não radicais (09)

$ROO\bullet + ROO\bullet$

2.6.4 Mecanismo de Ação dos Antioxidantes Fenólicos

Os antioxidantes fenólicos interferem na oxidação lipídica pela rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais lipídicos. O antioxidante (AH) funciona removendo os radicais livres (R• ou ROO •). A reação direta do antioxidante com o substrato R• parece ser menos importante que a reação com o radical peroxil (ROO •) (Equação 10 e 11).

$$R\bullet + AH \longrightarrow \text{`}RH + A\bullet \qquad (10)$$

$$ROO\bullet + AH \longrightarrow ROOH + A\bullet \qquad (11)$$

Outro mecanismo possível é a reação entre o radical peroxil e o antioxidante, formando o complexo (ROO • AH) que pode então reagir com outro radical adicional (Equação 12).

$$ROO\bullet + AH \longrightarrow (ROO\bullet AH) \qquad (12)$$

Os compostos fenólicos se incluem principalmente na categoria de seqüestradores de radicais livres, ainda que também possam exercer sua ação antioxidante através de outros mecanismos, como quelantes de íons metálicos que catalisam reações de oxidação. Estes compostos interferem na oxidação dos lipídeos e de outras moléculas por uma rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres. Os radicais fenóxidos formados são intermediários bastante estáveis (ressonância com o anel benzênico) e dificilmente iniciam uma nova reação em cadeia em função da falta de sítios ativos para o ataque do oxigênio molecular. Estes radicais intermediários fenóxidos atuam reagindo com outros

radicais livres, culminando com a terminação das reações de propagação (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os três principais mecanismos que podem suprimir a formação de radicais livres são antioxidantes, sequestrantes de radicais livres e quelantes. Antioxidantes e sequestrantes de radicais livres são usualmente considerados sinônimos, embora nem sempre o sejam. Por exemplo, etanol é um seqüestrante de radicais hidroxil, mas nunca foi considerado um antioxidante. Antioxidante é o termo mais antigo, que no início foi aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais eram capazes de reagir com radical peroxil. Agora, este termo é aplicado a todos os inibidores de radicais livres. Em adição aos antioxidantes diretos, há dois outros grupos importantes de inibidores de radicais livres, as enzimas antioxidantes e os compostos que possuem propriedades antioxidantes indiretas (DENISOV e AFANAS, 2005).

Inibidores de radicais livres suprimem a formação do radical, reagindo com os mesmos e formando novos radicais inativos (Figura 23) ou quelando cataliticamente metais de transição ativos e formando complexos inativos (PIETTA, 2000) (Figura 24).

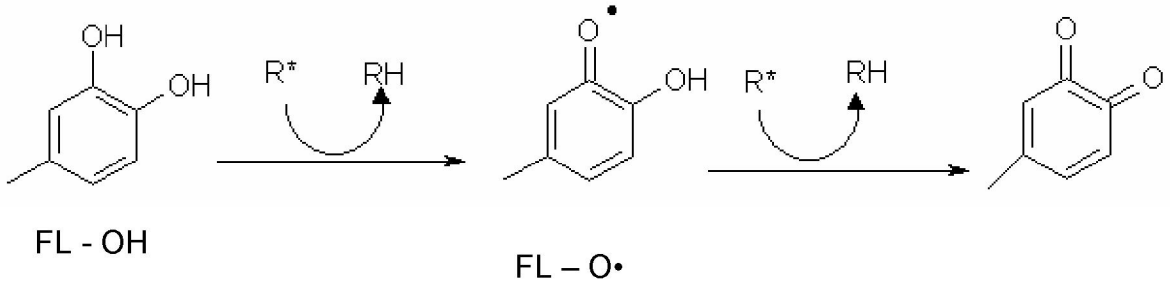


FIGURA 23 – ESQUEMA DE SEQÜESTRO DE EROS (R) POR FLAVONÓIDES (FL)
FONTE: PIETTA (2000).

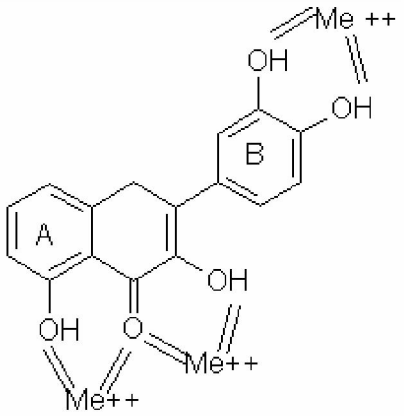


FIGURA 24 – SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE METAIS EM FLAVONÓIDES
FONTE: PIETTA (2000).

A eficiência dos compostos polifenólicos como antioxidantes depende, em grande parte, de sua estrutura química. O fenol por si só é inativo como antioxidante, entretanto, os compostos o*rto* e *para*-difenólicos possuem atividade antioxidante, a qual é aumentada com a substituição de seus átomos de hidrogênio por grupos etila- ou *n*-butila e a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres depende do

número de grupos hidroxila na molécula (FUKUMOTO e MAZZA, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os compostos fenólicos são mais efetivos em estender o período de indução quando adicionado ao óleo ainda não deteriorado. Entretanto eles são ineficientes em retardar a decomposição de lipídeos já deteriorados. Desta forma, os antioxidantes devem ser adicionados aos alimentos tão cedo quanto possível para se conseguir a máxima proteção contra a oxidação (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer a relação entre a estrutura de flavonóides e sua atividade de seqüestro de radical. Segundo Bors et al. (1999), os principais determinantes para a capacidade de seqüestro de radical são: 1) a presença de um grupo catecol no anel B, o qual possui as melhores propriedades de doação de elétrons e a oxidação do flavonóide ocorre no anel B quando o grupo catecol está presente e 2) uma dupla ligação na posição 2,3 conjugada com um grupo 4-oxo, o qual é responsável pelo deslocamento do elétron do anel B (Figura 25).

A presença de um grupo 3-hidroxil no anel heterocíclico também aumenta a atividade de seqüestro de radical, enquanto grupos adicionais hidroxil ou metoxil nas posições 3,5 e 7 dos anéis A e C parecem ser menos importantes. Estas características estruturais contribuem para aumentar a estabilidade do radical aroxil. Assim os flavonols e flavonas, contendo o grupo catecol no anel B, são mais ativos.

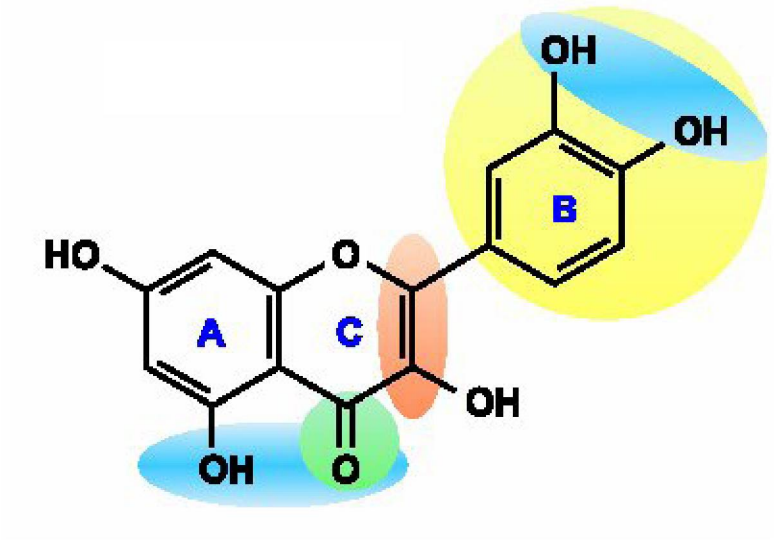


FIGURA 25 - ESTRUTURA DO FLAVONOL QUERCETINA MOSTRANDO CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES NA DEFINIÇÃO DE POTENCIAL ANTIOXIDANTE CLÁSSICO DOS FLAVONÓIDES.
FONTE: WILLIAMS et al. (2004).

Entretanto, a presença do grupo 3-hidroxil nos flavonols os torna mais potentes que as correspondentes flavonas. A glicosilação deste grupo, como a rutina, reduz grandemente a capacidade de seqüestro de radical. Flavanol e flavanonas, devido a perda da conjugação provida pela dupla ligação 2,3 com o grupo 4-oxo, são fracos antioxidantes (PIETTA, 2000). A característica mais importante é a presença do grupo catecol ou dihidroxil no anel B (marcado em amarelo). Outra importante característica inclui a presença da insaturação no anel C (marcado em vermelho) e a presença da função 4-oxo no anel C (marcado em verde). O grupo catecol e outras funções podem também explicar a habilidade dos flavonóides em quelar metais de transição como cobre e ferro (marcado em azul) (Figura 25).

2.6.5 Antioxidantes Fenólicos Sintéticos

A aplicação de antioxidantes em alimentos é governada por regulamentações federais. As regulamentações da FDA (Food Drug and Administration) dos Estados Unidos e América do Norte, exigem que os rótulos dos produtos alimentícios apresentem os ingredientes e sua finalidade. Os antoxidantes sintéticos mais comumente permitido em alimentos são o butilihidroxitolueno (BHT), butilihidroxianisol (BHA), galato de propila (PG) e butilhidroquinona terciária (TBHQ) (NACZK e SHADIDI (2004).

O BHT e BHA (Figura 26 a, b) são antioxidantes fenólicos monohídricos, que originalmente foram usados para proteger o petróleo da ação oxidativa durante a degomagem, para então ser aplicado na indústria alimentícia (PORTER, 1980). Ambos são extremamente solúveis em gorduras e insolúveis em água e, asseguram um bom efeito antioxidativo, entretanto, o BHA é levemente melhor do que o BHT neste aspecto (GADOW et al., 1997).

O BHT é mais eficiente em suprimir a oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais. Entre suas múltiplas aplicações, o BHA é particularmente útil na proteção da cor e do *flavor* de óleos essenciais e é considerado o mais efetivo dos antioxidantes existentes no mercado para essa aplicação. O BHA é muito utilizado no controle da oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, tais como, os encontrados no óleo de côco e de semente de palma. O BHT por ser um monofenol, pode produzir radical intermediário com moderado deslocamento de sua

ressonância. Os grupos butílicos terciários do BHT não permitem envolvimento do radical formado após a retirada do hidrogênio em outras reações. Desta forma, um radical lipídico peroxil pode se ligar a molécula de BHT na posição para do grupo fenoxil. A natureza volátil do BHA e BHT os torna um importante aditivo em materiais de embalagens, porque eles podem migrar para o alimento. Estes antioxidantes são diretamente adicionados na forma de cera ou de emulsão na superfície interna das embalagens e possuem efeito sinergístico quando usados em combinação (PORTER, 1993).

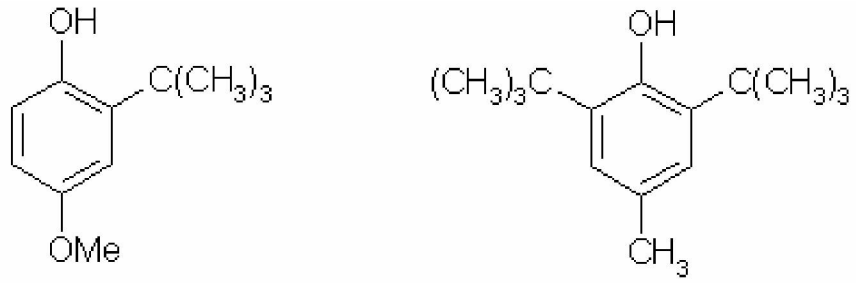


FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DO BUTILIHIDROXIANISOL (BHA) (a) E BUTILIHIDROXITOLUENO (BHT) (b).
FONTE: SHAHIDI e NACZK (2004).

Os antioxidantes fenólicos sintéticos são baratos e apresentam grande atividade. No entanto, em doses elevadas podem interferir com a saúde do consumidor (SORTWELL, 1995; SOARES et al., 2003). Os principais alvos de toxicidade do BHT são os pulmões, o fígado e as células sanguíneas (BANNWART e TOLEDO, 1999). Segundo Williams et al. (1999), o BHT em concentrações elevadas aumenta a promoção de tumores. Pode também promover o desenvolvimento de adenomas e

carcinomas hepatocelulares em ratos (VERHAGEN et al., 1989). O galato de propila (PG) pode causar dermatite de contato nas pessoas que o manuseiam (WERTZEN, 1990; SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

Atualmente, com a busca cada vez maior por produtos naturais e com a crescente utilização de compostos antioxidantes em terapias preventivas nas doenças nas quais os radicais livres estão implicados, os produtos naturais, como vitaminas e flavonóides, têm merecido atenção especial (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

2.6.6 Antioxidantes Fenólicos Naturais

A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (YILDIRIM et al., 2001; ZHENG e WANG, 2001; MELO e GUERRA, 2002).

Os antioxidantes em alimentos podem ser originários de compostos que ocorrem naturalmente nos alimentos ou substâncias formadas durante o seu processamento (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992). Antioxidantes naturais são compostos fenólicos ou polifenólicos que podem ocorrer em todas as partes da planta. Esses compostos são

multifuncionais e podem agir como agentes redutores (terminadores de radicais livres), quelantes de metais e receptores do oxigênio singlete. Os antioxidantes fenólicos de plantas mais comuns são os flavonóides, derivados de ácido cinâmico, cumarinas, tocoferóis e ácidos orgânicos. Como fonte de antioxidante natural pode citar as frutas, sementes, soja, óleos, chás, ervas, vinhos e especiarias entre outras (MINUSSI et al., 2003).

O β-caroteno é considerado um potente antioxidante natural, é solúvel em óleos e/ou gorduras e protege da oxidação lipídica. Atua eficientemente como atenuador físico, dissipando a energia extra contida no oxigênio singlete, tido como forte agente mutagênico em razão da peroxidação de lipídeos.

Os tocoferóis são importantes antioxidantes biológicos. Os tipos e sua ocorrência natural diferem entre si no grau de substituição do anel aromático e possuem cadeia lateral isoprenóide (C_{16}) saturada. Dependendo da posição dos grupos metil no anel, os tocoferóis são denominados alfa, beta, gama e sigma (Figura 27).

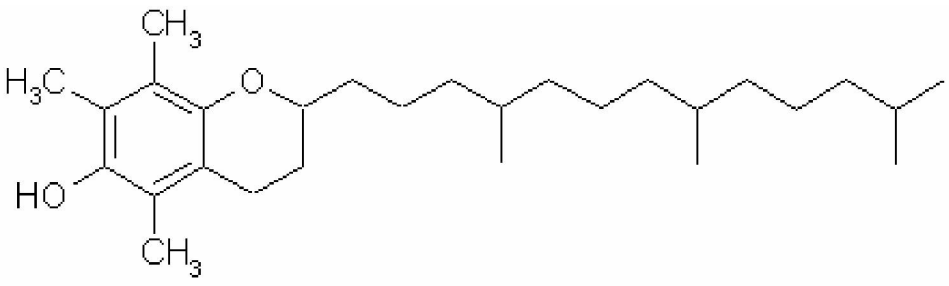


FIGURA 27 – ESTRUTURA QUÍMICA DO α – TOCOFEROL
FONTE: SHAHIDI e NACZK (2004).

Os vegetais contêm quantidades consideráveis de diferentes tocoferóis na sua fração lipídica. Cereais e produtos de cereais, óleos, amêndoas e vegetais são fontes de tocoferóis, porém no reino animal os tocoferóis são encontrados somente em quantidades ínfimas. Alfa-tocoferol ou vitamina E previne a oxidação do corpo lipídico incluindo ácidos graxos poliinsturados e componentes lipídicos de células e organelas das membranas (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Os tocoferóis são produzidos em escala comercial e usados como antioxidante em alimentos. A atividade antioxidante do tocoferol é baseada principalmente no sistema redox da molécula de tocoferol a tocoferil quinona. Os tocoferóis são seqüestradores de radicais lipídicos.

Os flavonóides e ácidos cinâmicos são conhecidos como antioxidantes primários e agem como aceptores de radicais livres e separadores das cadeias. Os flavonols são conhecidos como quelante de íons metálicos. Um grupo o-quinol no anel B pode também demonstrar atividade queladora de metal (PRAT e HUDSON, 1990).

Segundo SHAHIDI e NACZK (2004), a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de seus ésteres depende do número de grupos hidroxil na molécula e, os ácidos cinâmicos hidroxilados são mais efetivos do que os ácidos benzóicos.

2.7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Devido ao reconhecimento dos efeitos maléficos dos radicais livres a procura por substâncias que possam atenuar ou mesmo impedir suas ações, assim como os métodos para avaliar o potencial antioxidante dessas substâncias vem crescendo a cada dia (NIKI, 2002).

Uma variedade de métodos está correntemente sendo utilizada para se determinar a capacidade antioxidante. De um modo geral, os efeitos antioxidantes das substâncias podem ser mensurados por meio de sistemas químicos e biológicos, estes últimos podendo ser *in vivo* e *in vitro* e todos têm suas próprias vantagens e limitações (KOLEVA et al., 2002). Para ambos os sistemas são necessários estabelecer modelos de indução da oxidação, selecionar o agente indutor do dano oxidativo e o modo de se mensurar o efeito exercido pelo antioxidante. Porém, segundo Niki (2002), deve-se ter em mente que não existe um método universal simples pelo qual esta atividade possa ser medida de forma precisa e quantitativa.

Segundo Antolovich et al. (2002), a atividade antioxidante de uma substância não pode ser avaliada diretamente, mas por meio dos seus efeitos sobre um substrato ou sistema passível de ser monitorado. A maioria desses métodos utiliza processos oxidativos, os quais envolvem a adição de um agente iniciador (temperatura, agitação ou pressão parcial de oxigênio, metal de transição ou mesmo exposição à luz) para acelerar o processo, e uma fonte de radicais livres específica. Esses radicais são

então oxidados sob condições padronizadas e o grau de oxidação, ou sua extensão medido.

Entretanto, segundo Frankel e Meyer (2000), resultados conflitantes podem ser obtidos quando se mede atividade antioxidante por diferentes métodos, e podem ser relacionados a alguns fatores: a) a estrutura física do sistema teste, b) a natureza do substrato para oxidação, c) a presença de componentes que possuam interação, d) o modo de iniciar a oxidação, e) o método analítico para medir a oxidação. A influência de alguns fatores tem sido elucidada em sistemas modelo simples, mas o efeito em sistemas heterogêneos complexos como um alimento ou o corpo humano não é simples de se estimar e, desta forma, há a necessidade de se padronizar protocolos para avaliar os efeitos antioxidantes (FRANKEL e MEYER, 2000).

Becker et al. (2004) propuseram um protocolo com quatro passos para a aplicação de antioxidantes em alimentos, que podem posteriormente ser acrescidos para a avaliação dos benefícios a saúde. A primeira etapa (I) sugere a quantificação e identificação de compostos fenólicos no produto alimentício. A segunda etapa (II) tem como objetivo avaliar a atividade de seqüestro do radical de diferentes antioxidantes, usando vários métodos e considerando o efeito do solvente no mecanismo antioxidante. A terceira etapa (III) sugere a avaliação da habilidade do antioxidante em inibir ou retardar a oxidação lipídica em sistemas modelos relevantes. No entanto, a quarta etapa (IV) depende do objetivo do estudo e pode ser subdividido em IV (a) e IV (b). A etapa IV (a) é sugerido para aplicação em alimentos, onde experimentos de

estocagem são imperativos, enquanto o passo IV (b) é necessário para avaliação dos efeitos antioxidantes da dieta no corpo humano, onde estudos de intervenção são necessários.

Dependendo da especificidade de cada método para medir a atividade antioxidante em substratos ou produtos podem-se gerar variações nos resultados obtidos. Vários autores relatam que nem todos os métodos de avaliação da atividade antioxidante fornecem os mesmos resultados (FRANKEL et al. 1994; BRAND-WILLIANS et al., 1995; KOLEVA et al. 2002; BECKER et al., 2004). Warner (1997), revendo as limitações para a análise da atividade antioxidante, sugeriu que a mesma seja medida usando-se mais de um método e que seja avaliado os produtos de oxidação primária e secundária, por meio de testes que meçam produtos ou substratos mais específicos. Entretanto, de uma forma geral, os métodos de medida da atividade antioxidante podem ser resumidos em diretos e indiretos.

2.7.1 Método Direto - Habilidade em inibir a oxidação de lipídeos em sistemas modelo

A maioria das análises de medida da atividade antioxidante consiste em acelerar a reação de oxidação em um sistema lipídico, geralmente por aquecimento e monitoramento do oxigênio consumido, com a perda de substrato ou a formação de um produto. A oxidação é afetada por fatores como temperatura, pressão do oxigênio, metais, composição e forma das gorduras, que podem causar variações nos

resultados dependendo das condições de oxidação usadas na análise (FRANKEL et al., 1994).

A avaliação de antioxidantes em sistemas modelo deve ser baseada nas mudanças de concentração dos compostos que estão sendo oxidados, na depleção do oxigênio ou na formação de produtos de oxidação. Os métodos do β-caroteno, TBARS e Rancimat são alguns exemplos, apesar de apresentarem algumas limitações (BECKER et al., 2004).

2.7.1.1 Paradoxo Polar

Em sistemas lipofílicos as taxas de reações de seqüestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos fenólicos entre a fase aquosa e lipídica, e dessa forma, reduzir a reação dos fenólicos polares com o radical não-polar (RICE-EVANS et al.,1996). A habilidade em quelar metais e de reagir com o radical α-tocoferol, regenerando-o, são mecanismos possíveis que tornam os flavonóides capazes de aumentar a estabilidade dos ácidos graxos (SHAHIDI et al., 1992; RICE-EVANS et al., 1996).

A atividade dos diferentes tipos de antioxidantes pode variar significativamente dependendo se os lipídeos são triacilgliceróis, metil ésteres, ácidos graxos livres ou incorporados em várias partículas biológicas tais como, lipoproteínas ou microssomos do fígado. Se os antioxidantes agem em meio aquoso é importante levar em consideração

o tipo de substrato, ou seja, se é óleo puro ou sistemas heterofásicos. A estabilidade oxidativa da maioria dos colóides e óleos em alimentos é extremamente afetada por uma grande variedade de substâncias ativas na superfície e de sua interação interfacial com os oxidantes e antioxidantes (FRANKEL, 1998).

Entretanto, segundo Frankel e Meyer (2000), a proteção relativa proporcionada por diferentes antioxidantes depende do tipo de substrato, por exemplo, fosfolipídeos, triacilgliceróis ou ácidos graxos livres, o grau de insaturação dos ácidos graxos bem como a estrutura do substrato oxidável. Em alimentos, as emulsões apresentam duas fases: óleo e água. Se a água é a fase contínua e o óleo a fase dispersa, a emulsão é do tipo óleo em água (O/A), por exemplo, o leite. No caso inverso, a emulsão é do tipo água em óleo (A/O), como no exemplo da manteiga.

Em sistemas multifases, a eficiência do antioxidante é grandemente afetada pelas propriedades de solubilidade, que determinam à distribuição dos compostos nas diferentes fases, incluindo a localização e orientação. Porter (1980) foi o primeiro a observar estas propriedades e descobriu que antioxidantes solúveis em água (antioxidantes polares) tendem a ser mais ativos do que antioxidantes solúveis em lipídeos (antioxidantes apolares) quando testados em óleo puro. Ao contrário, antioxidantes solúveis em lipídeos tendem a apresentar uma maior proteção para uma emulsão óleo em água do que os antioxidantes solúveis em água.

Segundo Huang et al. (1996), os antioxidantes hidrofílicos como o Trolox (ácido carboxílico derivado do α-tocoferol), o ácido ascórbico, o

ácido rosmarínico e o ácido carnosico (compostos presentes no alecrim) apresentaram maior atividade antioxidante em óleos puros do que os antioxidantes lipofílicos como o α-tocoferol, o ascorbil palmitato e o carnosol. Pórem, quando se utilizou um sistema de emulsão com óleo de milho a ordem da atividade desses antioxidantes foi invertida, confirmado o comportamento paradoxal dos antioxidantes. Esse fenômeno interfacial foi explicado por diferenças na afinidade dos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos para as fases ar/óleo e óleo/água assim como em suas interfaces.

Este fenômeno, chamado de "paradoxo polar" é baseado na suposição de que o início da oxidação de lipídeos está localizado na interface do sistema. Desta forma, a oxidação do óleo puro, ocorre na interface ar/óleo, onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação de emulsões está localizada na interface óleo/água onde os antioxidantes lipofílicos estão localizados (FRANKEL e MEYER 2000) (Figura 28).

Desta forma, em óleos puros os antioxidantes hidrofílicos são mais eficientes por estar pertos da interface ar/óleo onde eles podem dar maior proteção contra a oxidação lipídica. Ao contrário, nos sistemas de emulsão óleo em água, os antioxidantes hidrofóbicos estão situados no óleo e na interface óleo/água onde eles são mais protetores do que os antioxidantes hidrofílicos. Esses antioxidantes hidrofílicos são porcionados na fase aquosa e não são capazes de proteger adequadamente os lipídeos na interface óleo/água. Quando dissolvidos

na fase aquosa, os antioxidantes hidrofílicos podem tornar-se prooxidante resultante de uma redução de metais.

A partição de antioxidantes entre as fases óleo e água ocorre em diferentes extensões, de acordo com a polaridade e estrutura química. O conhecimento da partição e efetiva atividade antioxidante de compostos fenólicos naturais, em sistemas heterofásicos, são limitados e governados pela estrutura química destas substâncias (RICE-EVANS et al., 1996).

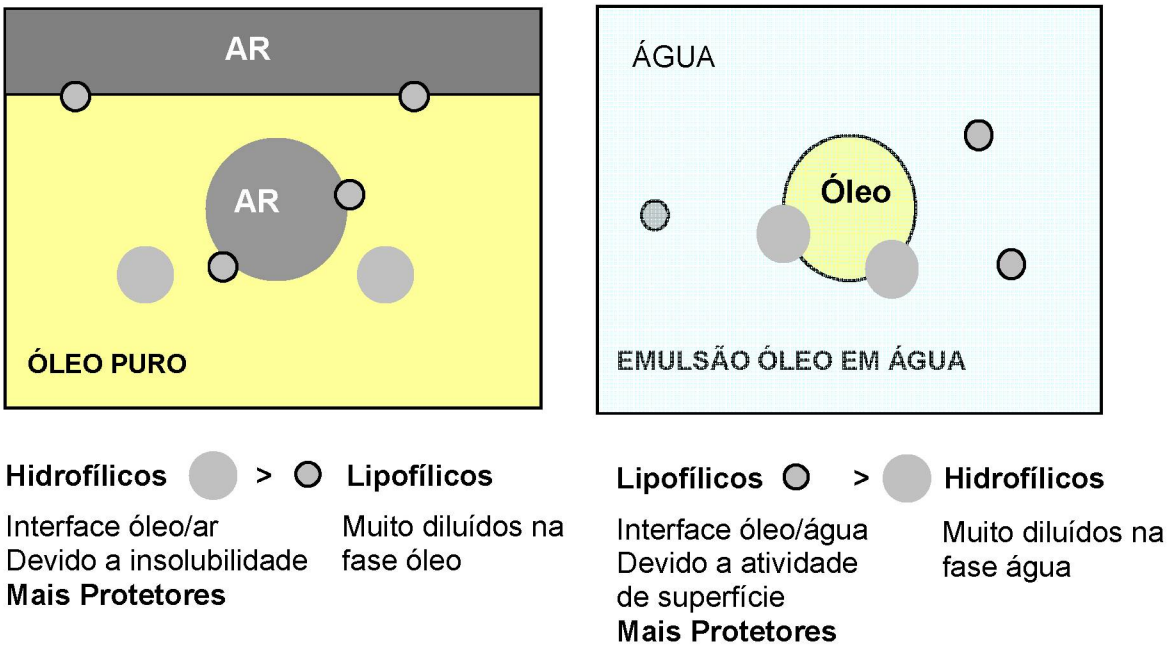


FIGURA 28 - DISTRIBUIÇÃO INTERFACIAL DE ANTOXIDANTES LIPOFÍLICOS E HIDROFÍLICOS EM ÓLEO PURO COMPARADO A EMULSÕES ÓLEO EM ÁGUA.
FONTE: FRANKEL e MAYER (2000).

2.7.1.2 Método da Lipoperoxidação pelo TBARS

O método TBARS é um dos mais utilizados para estudos de peroxidação lipídica. A avaliação da peroxidação lipídica é realizada pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, por meio de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malondialdeído, produzindo uma base de Shiff de coloração rosa (OHKAWA, 1979; BIRD e DRAPER, 1984). É um método simples e sensível para mensuração da peroxidação lipídica, embora não seja muito específico (MEAGHER e FITZGERALD, 2000).

Segundo Chen e Tappel (1996) o método de avaliação da proteção a lipoperoxidação pelo ensaio com o TBARS *in vitro* é utilizado para avaliar a inibição da peroxidação lipídica provocada por um pró-oxidante, peróxido de terc-butila, que causa dano oxidativo em homogenato de fígado. Yagi (1987) já relatava em seus estudos de peroxidação lipídica, concentração elevada de malondealdeído, produto final da peroxidação lipídica em tecidos cancerígenos quando comparado a tecidos normais.

Rebello (2005) avaliou a atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas, utilizando modelos in vitro e in vivo. A avaliação da atividade pró e antioxidante in vitro foram investigadas pelos métodos de captação do radical DPPH e pela medida de proteção da lipoperoxidação (TBARS). Neste estudo foi detectada uma relação dose-dependente para

o controle rutina e também para alguns análogos sintéticos da acetofenona.

2.7.1.3 Método do *β-caroteno*-ácido linoleico

Este ensaio baseia-se na perda de cor do β-caroteno durante sua cooxidação com o ácido linoléico em uma emulsão aquosa, monitorada com o decaimento da absorbância na região visível (MILLER, 1971). O ensaio quantifica a atividade antioxidante como porcentagem de inibição. Em princípio, o ensaio poderia ser mais quantitativo e reproduzível se o regime de cooxidação fosse transformado em um regime de controle da reação em cadeia.

Os métodos baseados na oxidação podem ser facilmente realizáveis dependendo das circunstâncias usadas, visto que no método do descoloramento do β-caroteno; o β-caroteno reage com os radicais livres dos compostos. O método é amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de vários tipos de amostras, tais como, compostos puros (ABDALLA et al., 1999), extratos de plantas (DAPKEVICIUS et al.,1999), grãos, frutas, vegetais e outros tipos de alimentos (KANNER et al., 1994; VELIOGLU et al., 1998).

Marco (1968) descreveu o uso do método de descoloramento do β-caroteno para avaliar os compostos bioativos com ação antioxidante. Neste método a atividade antioxidante é medida pela habilidade de um composto em minimizar a perda do β-caroteno durante a oxidação

acoplada do ácido linoléico e β-caroteno em um sistema aquoso emulsificante. A reação é inicializada usando aquecimento (50°C) e, embora o método seja simples e sensível, foi criticado por Frankel et al. (1994) por ser inespecífico, sendo sujeito à interferência da oxidação e agentes redutores nos extratos brutos, além do ácido linoléico não ser um representante típico dos lipídeos em alimentos.

A atividade antioxidante pelo método do β-caroteno é baseada na perda da coloração amarela do β-caroteno em função da reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico na emulsão. O descoloramento do β-caroteno, medido pelo decréscimo na absorbância inicial a 470 nm, é mais lento na presença de um antioxidante. Este método é sensível devido a forte absorção do β-caroteno, porém é mais lento que o método do DPPH (KOLEVA et al, 2002). Os reagentes são comuns e não há um tratamento especial prévio com a amostra, entretanto, é necessário usar nitrogênio para evaporação do solvente e na preparação da emulsão para se conseguir resultados reprodutíveis.

O método do β-caroteno emprega um emulsificante lipídico, o qual introduz um grande número de variáveis que influenciam a oxidação em comparação aos lipídeos puros. Neste método o complexo fenômeno interfacial chamado de *paradoxo polar* influencia o comportamento dos antioxidantes. Neste caso os antioxidantes apolares exibem fortes propriedades antioxidativas em emulsões porque eles estão concentrados na superfície lipídeo/ar e desta forma asseguram uma maior proteção. Por outro lado, os antioxidantes polares restantes na fase aquosa estão mais

diluídos e são desta forma, menos efetivos para proteger o lipídeo. O oposto é observado em óleos puros (KOLEVA et al., 2002).

Segundo Roedig-Penman e Gordon (1998), a presença de certos sais metálicos pode resultar no comportamento pro-oxidante de flavonóides. E se estes sais metálicos estão presentes na planta eles podem estar dissolvidos na fase aquosa e desta forma podem inibir a atividade dos antioxidantes ou serem convertidos a pro-oxidantes. Segundo Koleva et al. (2002), a atividade antioxidante medida pelo método do β-caroteno em extratos de *Sideritis Labiatae* da Bulgária, BHT e ácido rosmarínico apresentaram certa concordância com o fenômeno *paradoxo polar*. Os inibidores mais ativos do descoloramento do β-caroteno foram principalmente os extratos apolares. A maioria dos extratos mais polares como metanol, acetato de etila e 1-butanol exibiram atividade menor e próxima do ácido rosmarínico. Neste estudo os extratos aquosos de *Siderintis* mostraram efeito pro-oxidante (atividade negativa).

Entretanto, segundo Prat e Hudson (1990), em alguns casos, as características estruturais do antioxidante, como a localização dos grupos hidroxilas parece ser mais importante do que a polaridade dos extratos em si. Além disso, a composição complexa dos extratos pode provocar algumas interações como, efeito sinergístico, aditivo ou antagônico entre seus componentes e/ou o meio em que eles se encontram. Isso pode afetar também seu porcionamento nas fases do sistema. Neste sentido, Pekkarinen et al. (1999) salientam que o porcionamento dos antioxidantes nas diferentes fases da emulsão parece afetar a atividade antioxidante,

embora ela não seja proporcional à concentração do antioxidante na fase lipídica ou na interface.

A atividade antioxidante pelo método do β-caroteno pode ser útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos como os óleos essenciais. Por outro lado, se compostos polares forem testados apenas pelo método do β-caroteno pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante desses compostos. Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos como o método do DPPH* que independe da polaridade do substrato.

2.7.2 Método Indireto - Seqüestro de radical

Os radicais livres estão envolvidos na propagação da oxidação lipídica e muitas espécies de diferentes reatividades são formadas como o $^{\bullet}OH$, $O_2^{\bullet -}$, ROO•, RO•, etc. Muitas vezes, alguns radicais relativamente estáveis são preferidos na análise de seqüestro desses radicais livres, como por exemplo o $ABTS^{+}$ (2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o DPPH• (2,2 difenil-1-picrilhidrazina). Ambos apresentam uma excelente estabilidade em certas condições, mas também apresentam importantes diferenças em suas respostas antioxidantes e em sua manipulação (BRAND-WILLIANS et al., 1995; ARNAO, 2000).

O método de seqüestro de radical opera pela medida direta da doação do átomo de hidrogênio ou transferência de elétron de um antioxidante em potencial a moléculas do radical livre em sistemas livres

de lipídeos. Entretanto, esses métodos necessitam de substratos de oxidação, e não refletem a situação *in vivo* ou a peroxidação em alimentos (ARNAO, 2000; BECKER et al., 2004).

2.7.2.1 Método do $ABTS^{+}$ (2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O método ABTS+ foi primeiramente sugerido por Rice-Evans et al.(1994) para avaliar amostras biológicas e, então foi amplamente aplicado no estudo de alimentos e fenólicos naturais solúveis em água. O princípio do método consiste em monitorar o decaimento do radical ABTS produzido pela oxidação do 2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), causada pela adição de uma amostra contendo fenólicos. O ABTS absorve na faixa de 600–750 nm e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria. Na ausência de fenólicos, o ABTS é estável, mas ele reage energeticamente com um doador de H, como os fenólicos, sendo então convertido em uma forma incolor de ABTS. Os autores determinaram que a quantidade de ABTS consumida está relacionada à reação com os fenólicos presentes na amostra, a qual é expressa em equivalentes Trolox (unidades de concentração). Este valor foi designado TEAC, sigla em inglês para capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. Como o TEAC para o Trolox foi definido como sendo 1, o valor TEAC para um antioxidante individual é o número de radicais ABTS consumidos para cada molécula de antioxidante (CAMPOS e LISSI, 1997). Suas principais limitações são: o valor TEAC caracteriza a

capacidade da amostra estudada em reagir com o ABTS, mais do que sua capacidade de inibir o processo oxidativo; a reação com o ABTS ocorre de forma lenta com vários fenólicos e amostras de produtos naturais (CAMPOS et al., 1996); o resultado da determinação do TEAC depende do tempo de incubação, assim como a razão entre a quantidade de amostra e a concentração do radical; além da pequena seletividade do ABTS na reação com doadores de H é mais uma limitação do método (ARTS et al., 2004).

2.7.2.2 Método do radical DPPH• (2,2 difenil-1-picrilhidrazina).

O radical estável orgânico DPPH• é amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante em compostos simples (BRAND-WILLIAMS et al.,1995), extratos de plantas (YEN e DUH, 1994) e alimentos (YAMAGUCHI et al., 1998). Nos últimos anos, o DPPH tem sido usado para testar a capacidade de seqüestrar o radical livre em produtos da apicultura, como o pólen (CAMPOS et al., 2003; SILVA et al., 2006; LEJA et al., 2007), própolis (KUMAZAWA et al., 2004) e mel (MEDA et al., 2005). Esse radical é muitas vezes preferido na análise de seqüestro de radicais livres em função da sua rapidez e simplicidade (KOLEVA et al., 2002; LU et al., 2003).

Esse método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH• a 517 nm na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), devido a formação de um não radical (DPPH-H) (Equação 13).

DPPH• + AH ⟶ DPPH-H + A• (13)

O DPPH remanescente na reação após certo tempo corresponde inversamente à atividade de seqüestro do antioxidante que compõe a matriz. Esse método permite testar substâncias lipofílicas e hidrofílicas, ou seja, independe da polaridade do substrato (KOLEVA et al., 2002). Yamaguchi et al. (1998) sugeriram que a lipofilicidade e hidrofilicidade dos antioxidantes não afetam as reações com o DPPH, uma vez que foi observada similaridade entre as atividades de seqüestro de radicais livres do Trolox e α-tocoferol.

Pode-se verificar pela estrutura do DPPH (Figura 29), que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958). O radical livre DPPH• na presença de um antioxidante doador de hidrogênio pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina (KOLEVA et al. 2002).

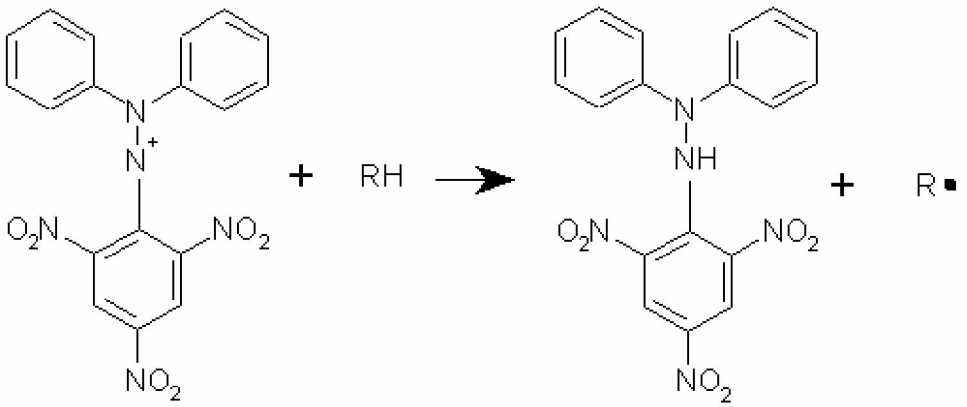


FIGURA 29 - REAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH COM UMA MOLÉCULA ANTIOXIDANTE
FONTE: BRAND-WILLIAMS et al. (1995).

Segundo Arnao (2000), o radical DPPH• é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm em meio metanólico e sua solução possui uma coloração violeta intensa. Esta redução pode ser acompanhada espectrofotometricamente em 517 nm, pela diminuição da absorvância, com simultânea mudança de coloração violeta escura original do radical para uma coloração amarela do produto reduzido, descorando a medida que a reação se processa. Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH• residual mensurado após certo tempo, corresponde inversamente à capacidade antioxidante da substância analisada. A intensidade dessa mudança de coloração é proporcional à concentração das substâncias com potencial antioxidante presente, de conformidade com as leis de Lambert e Beer (BLOIS, 1958). Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absortividade desaparece (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

Segundo Brand-Williams et al. (1995), o radical estável DPPH gera resultado similar a um método de oxidação lipídica. Entretanto, não é possível se fazer uma comparação quantitativa porque as reações com o radical DPPH dependem da conformação estrutural dos compostos. Além disso, há substâncias antioxidantes que reagem de forma particular com o DPPH• implicando em uma cinética diferenciada. Entre eles existem compostos que reagem lentamente, levando horas para reagir como o guaiacol, BHT e BHA, os compostos de cinética rápida, que levam poucos segundos como o ácido ascórbico e isogenol e os de cinética

intermediaria, com reações entre cinco e trinta minutos, como o alfa-tocoferol e o ácido rosmarínico. Essas diferenças parecem ser decorrentes não só de um impedimento esteárico (HOGG et al., 1961) como também da presença e do número de hidroxilas existentes nessas moléculas, as quais podem doar H^+ para estabilizar o radical livre.

Desta forma, quando se avalia a atividade antioxidante de extratos de plantas, os quais são constituídos por uma variedade indefinida de compostos com potencial antioxidante, torna-se imprescindível estudar o comportamento nas condições experimentais em vários intervalos de tempo, com o objetivo de determinar a cinética adequada de reação.

O resultado da atividade antioxidante pelo método do radical estável DPPH• pode ser expresso de várias formas. Por exemplo, pode-se expressar os resultados como a capacidade de seqüestrar/reduzir o radical DPPH• em porcentagem (LU e FOO, 2000;CHOI et al., 2002), pelo valor de EC_{50}, ou seja, a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH• e ainda pelo poder antioxidante ou poder anti-radical, o qual expressa a relação inversa do EC_{50} (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

2.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PÓLEN APÍCOLA

O pólen apícola ou produtos a base de pólen apícola tem demonstrado várias aplicações benéficas à saúde humana. O pólen das flores, fonte primária de alimentação das abelhas, contém compostos

fitoquímicos, nutrientes e são ricos em carotenóides, flavonóides e fitosteróis (MIZRAHI e LENSKY, 1997). O pólen apícola tem ação antimicrobiana, porém ele é mais conhecido por sua atividade antioxidante.

Leja et al. (2007) estudaram os constituintes fenólicos (fenólicos totais, fenilpropanóides, flavonóis e antocianinas) de pólen apícola de 12 espécies diferentes da região da Krakow na Polônia. Neste estudo foi encontrada uma grande variabilidade de compostos fenólicos nas espécies investigadas e, na maioria dos pólens examinados a alta atividade antioxidante estava relacionada ao nível de fenilpropanóides. A participação dos flavonóides nos compostos fenólicos totais diferiu consideravelmente em função da origem floral, de 4,78% (*Lamium purpureum*) a 37,3% (*Chamerion angustifolium*).

Serra Bonvehi et al. (2001) verificaram no pólen apícola da Espanha a presença de vários compostos antioxidantes (substâncias polifenólicas e flavonóides). Neste estudo 15 compostos foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência com gradiente de fase reversa, sendo que 13 foram identificados e quantificados usando detector de arranjo de diodos. Os compostos predominantes foram flavonóides glicosilados e principalmente flavonols. Vinte e oito porcento das amostras continham pelo menos 14 tipos de compostos fenólicos, como por exemplo rutina, quercetina, miricetina e ácido trans cinâmico.

A rutina é o melhor identificador de flavonóides agliconas livres. Uma quantidade mínima de 200mg de rutina/kg de pólen é sugerida para

se garantir as propriedades nutriticionais e biológicas do pólen apícola, bem como para a aceitação do mesmo pelo mercado Europeu (SERRA BONVEHÏ et al., 2001).

Vários estudos sugerem que estes compostos têm importância na redução da incidência de doenças degenerativas tais como câncer e arteriosclerose (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). Os flavonóides tais como o quercetina, rutina e apigenina demonstraram inibição de tumores carcinogênicos induzidos em ratos. Estes compostos atraíram muita atenção no campo da nutrição, saúde e da medicina, como resultado das crescentes evidências que eles podem agir como potentes antioxidantes. Por outro lado, uma dieta contendo grandes quantidades de lipídeos, os quais geram radicais lipídicos ROO*, certamente aumentam a carcinogênese do colo em ratos tratados com *N-nitroso-N-methylurea*. Isto sugere promover o câncer ou o potencial carcinogênico dos radicais ROO*. Desta forma, uma dieta rica em compostos seqüestradores de radicais poderia reduzir a ação cancerígena dos radicais ROO* (WEI et al., 1990; DESCHNER et al., 1991).

Os extratos de pólen apícola (Cernilton) têm sido usados com menos evidência de sua eficácia para hiperplasia prostática benigna (BPH). Em função da sobreposição de sintomas do trato urinário entre BPH e a prostatite crônica, esse produto, sozinho ou em combinação foi recomendado também para homens com prostatites. Cernilton, um extrato do pólen da abelha, foi usado em condições prostática pelos seus efeitos antiinflamatórios e antiandrogênico (SHOSKES, 2002). Buck et al. (1989) relataram melhorias nos sintomas dessa doença em 15 pacientes.

Em uma escala maior, estudos recentes com 90 pacientes que receberam um tablete de Cernilton-N, três vezes ao dia durante seis meses, tiveram melhoras nos sintomas prostáticos (RUGENDORFF et al., 1993). Pacientes com complicações (cálculos prostáticos, prostatites) apresentaram uma resposta mínima, sendo que somente 1 entre 18 indivíduos mostraram melhoras. Entretanto em pacientes sem essas complicações, 36% foram curados e 42 apresentaram melhoras de seus sintomas. Os efeitos colaterais nos estudos do cernilton para BPH e prostatites foram insignificantes (WILT et al., 2000).

Tradicionalmente o pólen é considerado como um protetor do corpo humano contra várias doenças e por aumentar a imunidade (DUDOV et al., 1994). Embora o pólen de algumas plantas possa causar alergia e febre do feno (hay fever), o pólen apícola pode ajudar na redução dos sintomas, quando ingerido pólen apícola do local onde a pessoa mora e sob orientação médica (GREENBERGER et al., 2001).

Em geral, e comparado aos vários alimentos, o pólen é rico em proteínas, possui baixo teor em gordura e alto teor em minerais e vitaminas. Desta forma, Bell et al. (1983), sugeriram que o pólen apícola pode melhorar a alimentação materna sem afetar o desenvolvimento normal do feto, por ser um nutriente prático e eficaz para as mulheres durante a gravidez.

Altas quantidades de ácido fítico são encontradas em pólen apícola. O ácido fítico é um antioxidante natural das plantas, e é, encontrado em grãos, cereais, amêndoas e legumes. Dietas contendo

ácido fítico podem baixar a incidência do câncer de colo do útero e proteger contra outras doenças inflamatórias (GRAF e EATON, 1990).

A ação inibitória de extratos de pólen apícola de cinco regiões diferentes da Turquia contra os microrganismos *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporium f. sp. Melonis* foi investigado por Özcan et al. (2004). O efeito inibitório dos extratos desses pólens contra ambos os microrganismos testados foi estatisticamente significativo ($p< 0,01$)

Recentemente, Basim et al. (2006) avaliaram a atividade antibacteriana do pólen da Turquia contra treze bactérias fitopatogênicas que causam várias pragas em frutas e vegetais como, *Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium vitis, Clavibacter michiganensis, Erwinia amylovora, Xanthomonas vesicatoria pv vesicatoria, Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria, Pseudomonas syringae pv. tomato*, entre outras. As zonas de inibição apresentaram variações em relação a concentração de extrato de pólen utilizados. De acordo com as análises estatísticas, entre as bactérias testadas a *A. tumefaciens* foi a mais sensível na concentração de 1/5 dos extratos de pólen. A sensibilidade das bactérias seguiu a seqüência *A. tumefaciens*, *P. syringae* pv. *tomato*, X. *axonapodis* pv. *vesicatoria* > *E. amylovora*, *P. conrrugata*, *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* > *A. vitis*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* > *E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, P. *syringae* pv. *phaseolicola* > *P. syringae* pv. *syringae*. Nenhuma atividade antibacteriana foi encontrada com os extratos de pólen apícola na concentração de 1/100.

A antividade antibacteriana de vinte e cinco amostras de méis, contendo pólen de diferentes origens botânicas da Espanha, foram avaliados contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os méis de Labietae e *Rosmarinus officinalis* exibiram grande atividade contra a bactéria testada (GARCÍA et al., 2001).

2.9 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DO PÓLEN APÍCOLA

Os produtos apícolas, dentre eles o pólen, são comercializados em várias regiões do país e no exterior, segundo suas propriedades nutricionais e medicinais. Todos eles, entretanto, estão submetidos ao registro como alimentos ou suplementos alimentares, que segundo Paulino (2004), não corresponde à plena verdade de suas funções.

Segundo a Normativa nº. 03 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001), que estabelece o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Pólen Apícola, o pólen apícola é definido como resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuado pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido na entrada da colméia. O pólen apícola desidratado é o produto submetido ao processo de desidratação em temperatura não superior a 42ºC. Os padrões de identidade e qualidade estão apresentados na Tabela 5.

A Normativa nº. 03 (BRASIL, 2001) determina que o pólen apícola deve ser embalado com materiais bromatológicos e não deverá conter

substâncias estranhas de qualquer natureza. Os critérios microbiológicos são mostrados na Tabela 6.

TABELA 5 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA QUALIDADE DO PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO

Parâmetros	Valores
Umidade	Máximo de 4%
Cinzas	Máximo de 4% *
Lipídeos	Mínimo de 1,8%*
Proteínas	Mínimo 8%*
Açúcares Totais	14,5 a 55,0 %*
Fibras Brutas	Mínimo 2%*
Acidez Livre	Máximo 300 mEq/kg
pH	4 a 6
Flavonóides	presença
Aditivos	ausência

* m/m base seca
FONTE: BRASIL (2001).

TABELA 6: PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO PÓLEN APÍCOLA BRASILEIRO

Microrganismo	Critério de aceitação	categoria I.C.M.S.F **	Método de análise
Coliformes a (45ºC)/g	n=5 c=0 m=0	5	APHA 1992 c.24
Salmonella ssp / *Shigella* spp (25g)	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93^{A} 1985
Fungos e leveduras UFC/g*	n=5 c=2 m=10 M=100	2	FIL 94B: 1990
Paenibacillus larvae	n=5 C=0 M=0	-	-

* UFC/g : Unidade formadora de colônia **International Comission on Microbiological Specifications for Foods
FONTE: BRASIL, 2001.

2.10 ATIVIDADE E MERCADO DE PÓLEN APÍCOLA NO BRASIL

A apicultura é uma das raras atividades pecuárias que não têm impacto ambiental negativo. Ao contrário, transforma o apicultor em um *ecologista prático*. Pois, a polinização intensiva favorece a manutenção da biodiversidade, causando impacto positivo na sustentação do ecossistema local, bem como aumento de produtividade em diversas culturas. No Brasil há uma grande disponibilidade de matéria-prima e atualmente, exploram-se apenas 15% do potencial da flora apícola (BARRETO et al., 2006).

A produção brasileira de pólen apícola iniciou-se de forma modesta no final da década de 80. Atualmente, o mercado favorável ao consumo de produtos naturais, complementares à dieta ou com efeitos terapêuticos, vem estimulando e promovendo essa modalidade da cadeia produtiva apícola. Se, por um lado, a procura e o consumo pelo produto vem aumentando, por outro não se constata que a produção científica brasileira sobre o tema tenha se ampliado com a mesma velocidade (FUNARI et al., 2006).

Segundo Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997), um dos primeiros países a estabelecer normas para a padronização do pólen apícola foi a Espanha, pois a carência de normativas específicas sobre a qualidade do pólen apícola espanhol resultou na expansão da comercialização de produtos de baixa qualidade e conseqüente perda do mercado europeu.

Barreto et al. (2006) avaliaram o perfil da produção do pólen apícola no Brasil. Neste estudo foram coletados dados sobre a produção, processamento e comercialização do produto por meio de informações fornecidas por produtores e Associações Apícolas em cada Estado do país. Os resultados mostraram a existência de dois importantes pólos produtivos no país: a Região Sul, tendo Santa Catarina como principal Estado produtor; e o Nordeste, tendo a Bahia como maior produtor. Neste estudo verificaram-se que ainda existem regiões brasileiras não produtoras de pólen, porém com alto potencial produtivo, como o Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Ceará. No que se refere à produção média de pólen por colméia/mês, esta variou de 900 g no Estado do Rio Grande do Sul até o extraordinário recorde de 48 kg registrado no município de Canavieiras/Bahia e proporcionado pela florada de cajá e camaçari, com coletores especialmente desenvolvidos (tipo tropical africanizado baiano).

Ainda, segundo as Associações de Apicultores dos Estados Brasileiros, a produção de pólen apícola no Estado do Paraná é concentrada por poucos apicultores cadastrados, os quais disponibilizam 300 colméias para a produção de pólen. Nesse Estado a produção varia de 1.200 a 1.900g de pólen/mês/colméia durante os meses de agosto a março. No Estado do Rio Grande do Sul a produção de pólen apícola não é representativa, pois são registrados apenas dois apicultores com 70 colméias destinadas à produção de pólen, com uma produção mensal de pólen por colméia que varia de 900 a 2200g de pólen/mês/colméia e produzidos no período de setembro a abril. O pólen que abastece o Estado do Rio Grande do Sul é comprado em Santa Catarina. Entretanto,

o Estado de Santa Catarina possui 480 colméias com 15 apicultores cadastrados, sendo considerado um pólo nacional importante visto a produtividade durante os meses de agosto a abril, que varia de 930 a 4000g de pólen/mês/colméia, e caracterizado com Estado desenvolvedor de tecnologias adequadas para o beneficiamento do pólen apícola (BARRETO, 2002).

Um dos grandes desafios do mercado é padronizar o preço do pólen apícola no Brasil, uma vez que o quilo do produto apresenta variações no atacado, sendo entre R$ 10,00 a R$ 15,00 para o pólen não processado, R$ 15,00 a R$ 40,00 para o pólen processado e entre R$ 40,00 a R$ 150,00 no varejo. Outra questão importante é a necessidade de regularização do produtor de pólen no que se refere à inspeção, pois, a maioria encontram-se na clandestinidade, seja por desconhecimento, falta de incentivo ou por encontrar grandes dificuldades na regularização perante os órgãos competentes. Nos estados brasileiros podem-se encontrar desde produtores com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), bem como sem registro (FUNARI et al., 1998).

Quanto a rota de comercialização do pólen apícola, os estados brasileiros, em sua maioria, produzem somente para o consumo próprio. O Estado do Paraná, além de atender as necessidades internas, comercializa para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A Bahia, da mesma maneira, abastece o seu próprio território e exporta pólen para os Estados já citados. Por outro lado, Santa Catarina, além de distribuir o produto em praticamente todos os Estados do Brasil, conta com um produtor exportando para Colômbia e Uruguai (BARRETO

et al., 2006). Segundo Paulino (2004), a baixa produtividade dos apiários brasileiros é explicada pela pouca utilização de recursos tecnológicos na produção.

.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras de pólen

As amostras de pólen apícola foram fornecidas por apicultores dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Todas as amostras de pólen foram coletadas de colméias de abelhas *A. mellífera* durante o ano de agosto 2005 a abril de 2006. Foram coletadas 36 amostras de pólen nas três regiões estudadas, sendo dez amostras do Estado do Rio Grande do Sul, dez do Estado de Santa Catarina e 16 amostras do Estado do Paraná, conforme descrito na Tabela 7. As amostras foram armazenadas em freezer à -18 ºC, até o momento das análises.

TABELA 07 - LOCALIDADES DE ORIGEM DO PÓLEN APÍCOLA E DENOMINAÇÕES DAS AMOSTRAS

Região de coleta	Pólen
Altônia, PR	PR 16
Arvorezinha, RS	RS 07
Balneário Pinhal, RS	RS 05
Balsa Nova, PR	PR 15
Campos Novos, SC	SC 04, SC 05, SC 06, SC 07, SC 08
Canoinha, SC	SC 02
Cruz Alta, RS	RS 02
Curitiba, PR	PR 04, PR 14
Encruzilhada do Sul, RS	RS 09
Fraiburgo, SC	SC 01
Ijuí, RS	RS 01
Itaiópolis, SC	SC 10
Lapa, PR	PR 01, PR 02
Machadinho, RS	RS 03, RS 04, RS 10
Morretes, PR	PR 07
Ortigueira, PR	PR 13
Palmeira, PR	PR 03
Pato Branco, PR	PR 05
São João da Urtiga, RS	RS 06, RS 08
São Joaquim, SC	SC 03
União da Vitória, PR	PR 06, PR 08, PR 09, PR 10, PR 11, PR 12
Urupema, SC	SC 09

3.1.2 Preparo dos Extratos Etanólicos do Pólen (EPE)

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar das melhores condições de extração em duas amostras, uma coletada no Estado de Alagoas, mas de procedência desconhecida, e outra da cidade de União da Vitória–PR, do apiário do Médico Veterinário Henrique Felix Breyer. As amostras de pólen (2g) foram trituradas, homogeneizadas e extraídas individualmente com 15 mL de etanol em diferentes concentrações (40, 50, 60, 70, 80 e 90% v/v), respectivamente. A extração foi feita a 70°C, em banho de água termostatizado, por 30 minutos sob agitação

constante. Após a filtragem em papel de filtro Whatman nº 5, os sobrenadantes obtidos foram armazenados em tubos de ensaio com rosca a 0 ºC para posterior determinação dos compostos fenólicos totais, flavonóides, atividade antioxidante e antibacteriana e análises cromatográficas. Os demais extratos etanólicos das amostras de pólen apícola foram preparados conforme descrito por Carpes et al. (2007) e apresentado em anexo 1.

3.1.2.1 Purificação dos extratos etanólicos de pólen em resina hidrofóbica

Primeiramente 100g de pólen apícola foi extraído com 100 mL de etanol 70%, a 70^0C, em banho-maria por 30 minutos. O extrato obtido foi acidificado a pH 2 e misturado com 100g de resina Amberlite XAD2 (Supelco, Bellefonte, PA, USA, poros de 9 nm e partícula de 0,3-1,2 mm). O extrato de pólen foi homogeneizado durante 10 minutos e empacotada em coluna de vidro (25 x 2 cm). A coluna foi eluída com 100 mL de água ácida pH 2, 300 mL de água destilada pH 7 e em seguida com 300 mL de metanol p.a. A fração metanólica foi evaporada sob vácuo em evaporador rotativo e, a fase orgânica recuperada para a determinação de compostos fenólicos, flavonóides, atividade antioxidante (seqüestro do radical DPPH) e análises cromatográficas por CLAE-DAD e CG-EM.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Proteína Total

O teor de proteína foi determinado segundo o método do 928.080 da AOAC (2000). Aproximadamente 0,7g de pólen moído foi digerido em balão macro Kjeldahl com 4g da mistura catalítica (1:3 de $CuSO_4$ e K_2SO_4) e 20 mL de H_2SO_4 concentrado. A solução digerida foi adicionada 80 mL de NaOH 40% para a liberação da amônia, a qual foi recolhida dentro de uma solução de H_2SO_4 e, então, titulada com uma solução padronizada de NaOH 0,1 M. Para determinação do teor proteína total, os valores de nitrogênio foram multiplicados pelo fator de conversão de 6,25 (ROULSTON et al., 2000).

3.2.2 Atividade de água (A_w).

Este parâmetro foi determinado a 22ºC com medidor de atividade de água PawKit (Decagon), segundo metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.2.3 Umidade

Aproximadamente 2g de pólen previamente moídos foram secos em estufa a vácuo a 60ºC até massa constante, conforme metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.2.4 Fibras

Dois gramas de pólen moído e desengordurado em éter de petróleo, foram digeridos a quente com solução de H_2SO_4 0,113 M e posteriormente com NaOH 0,313 M, por um período de 30 minutos em cada digestão. Após a neutralização do resíduo com água quente foi feita a lavagem com 20 mL de álcool etílico e 10 mL de éter etílico. O resíduo foi, então, incinerado a 550 ºC em mufla e as fibras quantificadas por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ ,1985).

3.2.5 Lipídeos

Os lipídeos totais foram determinados por gravimetria segundo a metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). Dois gramas de pólen moído foram extraídos com éter de petróleo à quente, em aparelho Soxhlet, por aproximadamente 4 horas.

3.2.6 Cinzas

Dois gramas de pólen moído foram colocados em cadinhos de porcelana e incinerados em mufla a 550 ºC, até obtenção de cinzas brancas (aproximadamente 4h). Após o resfriamento em dessecador, as cinzas foram determinadas por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.2.7 Açúcares

O teor de açúcar total e açúcar redutor foram determinados pelo método espectrofotométrico de *Somogy-Nelson* e, lido em Espectrofotômetro UV-Vis Femto Modelo 482 R a 535 nm (SOMOGY, 1945).

3.2.8 Minerais

Os minerais foram determinados por inceneração de 1,5 g de pólen a 550 ºC, até massa constante. As cinzas foram solubilizadas com 25 mL de HNO_3 50%, aquecidas em banho-maria por 30 min e filtradas em balão volumétrico de 100 mL. Após a aferição com água destilada quente, os minerais foram analisados em Espectrofotômetro de Absorção Atômica Varian Modelo Spectra AA 100 & 200, em comprimento de onda específico para cada mineral (Fe, Ca, Zn, K, Na, Cu, Mg e Mn). O teor de fósforo foi analisado em Espectrofotômetro Ultravioleta Shimadzu modelo UV-1601 PC a 650 nm (AOAC, 2000).

3.2.9 Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau, utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteau é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos

fosfomolíbdicos e fosfotungsticos (SINGLETON et al., 1999). Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. Os extratos de pólen foram diluídos em água 1:25. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra diluente foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteau (Sigma Co.) diluído em água destilada 1:10 (v/v). A esses reagentes foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4% (v/v). Após duas horas de repouso foram realizadas leituras em espectrofotômetro SHIMADZU Modelo UV 1240 V a 740 nm. O branco foi conduzido nas mesmas condições. Foi construída uma curva analítica contendo 10, 25, 40, 70, 85 e 100 ppm de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE/g de pólen. GAE: equivalente em ácido gálico (SINGLETON et al., 1999).

3.2.10 Flavonóides Totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada conforme método descrito por Park et al. (1995), com algumas modificações. Alíquota de 0,5 mL do extrato de pólen diluído em água (1:10 v/v) foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 4,3 mL de etanol a 80% (v/v), 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10% (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio 10% (m/v). Após 40 minutos de repouso, as leituras foram feitas em espectrofotômetro SHIMADZU Modelo UV 1240 V, a 415 nm. Tubos em branco foram conduzidos nas mesmas condições, sem adição de nitrato de alumínio. Foi construída uma curva analítica contendo 10, 25,

40, 70, 85 e 100 ppm de quercetina e os resultados expressos em mg quercetina/g de pólen apícola (DOWD, 1959).

2.2.11 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A determinação do espectro de absorção foi realizada segundo o método descrito por e Park et al. (1997), Ikegaki (2001) e Alencar (2005). Alíquotas do EPE nas concentração de 90 ppm, tiveram seus espectros de absorção na região UV-visível determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm, em um espectrofotômetro UV Mini 1240 (Shimadzu Co.).

3.2.12 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) dos EPE

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência do EPE foi realizada de acordo com o método descrito por Park et al. (2000) e Alencar et al. (2005). Alíquotas de 10 μL na concentração 133,37mg/mL foram aplicadas em placas RP18 F_{254} S (Merck Co). O tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 3 horas, utilizando-se um sistema etanol: água destilada (55:45, v/v), como fase móvel. As cromatoplacas foram visualizadas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, antes e após a revelação com anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100ºC, por 5 min.

3.2.13 Análises biológicas dos extratos etanólicos do pólen apícola

3.2.13.1 Atividade antibacteriana dos extratos de pólen pelo método de difusão em ágar

As análises de atividade antibacteriana foram realizadas no Laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), sob a supervisão do Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen.

O método de difusão em ágar foi aplicado nos extratos de pólen apícola, segundo Blair et al. (1958). Neste estudo, utilizaram-se cinco bactérias patogênicas humanas (*Bacillus subillis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e *Klebsiella pneumoniae*) e quatro bactérias fitopatogênicas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas vesicatoria* pv vesicatoria, *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria, *Pseudomonas syringae* pv. tomato). Foram aplicados 40 µL dos extratos de pólen (133,37mg/mL), em cilindros de aço-inox estéreis, dispostos nas placas de Petri, previamente inoculadas. Após a incubação em estufa a 37°C por 24 horas, a atividade antibacteriana foi determinada através da medida do diâmetro da zona de inibição (mm) ao redor de cada cilindro. O solvente utilizado na extração, etanol 70% (v/v), foi usado como controle negativo e a clorexidina 0,12% (v/v) foi usada como controle positivo. Os testes foram realizados em duplicata.

3.2.13.2 Concentração inibitória mínima (CIM) em meio líquido

A determinação da CIM foi realizada de acordo com a técnica descrita por Koo et al. (2000) e Duarte et al. (2003), onde foram utilizados tubos contendo meio de cultura líquido BHI (Brain heart infusion). Neste estudo, utilizaram-se cinco bactérias patogênicas humanas (*Bacillus subillis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e *Klebsiella pneumoniae*). No método da CIM, tubos contendo 4960 µL de caldo BHI, previamente inoculados foram incubados após a adição de 40 µL dos extratos, cujas concentrações variaram de 133,37 a 33,34mg/mL (concentrações seriadas de razão 2). Foi considerada CIM a menor faixa de concentração do extrato em que não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura de absorbância menor que 0,05 em 660 nm. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.2.13.3 Atividade Antioxidante dos Extratos de Pólen

3.2.13.3.1 Atividade de seqüestro do radical DPPH•

A medida da atividade seqüestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazina) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante os EPE (extratos

etanólicos do pólen) foram reagidos com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. As soluções estoques (133,33mg/mL) foram diluídas a concentrações finais de 6,67 mg/mL até 0,25mg/mL. Essa faixa de concentração se fez necessária devido às particularidades de cada amostra de pólen apícola.

A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5mL das amostras, 3 mL de etanol absoluto e 0,3mL da solução do radical DPPH 0,3 mM em etanol. As substâncias de referência (BHT, BHA e α-tocoferol) foram avaliadas na concentração final de 90µg/mL.

Fez-se uma cinética de cada pólen para determinar o tempo necessário para chegar à estabilização das absorbâncias. A redução do radical do DPPH foi medida por meio de um monitoramento contínuo do declíneo da absorbância a 517 nm, a cada 20 min até valores estáveis de absorção.

Uma das formas de se expressar a atividade antioxidante pelo método do DPPH é através do EC_{50}, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação. Desta forma, leva-se em consideração o branco específico dos extratos nas várias concentrações utilizadas em cada amostra. O branco específico da amostra foi determinado usando 3mL de etanol e 0,5mL da amostra em cada concentração e as absorbâncias lidas a 517 nm após o

tempo de estabilidade da reação. Um tubo contendo 3mL de etanol e 0,3 mL de DPPH 0,3 mM serviu como controle negativo.

Os valores de EC_{50} foram calculados por regressão linear de gráficos onde o eixo das abscissas (X) representa a concentração em mg/mL e o eixo das ordenadas (Y) a % média da atividade antioxidante das triplicatas segundo a fórmula de Mensor et al. (2001) (Equação 14).

$$\% AA = 100 - \{ [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) X 100] / Abs_{controle}\} \quad (14)$$

3.2.13.3.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β-caroteno e ácido linoléico

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoléico, de acordo com Ahn et al. (2004). Foram pesados 10 mg de β-caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio – β-caroteno e adicionada a 40mg de ácido linoléico e 400mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 min. Alíquotas de 3 mL da emulsão β-caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 300 µL do EPE diluídos 1:20 (v/v) em etanol a 70% (v/v). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas com incubação a 50ºC, para a reação de oxidação. A amostra controle continha 300 µL de etanol a 70%. A

atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, usando a Equação 15:

$$AA = (DR_C - DR_S)/DR_C \times 100 \quad (15)$$

onde AA representa a atividade antioxidante, DR_C a taxa de degradação da amostra controle (=ln(*a/b*)/120); DR_S a taxa de degradação da amostra contento a substância teste (=ln(*a/b*)/120); *a* a absorbância inicial no tempo 0 e *b* a absorbância depois de 120 min. O EPE e as substâncias de referência (BHT, BHA e α-tocoferol) foram avaliadas na concentração final de 90µg/mL .

3.2.14 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

Os extratos etanólicos de pólen (EPE) foram analisados por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Shimadzu equipado com coluna RP-18 ODS-A (4,6mm × 250 mm x 5µm) e um detector de arranjo fotodiodo (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). Os EPE (100mg/mL) foram filtrados com um filtro 0,22 µm (Millipore) e injetados 10µL. A fase móvel foi composta de um gradiente linear de ácido acético: água (1:20) (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), iniciando com 5% B e aumentando até 60% B (40 min), mantendo-se em 90% B (55–60 min), e decrescendo até 5% B (60–70 min) com vazão de solvente de 1 mL/min. Os cromatogramas foram analisados a 260 nm,

conforme descrito por Alencar et al. (2007). Os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonóides (Extrasynthese Co.) foram examinados: ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido cinâmico, ácido gálico, quercetina, canferol, caferide, apigenina, isosacuranetina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina e miricetina.

3.2.15 Cromatografia Gasosa com espectrometria de massas (CG-MS).

As análises por CG-EM dos extratos de pólen foram realizadas de acordo com o método modificado descrito por Markham et al. (1996). Alíquotas de 400 μL de cada extrato alcoólico foram colocados dentro de *vials* de vidro e adicionados 1 mL de uma solução etérea de diazometano (CH_2N_2) para a metilação. As amostras foram mantidas em banho de gelo por 4 horas para completa reação de metilação. As soluções resultantes foram secas com sulfato de magnésio anidro e analisadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e um detector operando no modo *scanning* (*m/z* 40-500). A programação de temperatura foi de 40ºC (0,0 min) a 140ºC (10ºC min^{-1}); 140ºC (0,0 min) a 300 ºC (5 ºC min^{-1}, 10 min). As amostras (0,6μl) foram injetadas por um auto-injetor, utilizando a técnica de injeção *splitless* (1:20). A integração foi feita através do software específico do equipamento. Os compostos detectados nas amostras foram identificados por comparação com os dados dos espectros de massas NIST107, NIST21 e WILEY139 componentes da estação de trabalho CLASS-5000

versão 2.2. Usou-se também, a ferramenta de extração de íons seletivos, para verificação da presença ou ausência das diversas classes de compostos esperados, no processo de identificação dos componentes das amostras.

3.2.16 Microscopia Óptica (MO)

Essa análise foi realizada nas dependências dos laboratórios do Núcleo de apoio à pesquisa em microscopia eletrônica aplicada a pesquisa agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ-USP, Piracicaba-SP. A identificação dos pólens foi feita com base nos laminários de referência já existente nos laboratórios de apicultura do departamento de Entomologia da ESALQ/USP (Piracicaba) e do Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, sob a supervisão da Dra. Cynthia Fernandes Pinto da Luz. Por meio de declarações, os apicultores informavam as espécies que circundavam a região de seus apiários, contribuindo desta forma para a identificação dos tipos polínicos.

Foram pesados 2g de pólen seco de cada amostra e contadas as bolotas de pólen (aproximadamente 350 bolotas de pólen apícola). 25 bolotas foram selecionadas proporcionalmente às diferentes cores e colocadas em tubo de centrífuga com 10 mL de álcool etílico a 70% v/v. Após a maceração e homogeneização, a mistura foi dividida em dois tubos de centrífuga de 15 mL. Essa mistura foi centrifugada com 3500 rpm (rotações por minuto) durante 15 min. Após esse tempo de centrifugação o sobrenadante foi descartado de uma só vez. Ao

sedimento foi adicionado mais 10 mL de álcool etílico a 70% v/v a cada tubo e centrifugado novamente a 3500 rpm por mais 15 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 5 mL de água glicerinada (solução de 1:1 de água destilada e glicerol p.a.). Os tubos ficaram em repouso por 30 min e após a centrifugação por 15 min a 3500 rpm o sobrenadante foi descartado e o sedimento utilizado no preparo das lâminas segundo Barth (1989). As lâminas foram observadas em Microscópio-Esteroscópico marca Zeiss com aumentos de 100x, 200x, 400x e 1000x.

A análise quantitativa foi efetuada mediante contagem de 350 grãos de pólen por amostra e agrupados por espécies botânicas e/ou tipos polínicos. Essa contagem é caracterizada por agrupar os grãos de pólen em quatro classes de freqüência, ou seja: pólen predominante ou dominante em mais de 45% do total de grãos contados (PD); pólen secundário ou acessório em 16 a 45% (PA); pólen isolado importante (3-15%) (PII) e pólen isolado ocasional em menos de 3% (PIO) (LOUVEAUX et al., 1970).

3.2.17 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Essa análise foi realizada nas dependências dos laboratórios do Núcleo de apoio à pesquisa em microscopia eletrônica aplicada a pesquisa agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ-USP, Piracicaba-SP. A identificação do material polínico contou com a ajuda da Dra. Cynthia

Fernandes Pinto da Luz do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SP.

A avaliação botânica dos *pellets* de pólen apícola foi realizada segundo BARTH (1989). Uma amostra de aproximadamente 2g de cada espécie, correspondendo aproximadamente a 350 grãos de pólen e foi considerada representativa para análise do pólen. Os pellets foram agrupados em subamostras de acordo com sua coloração e cada subamostra foi pesada. Após a separação dos grãos de pólen em função da sua coloração, cada subamostra foi metalizada em ouro e analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em Digital Scanning Microscope DSM 940 A (Zeiss Co.). Os termos usados para expressar a freqüência das classes segundo LOUVEAUX et al. (1970) foram:

"Pólen predominante ou dominante" (> 45% do total) (PD);
"Pólen acessório ou secundário"(16-45%) (PA);
"Pólen isolado importante" (3-15%)(PII);
"Pólen isolado ocasional"(<3%) (PIO).

3.2.18 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. A análise de variança (ANOVA) dos dados foi feita pelo software SAS Software V9. O teste *t* student foi usado para comparar a atividade antioxidante com os padrões comerciais (BHT, BHA e α-tocoferol). A separação entre as médias dos tratamentos foi realizada usando o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%. A correlação entre atividade antioxidante e compostos fenólicos e flavonóides foi realizada com o Statgraphics Plus versão 5.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 30 ilustra a aparência das amostras de pólen apícola dos três estados do Sul do Brasil utilizadas no estudo. Todas as amostras analisadas demonstraram ser poliflorais, principalmente devido a grande diversidade de cores dos seus grãos.

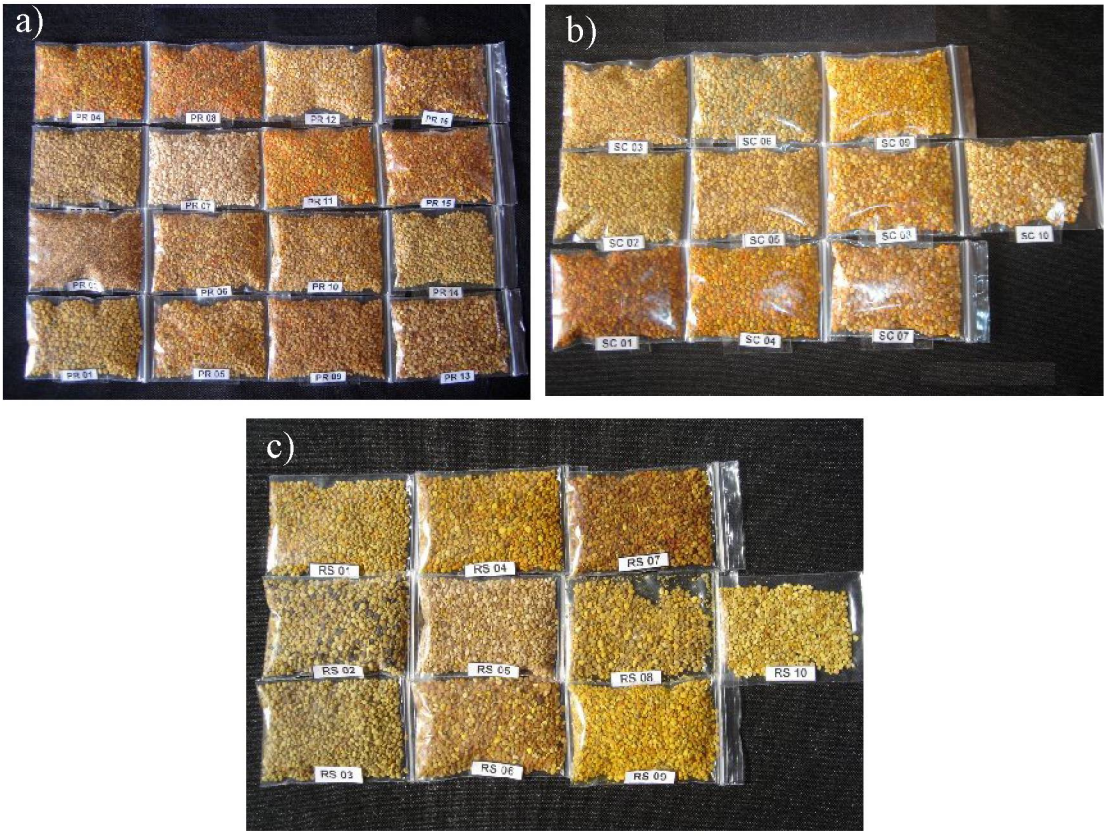


FIGURA 30 - APARÊNCIA DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA a) ESTADO DO PARANÁ, b) ESTADO DE SANTA CATARINA, c) ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PÓLEN APÍCOLA

As amostras de pólen apícola da Região Sul do Brasil demonstraram uma composição nutricional homogênea, com exceção do teor de umidade que apresentou um coeficiente de variação acima de 40% (Tabela 8).

O teor de umidade variou de 1,69% a 7,84%;sendo que 47 % das amostras encontraram-se fora da Legislação Brasileira, a qual permite a comercialização de pólen com um teor máximo de umidade de 4% (BRASIL, 2001). Entre os três estados analisados, o do Rio Grande do Sul foi o que apresentou o maior número de amostras com teor de umidade fora da Legislação, correspondendo a 60%, seguido pelo Estado do Paraná com 50% das amostras.

A atividade de água média das amostras foi de 0,38 ± 0,04, o que é característico de um alimento desidratado e com boa estabilidade de armazenagem (Tabela 8). O teor de umidade elevado pode favorecer a contaminação microbiológica, principalmente por fungos e leveduras. O pólen é altamente higroscópico, sendo, portanto afetado pelas condições ambientais.

O conteúdo total de proteínas variou de 15,04 a 27,69%, sendo que os teores de proteínas das amostras do Estado de Santa Catarina foram estatisticamente diferentes as dos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná (Tabela 8).

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA

Amostras	aW*	Umidade (%)	Proteína % (N x 6,25)	Fibras (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	AT** (g/100)	AR*** (g/100g)
PR 01	0,32 [a]	6,62 [a]	18,89 [b]	3,51 [a]	4,21 [a]	2,10 [a]	54,56 [a]	48,74 [a]
PR 02	0,33 [a]	6,65 [a]	18,61 [b]	3,11 [a]	4,12 [a]	1,90 [a]	58,84 [a]	56,65 [a]
PR 03	0,36 [a]	5,26 [a]	18,89 [b]	3,64 [a]	5,12 [a]	3,20 [a]	55,33 [a]	52,81 [a]
PR 04	0,45 [a]	7,84 [a]	15,04 [b]	2,65 [a]	4,89 [a]	3,12 [a]	58,59 [a]	56,33 [a]
PR 05	0,46 [a]	6,35 [a]	15,45 [b]	2,54 [a]	4,72 [a]	3,20 [a]	60,30 [a]	55,90 [a]
PR 06	0,36 [a]	3,33 [a]	21,74 [b]	4,85 [a]	5,17 [a]	2,50 [a]	55,18 [a]	52,58 [a]
PR 07	0,33 [a]	1,92 [a]	22,43 [b]	3,23 [a]	5,69 [a]	2,89 [a]	51,27 [a]	45,12 [a]
PR 08	0,41 [a]	3,25 [a]	22,38 [b]	2,76 [a]	6,47 [a]	2,87 [a]	52,60 [a]	50,96 [a]
PR 09	0,42 [a]	3,15 [a]	21,55 [b]	2,98 [a]	5,43 [a]	3,91 [a]	50,82 [a]	49,55 [a]
PR 10	0,40 [a]	3,10 [a]	21,77 [b]	3,89 [a]	3,72 [a]	3,70 [a]	50,28 [a]	47,07 [a]
PR 11	0,38 [a]	3,00 [a]	21,93 [b]	3,92 [a]	4,25 [a]	3,76 [a]	50,10 [a]	47,59 [a]
PR 12	0,44 [a]	4,39 [a]	22,46 [b]	3,87 [a]	4,89 [a]	3,84 [a]	48,67 [a]	45,15 [a]
PR 13	0,39 [a]	4,56 [a]	21,80 [b]	2,77 [a]	5,72 [a]	2,93 [a]	52,19 [a]	48,71 [a]
PR 14	0,35 [a]	1,69 [a]	20,15 [b]	2,98 [a]	6,00 [a]	2,94 [a]	50,27 [a]	48,03 [a]
PR 15	0,35 [a]	3,42 [a]	20,86 [b]	3,51 [a]	5,25 [a]	2,98 [a]	50,05 [a]	47,97 [a]
PR 16	0,36 [a]	5,78 [a]	21,48 [b]	3,45 [a]	5,54 [a]	2,23 [a]	50,47 [a]	46,99 [a]
SC 01	0,45 [a]	2,14 [a]	22,90[a]	3,75 [a]	4,23 [a]	3,42 [a]	48,36[a]	44,19 [a]
SC 02	0,39 [a]	2,90 [a]	27,69[a]	2,23 [a]	4,12 [a]	3,31 [a]	42,76 [a]	40,38 [a]
SC 03	0,35 [a]	3,84 [a]	22,65 [a]	3,98 [a]	5,39 [a]	3,12 [a]	49,66 [a]	45,93 [a]
SC 04	0,34 [a]	3,44 [a]	20,87 [a]	3,51 [a]	5,21 [a]	2,97 [a]	55,05 [a]	50,41 [a]
SC 05	0,38 [a]	4,77 [a]	22,95 [a]	3,42 [a]	5,33 [a]	2,95 [a]	53,27 [a]	50,45 [a]
SC 06	0,37 [a]	4,22 [a]	24,95 [a]	2,89 [a]	4,87 [a]	2,45 [a]	52,79 [a]	50,44 [a]
SC 07	0,38 [a]	2,33 [a]	18,96 [a]	3,64 [a]	3,89 [a]	2,56 [a]	51,23 [a]	49,79 [a]
SC 08	0,38 [a]	2,94 [a]	21,51 [a]	2,85 [a]	4,51 [a]	2,46 [a]	49,43 [a]	47,56 [a]
SC 09	0,36 [a]	2,34 [a]	24,44 [a]	4,34 [a]	4,43 [a]	3,21 [a]	50,53 [a]	46,19 [a]
SC 10	0,36 [a]	5,55 [a]	19,08 [a]	4,62 [a]	3,95 [a]	3,12 [a]	51,32 [a]	48,98 [a]
RS 01	0,35 [a]	3,69 [a]	19,99 [b]	3,54 [a]	3,97 [a]	2,65 [a]	60,42 [a]	55,04 [a]
RS 02	0,37 [a]	1,85 [a]	18,98 [b]	3,52 [a]	4,56 [a]	1,98 [a]	49,41 [a]	45,45 [a]
RS 03	0,35 [a]	6,92 [a]	18,17 [b]	3,45 [a]	4,87 [a]	2,87 [a]	54,24 [a]	49,02 [a]
RS 04	0,37 [a]	7,28 [a]	16,37 [b]	3,24 [a]	4,23 [a]	3,05 [a]	57,66 [a]	53,02 [a]
RS 05	0,54 [a]	5,08 [a]	18,48 [b]	3,87 [a]	5,61 [a]	3,01 [a]	54,68 [a]	52,21 [a]
RS 06	0,39 [a]	6,71 [a]	17,07 [b]	3,13 [a]	4,97 [a]	2,97 [a]	55,05 [a]	48,39 [a]
RS 07	0,36 [a]	3,93 [a]	19,25 [b]	3,35 [a]	4,53 [a]	3,28 [a]	41,11 [a]	38,21 [a]
RS 08	0,38 [a]	5,88 [a]	19,36 [b]	3,22 [a]	4,89 [a]	2,76 [a]	46,46 [a]	41,49 [a]
RS 09	0,38 [a]	2,42 [a]	19,86 [b]	4,34 [a]	5,41 [a]	2,65 [a]	51,13 [a]	50,18 [a]
RS 10	0,40 [a]	4,79 [a]	18,02 [b]	3,54 [a]	4,96 [a]	2,93 [a]	51,43 [a]	48,75 [a]
$V_{máx,}$	*0,54*	*7,84*	*27,69*	*4,85*	*6,47*	*3,91*	*60,42*	*56,66*
$V_{mín,}$	*0,32*	*1,69*	*15,04*	*2,23*	*3,72*	*1,90*	*41,11*	*38,21*
Média±SD	*0,38±0,04*	*4,19±1,70*	*20,47±2,64*	*3,45±0,57*	*4,86±0,65*	*2,94±0,48*	*52,10±4,22*	*48,79±4,16*
CV(%)	*10,58*	*40,57*	*12,89*	*16,52*	*13,37*	*16,33*	*8,09*	*8,53*

*atividade de água (22ºC) **Açúcar Total (g/100g) ***Açúcar Redutor (g/100g); Médias seguidas de mesma letra (coluna) não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

Teores mais elevados de proteína, acima de 25,9%, também já foram encontrados em pólen apícola produzido no sudeste da Austrália (SOMERVILLE e NICOL, 2006) e no pólen de Minas Gerais (MODRO et al., 2007). A maior parte do nitrogênio presente no pólen está na fração protéica, sendo o segundo grupo de nutrientes mais abundantes, após os carboidratos (AZEREDO et al., 2003). Todas as amostras analisadas apresentaram teor de proteína acima de 8%, estando desta forma de acordo com o Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001). O alto teor de proteínas (20,47± 2,64), açúcares redutores (48,79± 4,16 %) e baixo teor de lipídeos encontrados (4,86± 0,65 %) fazem do pólen um excelente complemento alimentar (Tabela 8).

Esses resultados corroboram com os de Almeida-Muradian et al. (2005), que avaliaram amostras brasileiras de pólen e encontraram um teor de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, de 7,4%, 20%, 6% e 2,2 %, respectivamente. O alto teor de açúcares redutores do pólen pode ser justificado pela presença de mel ou néctar no fluído que cimenta os grãos de pólen (STANLEY e LINSKENS,1974). O teor de lipídeos das amostras (4,86± 0,65 g/100g) (Tabela 8) foi similar ao descrito por SOMERVILLE (2005), que encontrou no pólen do sudeste da Austrália uma variação, desde níveis não detectáveis de lipídeos para o pólen de *Eucalyptus macrorhyncha* até 11,2% para o pólen de *Hypochoeris radicata*.

Os minerais predominantes nas amostras foram o fósforo (6923,63 ± 872,53mg/kg de pólen), seguido pelo potássio (5116,76± 528,89mg/kg de pólen), cálcio (1031,98± 377,51mg/kg de pólen) e magnésio (754,64 ±184,17mg/kg de pólen). A análise estatística pelo teste de Tukey

demonstrou que não há diferença significativa entre os teores de Cálcio, Cobre, Ferro, Fósforo, Magnésio, Manganês e Sódio das amostras de pólen do sul do Brasil. Entretanto para o potássio, as amostras do estado do Paraná apresentaram os maiores teores e diferiram estatisticamente das amostras do estado do Rio Grande do Sul (Tabela 9). O teor médio de zinco foi de 50,63mg/kg de pólen e as amostras do estado do Rio Grande do Sul foram as que apresentaram os maiores teores.

Serra Bonvehí e Escolá Jordá (1997) encontraram uma grande variedade de minerais no pólen apícola da Espanha, sendo o potássio o predominante (59% do total), seguido pelo fósforo, cálcio, sódio e magnésio (39,9%). Os elementos ferro e zinco, encontrados no pólen perfazem 15% da dose diária recomendada (RDA), sendo que os teores de zinco foram maiores do que em outros produtos apícolas. Segundo Wesh e Marston (1983) a presença de zinco, cobre, ferro e uma alta taxa de potássio/sódio tornam o pólen apícola um alimento interessante para dietas com um balanço eletrolítico definido.

As amostras do estado do Rio Grande do Sul apresentaram a maior variabilidade entre os teores de cálcio (com mínimo de 291,60 mg/kg de pólen na amostra RS 03 e máximo de 2149,20mg/kg de pólen na amostra de RS 05), cobre (com mínimo de 4,50mg/kg de pólen na amostra RS 03 e máximo de 17,77mg/kg de pólen na amostra de RS 07) e ferro (com mínimo de 27,93mg/kg de pólen na amostra RS 05 e máximo de 203,27mg/kg de pólen RS 06) (Tabela 9).

A composição mineral do pólen não depende somente da origem floral do pólen, mas também das condições de crescimento da planta, como solo e origem geográfica. Segundo Stanley e Linskens (1974) há diferenças no conteúdo mineral do pólen coletado pelas abelhas e o pólen coletado diretamente da flor, e somente Cálcio e Magnésio tiveram valores similares em ambos os tipos de pólen.

TABELA 9 - CONTEÚDO MINERAL DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA

Amostras	Ca*	Cu	Fe	P	Mg	Mn	K	Na	Zn
PR 01	1035,33 [a]	15,50 [a]	139,53 [a]	7345,50 [a]	763,40 [a]	73,27 [a]	5727,43 [a]	206,47 [a]	53,07 [a,b]
PR 02	1036,27 [a]	15,57 [a]	145,10 [a]	7364,30 [a]	785,47 [a]	75,37 [a]	5419,67 [a]	212,90 [a]	54,53 [a,b]
PR 03	1515,73 [a]	11,43 [a]	76,77 [a]	7277,30 [a]	946,93 [a]	43,63 [a]	4820,40 [a]	459,37 [a]	46,17 [a,b]
PR 04	1195,78 [a]	14,17 [a]	120,47 [a]	7328,03 [a]	831,93 [a]	64,09 [a]	5322,50 [a]	292,91 [a]	51,26 [a,b]
PR 05	1249,26 [a]	13,72 [a]	114,11 [a]	7323,54 [a]	854,78 [a]	61,03 [a]	5187,52 [a]	321,73 [a]	50,65 [a,b]
PR 06	1320,26 [a]	13,11 [a]	103,78 [a]	7309,96 [a]	877,88 [a]	56,25 [a]	5110,14 [a]	358,00 [a]	49,36 [a,b]
PR 07	1195,78 [a]	14,17 [a]	120,47 [a]	7329,03 [a]	831,93 [a]	64,09 [a]	5322,50 [a]	292,91 [a]	51,26 [a,b]
PR 08	1123,57 [a]	10,37 [a]	57,47 [a]	6132,73 [a]	714,40 [a]	97,53 [a]	5645,67 [a]	73,47 [a]	61,20 [a,b]
PR 09	1213,20 [a]	12,55 [a]	93,91 [a]	6923,91 [a]	808,07 [a]	72,62 [a]	5359,44 [a]	241,46 [a]	53,94 [a,b]
PR 10	1177,52 [a]	12,36 [a]	90,61 [a]	6795,22 [a]	784,80 [a]	78,08 [a]	5442,53 [a]	202,61 [a]	55,47 [a,b]
PR 11	975,10 [a]	9,83 [a]	68,57 [a]	6404,57 [a]	738,33 [a]	83,30 [a]	5318,00 [a]	19,67 [a]	48,73 [a,b]
PR 12	860,27 [a]	9,17 [a]	38,63 [a]	5724,07 [a]	463,33 [a]	51,53 [a]	3722,50 [a]	161,80 [a]	42,97 [a,b]
PR 13	1764,60 [a]	11,53 [a]	58,20 [a]	7155,47 [a]	1095,87 [a]	63,73 [a]	6363,70 [a]	231,13 [a]	55,23 [a,b]
PR 14	1383,43 [a]	10,27 [a]	66,87 [a]	8865,33 [a]	924,30 [a]	129,43 [a]	5586,77 [a]	106,80 [a]	53,73 [a,b]
PR 15	628,13 [a]	8,23 [a]	34,57 [a]	6609,47 [a]	713,40 [a]	98,87 [a]	5516,80 [a]	42,67 [a]	42,73 [a,b]
PR 16	1190,62 [a]	10,81 [a]	57,63 [a]	7748,16 [a]	953,57 [a]	63,46 [a]	6274,05 [a]	221,66 [a]	53,95 [a,b]
SC 01	938,33 [a]	13,3 [a]	103,27 [a]	5872,40 [a]	536,03 [a]	50,17 [a]	4556,27 [a,b]	202,47 [a]	55,63 [b]
SC 02	1388,77 [a]	9,33 [a]	71,20 [a]	8769,4 [a]	1039,47 [a]	25,33 [a]	5136,00 [a,b]	636,37 [a]	42,40 [b]
SC 03	866,70 [a]	16,40 [a]	115,63 [a]	6958,80 [a]	558,23 [a]	59,37 [a]	5270,07 [a,b]	227,73 [a]	60,57 [b]
SC 04	808,77 [a]	10,67 [a]	35,37 [a]	7691,83 [a]	799,03 [a]	110,70 [a]	5348,83 [a,b]	229,73 [a]	45,70 [b]
SC 05	792,87 [a]	9,93 [a]	48,83 [a]	6079,77 [a]	544,63 [a]	82,97 [a]	4976,10 [a,b]	55,37 [a]	36,10 [b]
SC 06	816,00 [a]	11,33 [a]	35,03 [a]	7433,80 [a]	818,57 [a]	110,93 [a]	5347,03 [a,b]	239,60 [a]	46,73 [b]
SC 07	750,80 [a]	9,10 [a]	49,73 [a]	5913,53 [a]	534,67 [a]	59,27 [a]	4762,83 [a,b]	46,97 [a]	38,00 [b]
SC 08	1518,63 [a]	10,30 [a]	48,47 [a]	5921,33 [a]	530,30 [a]	58,87 [a]	4792,03 [a,b]	54,87 [a]	38,90 [b]
SC 09	868,10 [a]	13,70 [a]	51,30 [a]	8224,47 [a]	881,30 [a]	69,37 [a]	5073,30 [a,b]	168,30 [a]	49,63 [b]
SC 10	870,31 [a]	8,83 [a]	35,96 [a]	5868,63 [a]	547,91 [a]	59,85 [a]	4715,27 [a,b]	48,75 [a]	37,05 [b]
RS 01	843,17 [a]	11,97 [a]	54,40 [a]	6134,67 [a]	575,93 [a]	43,53 [a]	5074,93 [b]	202,17 [a]	48,27 [a]
RS 02	1086,73 [a]	14,93 [a]	107,57 [a]	8456,57 [a]	908,93 [a]	48,90 [a]	5452,50 [b]	379,93 [a]	66,90 [a]
RS 03	291,60 [a]	4,50 [a]	69,00 [a]	6073,20 [a]	612,80 [a]	26,50 [a]	4435,60 [b]	12,90 [a]	51,50 [a]
RS 04	301,83 [a]	4,83 [a]	71,57 [a]	6128,70 [a]	622,97 [a]	28,87 [a]	4462,80 [b]	13,17 [a]	51,63 [a]
RS 05	2149,20 [a]	11,97 [a]	27,93 [a]	7455,43 [a]	1235,13 [a]	83,40 [a]	5133,07 [b]	323,50 [a]	55,80 [a]
RS 06	540,43 [a]	9,97 [a]	203,27 [a]	6119,93 [a]	809,27 [a]	24,90 [a]	4389,77 [b]	262,03 [a]	82,13 [a]
RS 07	964,20 [a]	17,77 [a]	101,27 [a]	7006,27 [a]	695,47 [a]	57,47 [a]	4898,27 [b]	272,07 [a]	60,80 [a]
RS 08	732,03 [a]	7,03 [a]	136,93 [a]	6932,83 [a]	532,53 [a]	51,20 [a]	4782,73 [b]	193,57 [a]	40,80 [a]
RS 09	726,03 [a]	10,80 [a]	36,50 [a]	5647,97 [a]	540,00 [a]	18,67 [a]	4329,63 [b]	72,13 [a]	39,13 [a]
$V_{máx,}$	*2149,20*	*17,77*	*203,27*	*8865,33*	*1235,13*	*129,43*	*6363,70*	*636,37*	*82,13*
$V_{mín,}$	*291,60*	*4,50*	*27,93*	*5647,97*	*463,33*	*18,67*	*3722,50*	*12,90*	*36,10*
Média±SD	*1031,98±377,51*	*11,4±2,97*	*79,71±40,33*	*6923,63±872,63*	*754,62±184,17*	*64,19±25,51*	*5116,76±528,89*	*202,49±136,86*	*50,63±9,24*
C.V (%)	*36,58*	*26,03*	*50,59*	*12,60*	*24,40*	*39,74*	*10,34*	*67,65*	*18,25*

* mg/kg de pólen apícola

Médias seguidas de mesma letra (coluna) não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05)

4.2 EXTRATOS ETANÓLICOS DE PÓLEN (EPE)

A melhor condição de extração usada nos experimentos foi determinada em estudo preliminar, descrito por Carpes et al. (2007). Neste estudo, diferentes concentrações de etanol (40 a 90% v/v) foram usadas para extrair os compostos fenólicos, flavonóides e determinar a atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos etanólicos de pólen. As diferentes condições de extração apresentaram diferentes efeitos no conteúdo dos compostos fenólicos extraídos, entretanto, os extratos de pólen obtidos com etanol a 70 e 80% (v/v) apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos (>10 mg/g) e atividade antioxidante acima de 80%, sendo que não houve diferenças estatísticas entre essas duas condições de extração.

Desta forma, as demais amostras analisadas foram extraídas com álcool 70% (v/v), durante 30 minutos em banho termostatizado a 70^0C. Os extratos de pólen apícola da região Sul do Brasil apresentaram uma coloração bastante homogênea, não havendo muita diferença entre as 36 amostras analisadas, que variaram de amarelo claro a amarelo mais escuro (Figuras 31, 32 e 33).

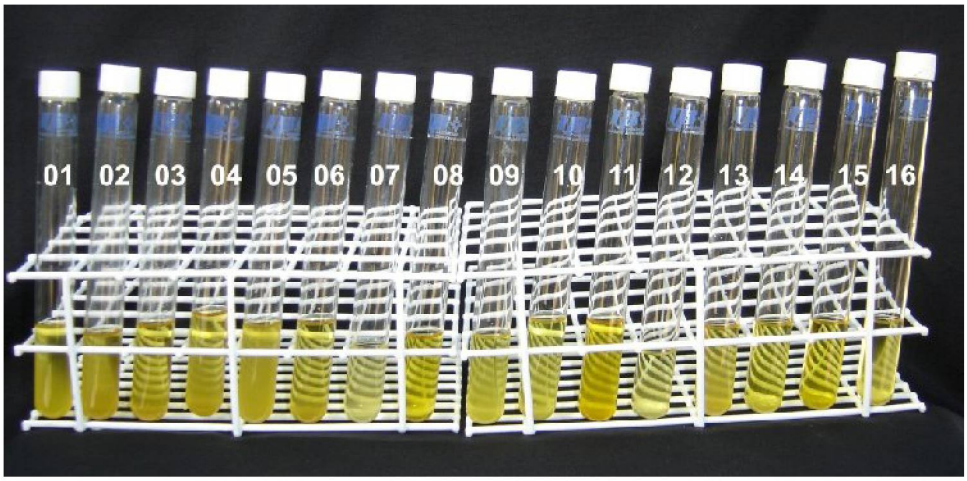


FIGURA 31 - APARÊNCIA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO PARANÁ

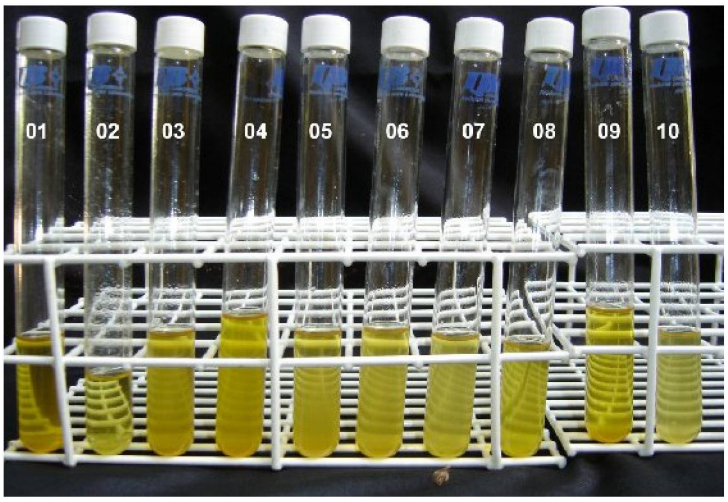


FIGURA 32 - APARÊNCIA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DE SANTA CATARINA

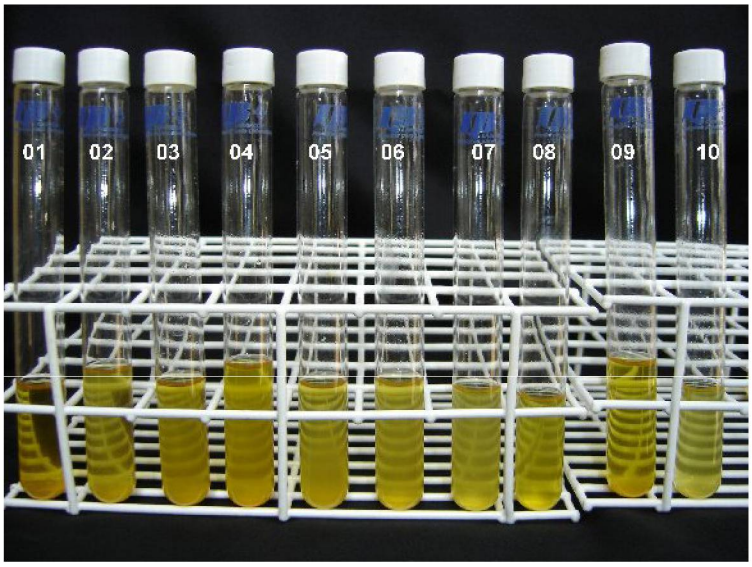


FIGURA 33 - APARÊNCIA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

4.2.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível dos EPE

Os compostos fenólicos e flavonóides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e visível; dessa maneira apresentam um papel de defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar. Além disso, eles podem representar uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus) e insetos. Mas, os flavonóides atuam também em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, atraindo e orientando esses animais até o néctar, contribuindo significativamente com a polinização (MARCUCCI,1998).

Os 36 extratos de pólen apícola da Região Sul do Brasil foram submetidos a uma varredura espectral na região UV-visível (200 a 500 nm), conforme apresentados nas Figuras 34, 35 e 36. De acordo com as análises espectrofotométricas não foram observadas grande variações no

perfil de varredura entre as amostras do Estado do Paraná (Figura 34). Pode-se observar que a absorbância máxima variou de 294,5 a 319,5 nm, sendo que os extratos PR 04, PR 05, PR 13, PR15 e PR16 apresentaram dois picos de absorção. A grande maioria das amostras apresentaram pico de absorção acima de 306 nm e apenas 3 amostras (PR 02, PR 05 e PR 15) apresentaram um pico de absorção em 294 nm (Figura 34).

Os compostos fenólicos, de modo geral, apresentam o pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm e as classes de flavonóides que normalmente absorvem nos comprimentos de onda entre 281 a 284 nm, são os isoflavonóides, flavanonas e diidroflavonas (MARKHAM et al., 1996).

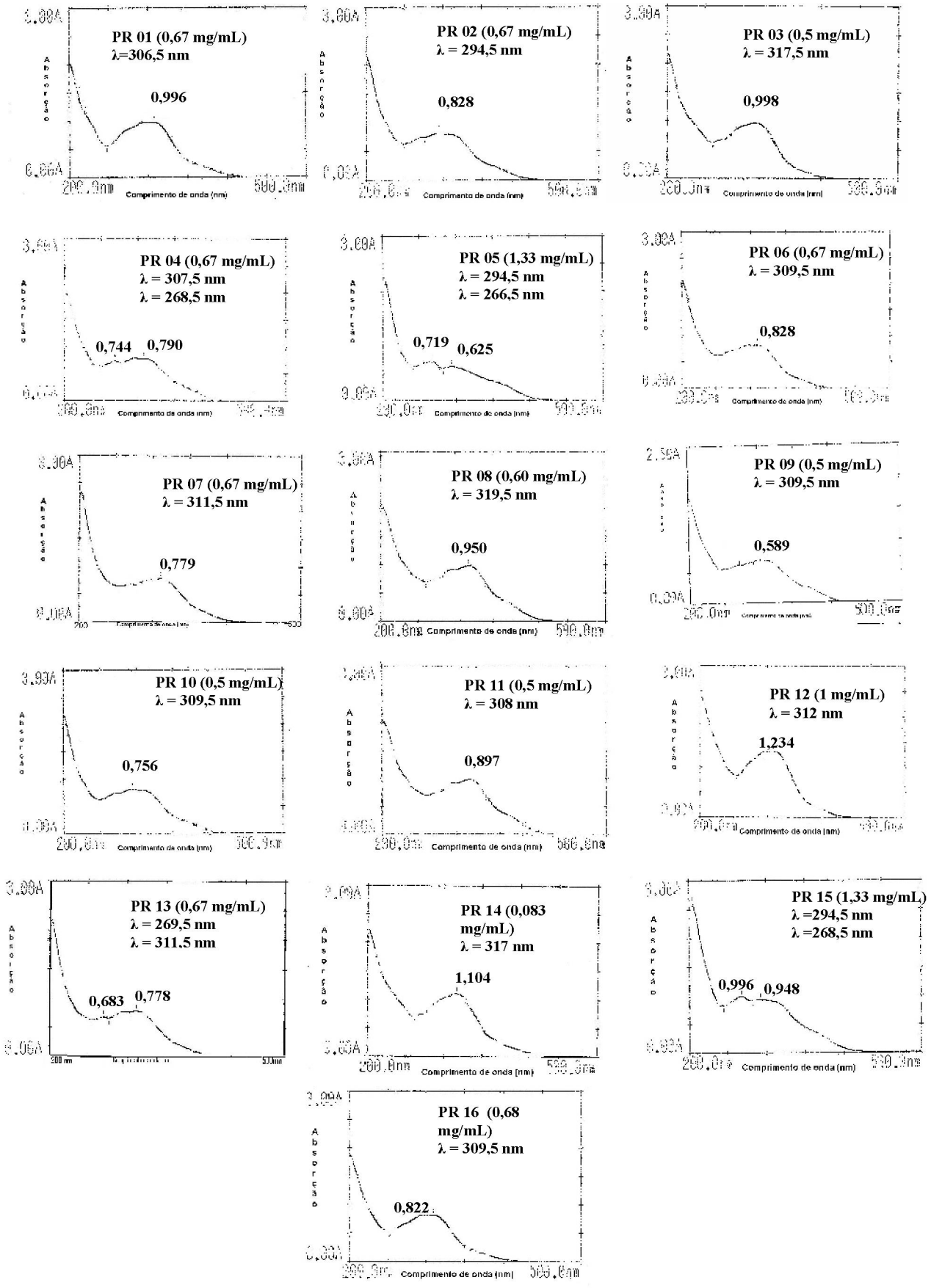


FIGURA 34 - ANÁLISE DE VARREDURA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO PARANÁ

Entre as amostras do estado de Santa Catarina, com exceção das amostras SC02, SC 03 e SC 05 que apresentaram pico de absorção máximo em 316 nm, todas apresentaram um pico de absorção entre 292 a 296 nm (Figura 35). Os espectros de varredura das amostras do estado do Rio Grande do Sul apresentaram praticamente o mesmo perfil das amostras de Santa Catarina, ou seja, os extratos etanólicos de pólen (EPE) RS 04, RS 05, RS 06, RS09 e RS10 apresentaram um pico de absorção em 294 nm e as demais em torno de 316 nm (Figura 36).

A faixa de comprimento de onda de absorção máxima da maioria das amostras ($\lambda_{máx}$= 310 a 317,5 nm) pode ser relacionada com a banda de absorção de flavonóides (HARBORNE, 1964; FONTANA et al., 2004; ADELMANN, 2005).

Analisando as amostras dos extratos de pólen entre os três estados foi possível perceber a predominância de 3 grandes tipos de pólen (Figuras 34, 35 e 36). Além disso, em testes preliminares também foi possível verificar que os extratos de pólen apícola de cada estado possuíam o mesmo perfil cromatográfico por CLAE-DAD, não havendo a necessidade de análise por CLAE-DAD e CG-EM das 36 amostras. Desta forma, cada Estado da Região Sul foi representado por uma amostra de pólen apícola, levando em consideração também o teor de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante. Sendo assim, para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) foram eleitas as amostras PR 03, SC 03 e RS 09.

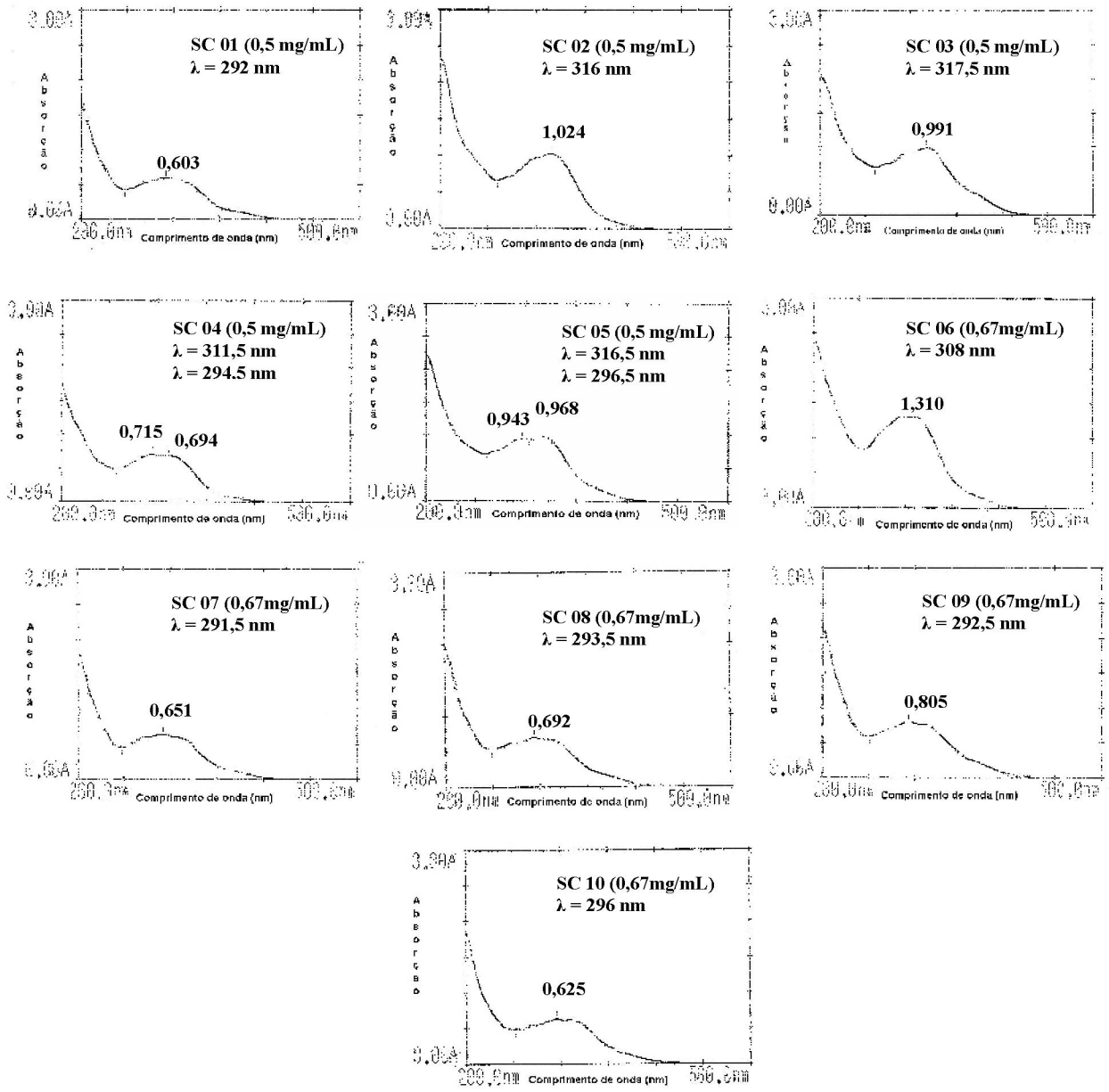


FIGURA 35 - ANÁLISE DE VARREDURA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DE SANTA CATARINA.

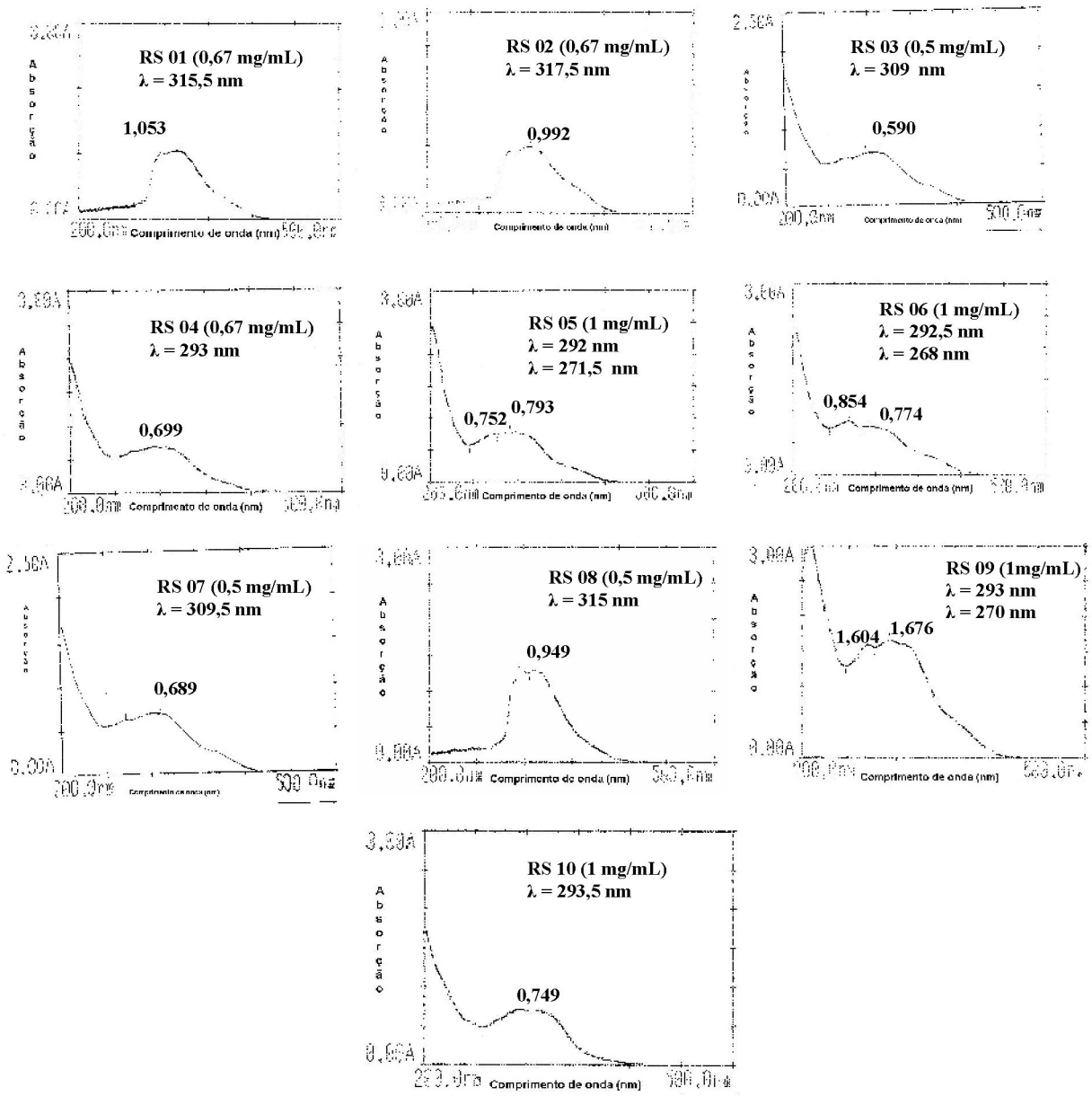


FIGURA 36 - ANÁLISE DE VARREDURA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) dos EPE

A técnica de cromatografia em camada delgada foi importante, pois permitiu uma visualização qualitativa rápida e distinta da composição química entre amostras.

Com base neste método foi possível verificar diferenças entre os vários EPE. Quando as cromatoplacas de CCDAE foram reveladas sob luz UV a 366 nm (Figuras 37, 38 e 39), observaram-se bandas fluorescentes nas cores azuis com intensidades variadas, que também são características de flavonóides.

Segundo Wagner et al. (1984) neste tipo de cromatoplacas a presença de bandas com tonalidades que variam de azul claro a azul escuro são características de compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonóides, que variam de acordo com o tipo estrutural da molécula. A CCDAE também confirmou os resultados de espectrofotometria na região UV-visível e CLAE, de que o pólen coletado nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, podem ser representados pelas amostras PR 03, SC 03 e RS 09, respectivamente.

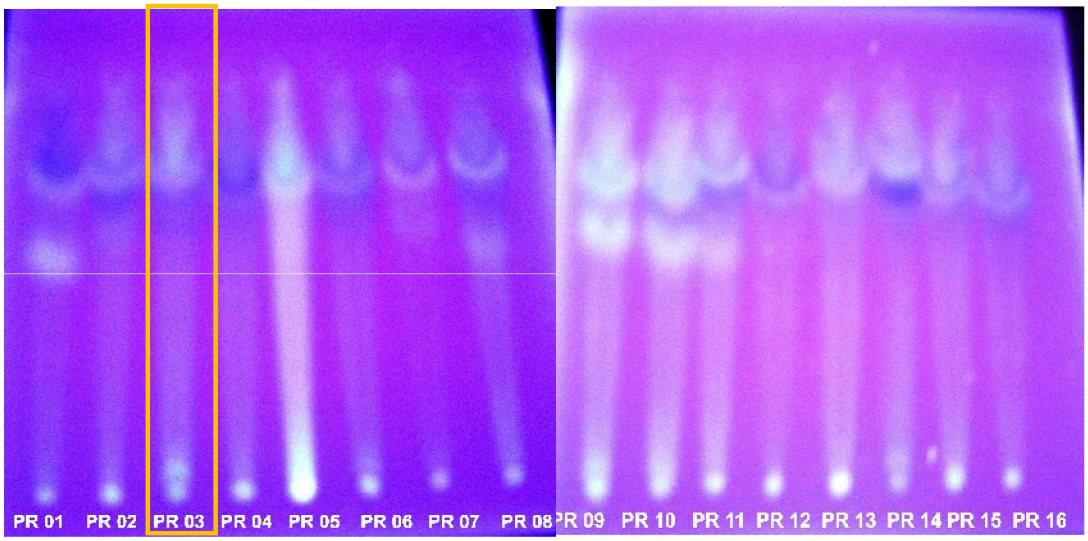


FIGURA 37: CROMATOPLACAS DE CCDAE-FR VISUALIZADAS SOB LUZ ULTRAVIOLETA A 366 nm DOS EPE DO ESTADO DO PARANÁ.

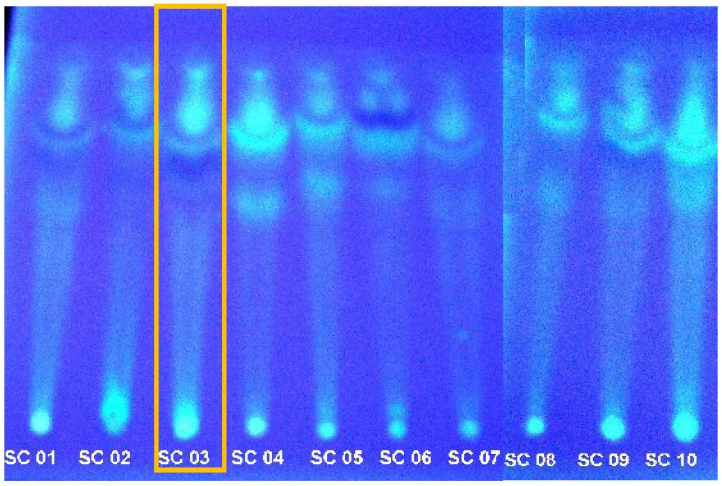


FIGURA 38 - CROMATOPLACAS DE CCDAE-FR VISUALIZADAS SOB LUZ ULTRAVIOLETA A 366 nm DOS EPE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

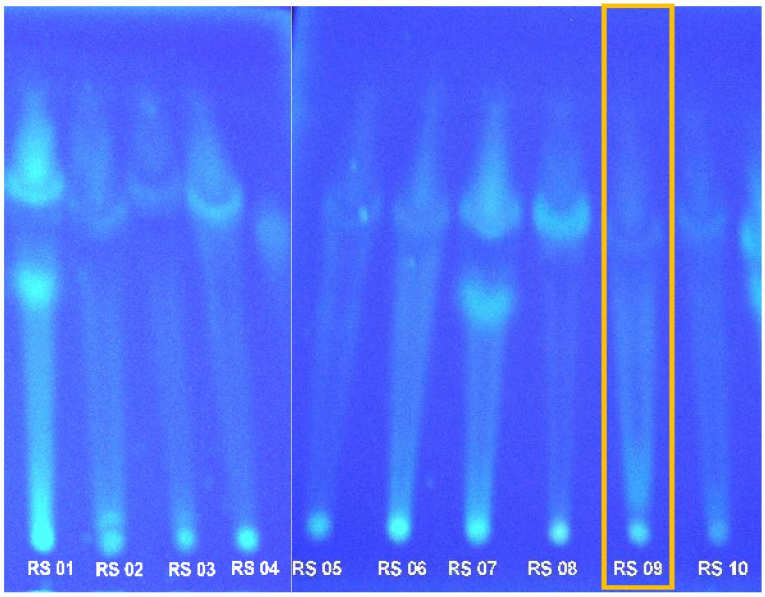


FIGURA 39 - CROMATOPLACAS DE CCDAE-FR VISUALIZADAS SOB LUZ ULTRAVIOETA A 366 nm DOS EPE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

4.2.3 Compostos fenólicos e flavonóides totais dos EPE

As amostras de pólen da Região Sul do Brasil apresentaram uma concentração heterogênea de compostos fenólicos. Os teores dos compostos fenólicos totais variaram de 19,28mg a 48,90mg GAE/g de pólen), com um valor médio de 30,77± 8,22mg, usando uma curva padrão de ácido gálico (R^2=0,9987) (Tabela 10 e Figura 40). Entre as amostras analisadas, as amostras SC 03 (São Joaquim, SC), PR 03 (Palmeiras, PR) e RS 07 (Arvorezinha, RS) apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais (48,90, 46,09 e 43,24mg GAE/g de pólen, respectivamente) (Tabela 10 e Figura 40). Kroyer e Hegedus (2001) encontraram 8,2mg/g de compostos fenólicos no pólen apícola *in natura*,

o qual foi aumentado para 24,6 mg/g quando as análises foram feitas a partir do extrato etanólico.

TABELA 10 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL EC $_{50}$ DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA.

Amostras	Fenólicos Totais (mg GAE*/g ± SD**)	Flavonóides Totais (mg quercetina/g ± SD)	EC $_{50}$ (µg/mL ± SD)
PR 01	30,92± 1,27	*10,96*± 0,32	1760± 90 [a,b]
PR 02	36,47± 2,36	*9,96*± 0,90	1390± 30 [a,b]
PR 03	46,09± 2,03	*8,50* ± 0,51	1020± 10 [a,b]
PR 04	39,74± 1,29	11,24± 1,05	1300± 70 [a,b]
PR 05	25,26± 2,61	3,99± 0,45	4690± 290 [a,b]
PR 06	35,79± 3,24	8,30± 0,36	1410± 30 [a,b]
PR 07	20,14± 0,11	3,31± 0,26	3700± 210 [a,b]
PR 08	25,78± 1,62	5,15± 0,41	2210± 60 [a,b]
PR 09	31,90± 2,31	7,68 ± 0,14	1180± 30 [a,b]
PR 10	38,03± 2,19	8,94± 0,593	1390± 50 [a,b]
PR 11	21,57± 1,39	4,52± 0,53	2640± 60 [a,b]
PR 12	25,22± 0,31	3,43± 0,63	4030± 40 [a,b]
PR 13	23,05± 0,64	6,23± 0,42	2090±100 [a,b]
PR 14	30,55± 2,92	7,16± 0,54	1110±80 [a,b]
PR 15	28,90± 0,97	7,01± 0,26	2200± 100 [a,b]
PR 16	28,02± 0,99	6,99± 0,19	1360±80 [a,b]
SC 01	26,20± 1,23	6,99± 0,31	950± 120 [b]
SC 02	41,27± 2,62	11,89± 0,86	830±90 [b]
SC 03	48,90± 0,79	28,33± 0,38	810± 60 [b]
SC 04	38,63± 0,96	5,88± 0,34	850± 60 [b]
SC 05	40,25± 4,76	10,51± 0,21	960± 30 [b]
SC 06	24,73± 2,27	8,66± 0,62	930± 50 [b]
SC 07	41,77± 1,28	5,21± 0,18	2250± 25 [b]
SC 08	26,23± 0,45	9,51± 0,25	1390± 10 [b]
SC 09	27,99± 1,07	12,05± 0,51	1250± 40 [b]
SC 10	22,16± 1,19	6,38± 0,56	1580± 70 [b]
RS 01	33,07± 1,11	18,79± 0,65	1240±20 [a]
RS 02	35,25± 1,81	23,19± 0,78	1180±30 [a]
RS 03	19,66± 0,28	2,10± 0,04	2850± 100 [a]
RS 04	20,31± 0,47	7,27± 0,07	2710± 60 [a]
RS 05	19,28± 3,00	2,42± 0,26	3600± 30 [a]
RS 06	24,46± 1,12	5,88± 0,16	4120± 90 [a]
RS 07	43,24± 0,69	17,40± 0,27	1760± 40 [a]
RS 08	30,84± 1,15	7,51± 0,47	1910± 20 [a]
RS 09	30,39± 0,43	11,67± 1,41	2060± 30 [a]
RS 10	25,13± 0,28	5,94± 0,54	2060± 120 [a]
$V_{mín,}$	*19,28*	*2,10*	810
$V_{máx,}$	*48,90*	*28,33*	4690
Média±SD	*30,77± 8,22*	*8,83± 5,61*	1920± 103
CV (%)	*26,98*	*62,21*	53,33

*GAE:Equivalente em ácido gálico **SD: Desvio padrão

Médias seguidas pela mesma letra não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ($p< 0,05$).

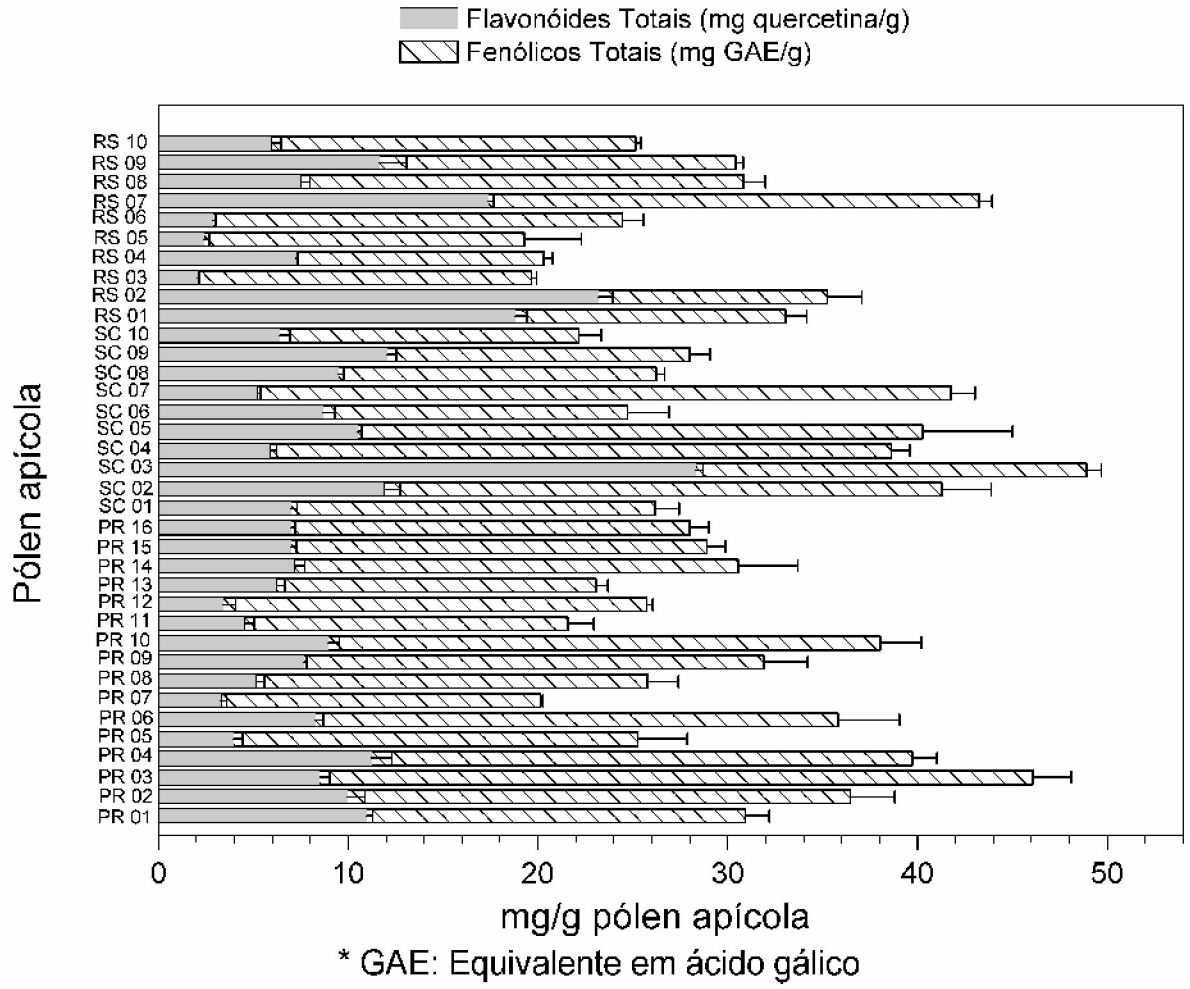


FIGURA 40 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DO PÓLEN APÍCOLA.

Os teores de flavonóides totais expressos em equivalentes de quercetina variaram de 2,10 mg a 28,33 mg de mg/g de pólen usando uma curva padrão de quercetina (R^2=0,9924) (Tabela 10 e Figura 40). A amostra SC 03 que apresentou o maior teor de compostos fenólicos também apresentou o maior teor de flavonóides (28,33mg de quercetina/g de pólen). Esta amostra foi coletada em São Joaquim (SC), região mais fria do país e, segundo os apicultores, sua provável origem floral é uma mistura de vassouras, carquejas e guamirins. De acordo com

Collin et al. (1995), o teor de compostos voláteis (óleos essenciais, compostos fenólicos, flavonóides) no pólen apícola é maior em regiões de temperatura mais baixas.

A amostra do Paraná (PR 03) comportou-se de forma diferente, pois mesmo possuindo teores elevados de compostos fenólicos (46,09 mg de GAE/g de pólen) apresentou baixo teor de flavonóides, apenas 8,50mg de quercetina/g de pólen. Isso sugere que provavelmente outros compostos não-flavonóides, como ácidos fenólicos ou hidrocinâmicos, estão compondo esta amostra (Tabela 10 e Figura 40).

As amostras RS 03 e RS 05 apresentaram teores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais muito semelhantes, com 19mg de GAE/g de pólen e 2mg de quercetina/g de pólen, respectivamente (Tabela 10 e Figura 40).

Leja et al. (2007) estudaram os constituintes fenólicos (fenólicos totais, fenilpropanóides, flavonóis e antocianinas) e a capacidade antioxidante do pólen apícola de 12 espécies diferentes da região da Krakow (Polônia). Nesse estudo foi encontrada uma grande variedade de compostos fenólicos nas espécies analisadas e, na maioria das amostras, a atividade antioxidante estava relacionada com o teor de fenilpropanóides. Também foi verificado que a contribuição dos flavonóides no teor de compostos fenólicos totais diferia consideravelmente em função da origem botânica, de 4,78% (*Lumium purpureum*) para 37,3% (*Chamerion angustifolium*). Serra Bonvehí et al. (2001) determinaram compostos fenólicos totais e flavonóides totais em

11 amostras de pólen apícola da Espanha, sendo que quinze compostos foram separados por CLAE, dentre os quais 13 foram identificados e quantificados. Os compostos predominantes foram os flavonóides quercetina e miricetina e o ácido *trans* cinâmico.

4.2.4 Atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade que cada fenol exerce sobre determinado meio, sendo que a estrutura química dos flavonóides favorece a ação antioxidante. A alta capacidade dos constituintes fenólicos de neutralizarem as espécies reativas ao oxigênio está fortemente associada a sua estrutura, tais como duplas ligações conjugadas e número de hidroxilas no anel aromático de flavonóides e derivados do ácido cinâmico (CAMPOS et al., 1997).

4.2.4.1 Cinética de reação do DPPH: determinação do tempo de estabilização de reação

O radical DPPH tem sido muito usado para se avaliar a capacidade seqüestrante de radicais livres em produtos apícolas, tais como pólen (CAMPOS et al., 2003; SILVA et al., 2006; LEJA et al., 2007), própolis (LU et al., 2003; KUMAZAWA et al., 2004) e mel (MEDA et al., 2005). A atividade antioxidante do radical livre estável DPPH• se baseia na

transferência de elétrons de um composto antioxidante para essa espécie radicalar, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura.

A evolução da reação cinética depende da natureza do antioxidante a ser testado. Podem ocorrer três tipos de comportamentos cinéticos entre as amostras: cinética rápida, quando reagem rapidamente com o DPPH•, atingindo o final da reação em menos de um minuto; cinética intermediária, quando o final da reação é atingido em até trinta minutos, e cinética lenta quando a reação demora mais de uma hora para terminar (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Desta forma, fez-se necessária a determinação da cinética dos EPE, pois há substâncias antioxidantes que reagem de forma diferenciada como, por exemplo, a vitamina C que possui uma cinética rápida e os antioxidantes artificiais como BHT e BHA que possuem cinéticas de reação mais lenta. Além disso, os extratos de pólen possuem uma variedade muito grande de compostos com potencial antioxidante e, desta forma, é imprescindível se avaliar o comportamento de cada amostra.

A redução do radical do DPPH foi medida por meio do monitoramento contínuo do declíneo da absorbância a 517 nm, com simultânea mudança de coloração, de violeta para amarela, característico do radical reduzido. Concentrações crescentes de extratos de pólen foram submetidas à reação e, absorbância lida a cada 20 minutos até valores estáveis de absorção.

As Figuras 41, 42 e 43 ilustram a cinética dos extratos de pólen apícola do estado do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul respectivamente, para determinação do tempo necessário de estabilização da reação com o DPPH. Não foram observadas variações no perfil cinético das reações de consumo do DPPH• entre as extrações etanólicas de pólen em concentração dos extratos acima de 0,25 mg/mL e o tempo necessário à estabilização da reação foi de 100 minutos. Desta forma, as análises de atividade de seqüestro do radical livre DPPH foram determinadas após 100 minutos de reação.

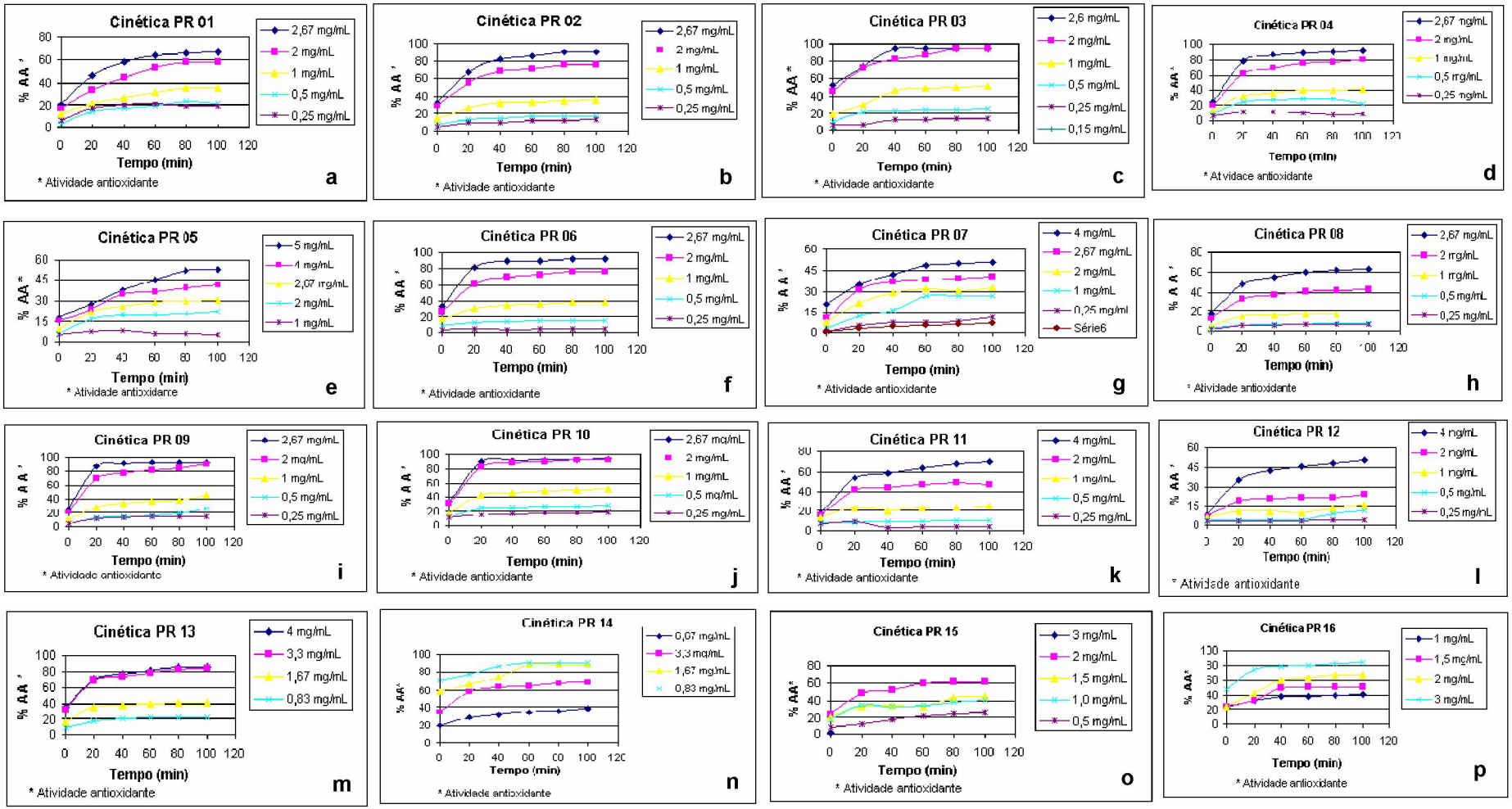


FIGURA 41 - CINÉTICA DE REDUÇÃO DO DPPH (PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE) DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DO ESTADO DO PARANÁ EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO; AMOSTRAS **a)** PR 01; **b)** PR 02; **c)** PR 03; **d)** PR 04; **e)** PR 05; **f)** PR 06; **g)** PR 07; **h)** PR 08; **i)** PR 09; **j)** PR 10; **k)** PR 11; **l)** PR 12; **m)** PR 13; **n)** PR 14; **o)** PR 15; **p)** PR 16.

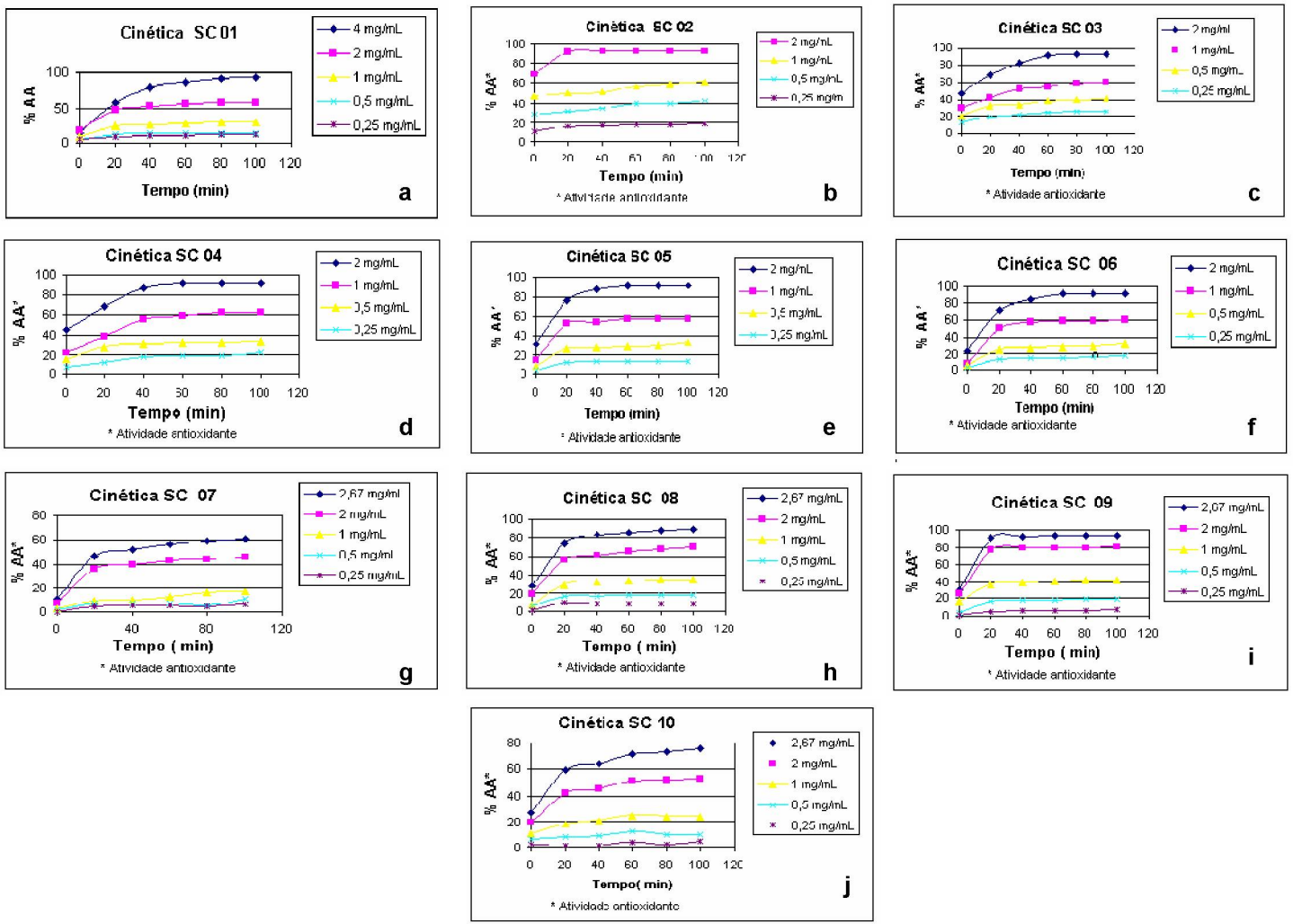


FIGURA 42 - CINÉTICA DE REDUÇÃO DO DPPH (PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE) DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DO ESTADO DE SANTA CATARINA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO; AMOSTRAS **a)** SC 01; **b)** SC 02; **c)** SC 03; **d)** SC 04; **e)** SC 05; **f)** 06; **g)** SC 07; **h)** SC 08; **i)** SC 09; **j)** SC 10.

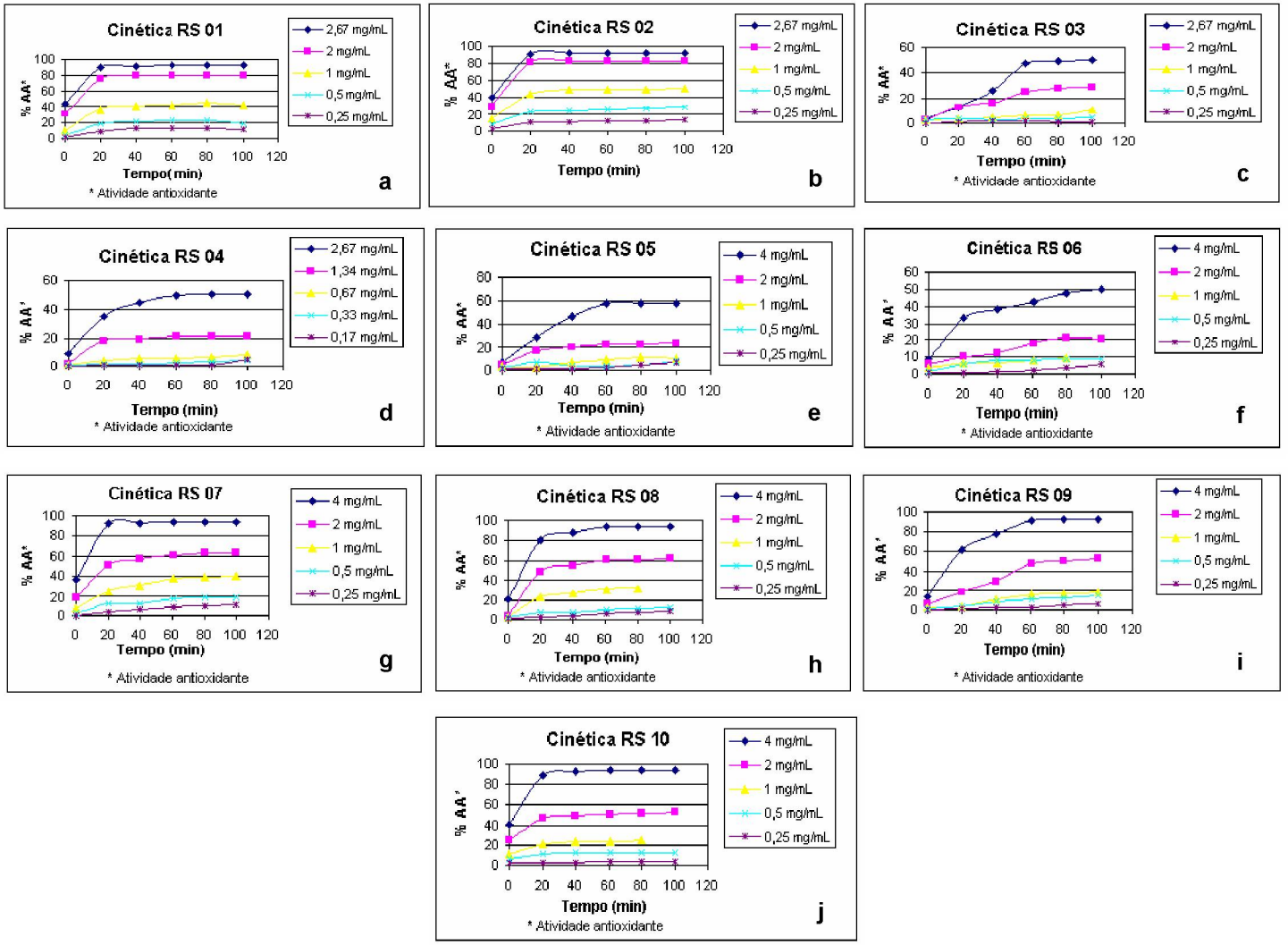


FIGURA 43 - CINÉTICA DE REDUÇÃO DO DPPH (PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE) DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO; AMOSTRAS **a)** RS 01; **b)** RS 02; **c)** RS 03; **d)** RS 04; **e)** RS 05; **f)** RS 06; **g)** RS 07; **h)** RS 08; **i)** RS 09; **j)** RS 10.

4.2.4.2 Atividade de Seqüestro do Radical Livre DPPH

Seguidamente a avaliação da cinética de reação, a atividade antioxidante foi expressa em termos de EC_{50}, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação no tempo em que o extrato atingiu a estabilidade. Quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante dos extratos de pólen apícola e, para simplificar, vários autores (KROYER e HEGEDUS, 2001; MEDA et al., 2005) têm expressado seus resultados em ARP (atividade redutora potencial), ou seja, o inverso da EC_{50}.

A Figura 44 apresenta um exemplo do cálculo da meia vida (EC_{50}), feita por meio de uma equação de regressão. Partindo-se do princípio de que a reação dos polifenóis com o radical DPPH• é de primeira ordem, foram plotados gráficos que expressam a atividade antioxidante pelo tempo utilizando a fórmula de Mensor et al. (2001).

$$\%AA = 100 - \{ [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle} \}$$

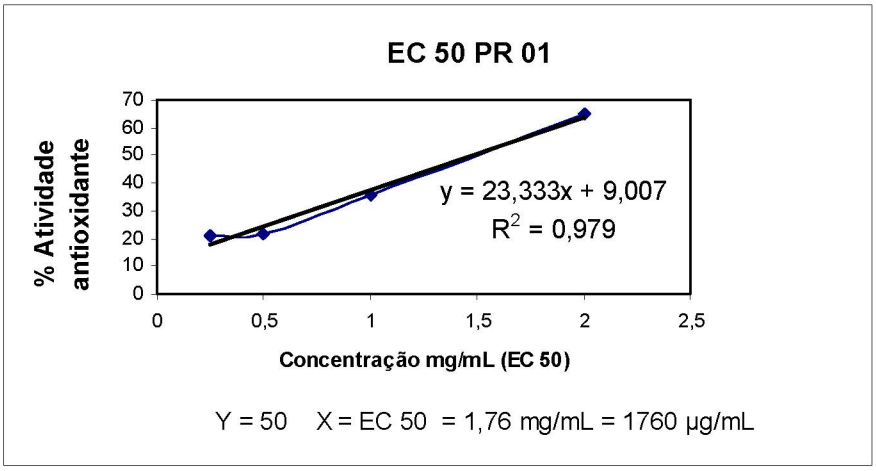


FIGURA 44: EXEMPLO DE GRÁFICO PARA O CÁLCULO DO EC_{50}.

Os valores de EC_{50} para os extratos de pólen variaram de 810±60 a 4690±290 µg/mL, com um valor médio de 1920±103 µg/mL (Figura 45 e Tabela 10). O pólen de Santa Catarina apresentou os menores valores de EC_{50} e, consequentemente, maior atividade antioxidante em termos de seqüestro do radical livre DPPH•. Segundo Campos et al. (2003), a atividade antioxidante do pólen é em grande parte função de compostos fenólicos e flavonóides presentes que possuem atividade de seqüestro de radicais livres, embora outros constituintes como proteínas e vitaminas também possam contribuir para essa propriedade. Esses autores encontraram valores de EC_{50} que variaram de 40 a 500 µg/mL em amostras de pólen coletadas em Portugal e Nova Zelândia.

Os resultados da atividade antioxidante das amostras do sul do Brasil foram superiores aos encontrados por Meda et al. (2005), que analisaram 27 amostras de diferentes origens geográficas da localidade de Burkina Faso (localizado na África) e encontraram um valor médio de EC_{50} de 10,60± 7,30mg/mL.

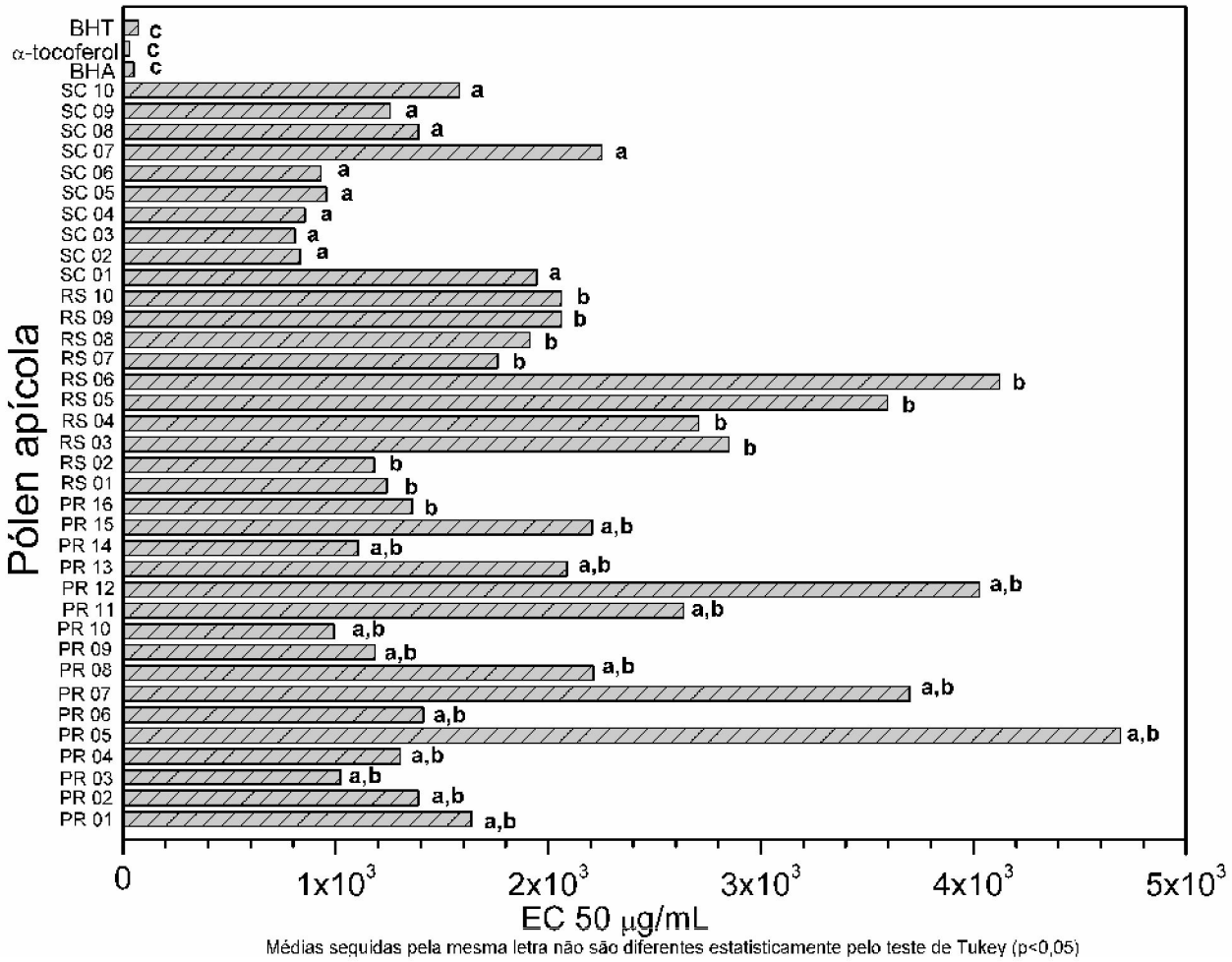


FIGURA 45 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (EC_{50}) DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA

Os valores de EC_{50} encontrados para os controles positivos BHT, BHA e α-tocoferol foram de 70µg/mL, 50µg/mL e 30µg/mL, respectivamente (Figura 45). Entretanto, estas substâncias foram utilizadas puras e são reconhecidas como antioxidantes de alta capacidade de seqüestro de radicais livres. Desta forma, as amostras de pólen brasileiro além de serem uma boa reserva nutricional de proteínas, carboidratos e minerais podem também ser boa fonte de compostos fenólicos com atividade antioxidante.

Entre as amostras de pólen apícola do Estado do Paraná, os pólens que apresentaram maior e menor atividade antioxidante foram respectivamente o da região de Palmeira (PR 03) e de Pato Branco (PR 05). Essa maior atividade antioxidante está provavelmente relacionada à maior concentração de compostos fenólicos encontrado na PR 3 (46,09±2,03mg GAE/g de pólen apícola), como mostram a Figura 40 e a Tabela 10. As amostras PR 01 e a PR 04 que possuíam maiores teores de flavonóides também apresentaram atividades antioxidante elevadas entre as amostras do Estado do Paraná (Figura 45). De fato, a alta atividade de seqüestro do radical tem sido relacionada com a presença de compostos fenólicos.

Porém, entre as amostras do Estado do Rio Grande do Sul, as amostras RS 01(Ijuí) e RS 02 (Cruz Alta) apresentaram o menor valor de EC_{50} e, consequentemente maior atividade de seqüestro do radical livre (Figura 45 e Tabela 10). Essas amostras também apresentaram o maior teor em compostos fenólicos e flavonóides (Tabela 10). No entanto, entre as amostras do Estado de Santa Catarina, a SC 02 (Canoinha) e SC 03 (São Joaquim) apresentaram as maiores atividades antioxidante (Figura 45) e os maiores teores de compostos fenólicos e flavonóides também entre os três Estados do Sul (Figura 40 e Tabela 10).

A atividade de seqüestro do radical livre DPPH foi também expressa em termos de porcentagem de atividade antioxidante. Neste estudo, após 100 minutos de reação, os extratos etanólicos de pólen foram avaliados na concentração de 2,67mg/mL e os controles positivos BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol) e α-tocoferol na

concentração final de 90 µg/mL. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada segundo a fórmula de Mensor et al. (2001).

A atividade antioxidante dos extratos de pólen variou de 30,54% a 94,73%, com uma média de 73,44 ±21,10%. O alto coeficiente de variação (28,73%) pode ser justificado pela diferenças na origem floral entre as amostras de pólen e pela alta sensibilidade do método empregado (Tabela 11).

TABELA 11 – PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA (EPE) PELO MÉTODO DO DPPH

EPE	% AA *
PR 01	67, 51± 0, 67
PR 02	90, 30 ± 0, 30
PR 03	94, 73± 0, 34
PR 04	92, 60± 0, 53
PR 05	31, 02± 0, 84
PR 06	91, 41± 0, 34
PR 07	40, 74± 0, 11
PR 08	63, 78± 0, 33
PR 09	92, 42± 0, 38
PR 10	92, 71± 0, 38
PR 11	54,77± 0,34
PR 12	32,75± 0,34
PR 13	66,65± 0,16
PR 14	80,44± 0,22
PR 15	56,61± 0,36
PR 16	78,41± 0,24
SC 01	69,13± 0,34
SC 02	92,43± 0,55
SC 03	92,91± 0,36
SC 04	91,98± 0,23
SC 05	92,17± 0,15
SC 06	92,31± 0,14
SC 07	60,67± 0,53
SC 08	89,50± 0,25
SC 09	92,64± 0,29
SC 10	75,81± 0,24
RS 01	92,69± 0,41
RS 02	92,03± 0,05
RS 03	50,65± 0,12
RS 04	50,53± 0,26
RS 05	35,79± 0,34
RS 06	30,54± 0,33
RS 07	73,68± 0,43
RS 08	72,29± 0,19
RS 09	93,18± 0,26
RS 10	75,97± 0,25
$V_{mín.}$	30,54
$V_{máx.}$	94,73
Média±SD	73,44±21,10
CV(%)	28,73

* média de triplicatas± SD (n=3)
% AA : α-tocoferol: 96,44± 0.44; BHA: 88,08± 0,58; e BHT: 20,68± 0,15

4.2.4.3 Atividade antioxidante pelo método do β-caroteno

Segundo vários autores (GORISTEIN et al., 2005; KULISIC et al., 2004; ABDILLE et al., 2005) a medida da atividade antioxidante por meio do método de descoloração do β-caroteno é baseada na perda da cor amarela, devido às reações com radicais formados durante a oxidação do ácido linoléico em uma emulsão. Neste método, o β-caroteno sofre uma rápida descoloração na ausência de um antioxidante devido à oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoléico, os quais geram radicais livres. Esses radicais livres atacam as moléculas de β-caroteno altamente insaturadas. Como resultado disso, o β-caroteno é oxidado, as moléculas menores são quebradas e subsequentemente o sistema perde o cromóforo. A descoloração amarelada do β-caroteno pode então ser monitorada espectrofotometricamente.

A atividade antioxidante por este método pode ser útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos, como os óleos essenciais. Por outro lado, se compostos polares forem testados apenas pelo método do β-caroteno pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante dos mesmos. Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos como o método do DPPH• que independe da polaridade do substrato.

É comum observar que antioxidantes apolares, como o α-tocoferol, são relativamente ineficientes em óleos, mas altamente eficazes em uma emulsão água-óleo. Em contraste, um antioxidante polar como o ácido ascórbico ou trolox (um análogo da vitamina E, solúvel em água) pode ter

maior eficiência em óleos do que em emulsões. Este fato tem sido descrito como o *paradoxo polar*, ou seja, antioxidantes polares são mais ativos em lipídios puros enquanto os apolares são mais ativos em substratos polares (PORTER, 1993; FRANKEL et al., 1994).

A atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola pelo método do β-caroteno variaram de 69,78 a 93,12% com média de 83,60±6,56 e coeficiente de variação de 7,85% (Figura 46).

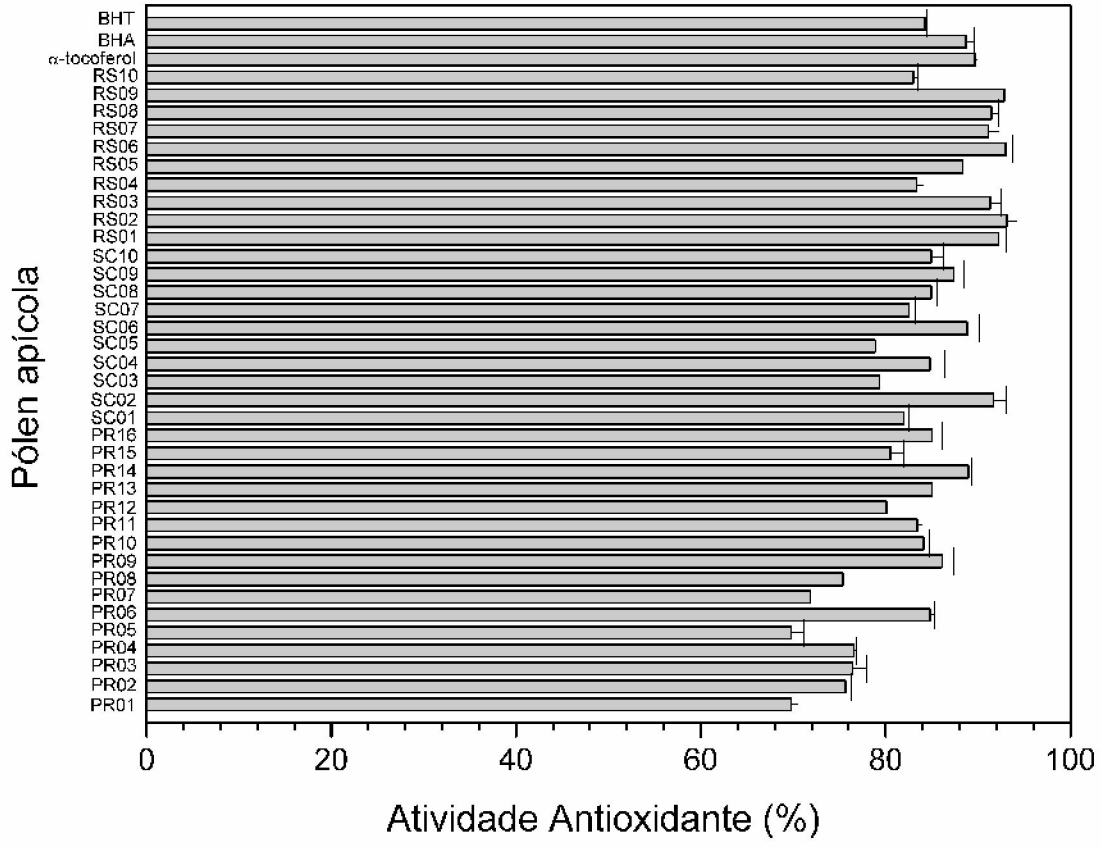


FIGURA 46 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) PELO MÉTODO DO β - CAROTENO- ÁCIDO LINOLÉICO

Pelo sistema de clareamento do β-caroteno/ácido linoléico a atividade antioxidante do BHT (88,72%) foi estatisticamente maior que a atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola dos estados do Paraná e de Santa Catarina, porém não houve diferença estatística com a atividade antioxidante dos extratos do Estado de Rio Grande do Sul. Embora o BHA tenha apresentado atividade antioxidante maior que os extratos etanólicos do pólen do estado do Paraná, os extratos de pólen dos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul apresentaram atividade antioxidante iguais e até superiores ao antioxidante comercial BHA, respectivamente (p<0,01%). O antioxidante α-tocoferol foi estatisticamente superior aos extratos de pólen dos estados do Paraná e Santa Catarina, porém os extratos de pólen do Rio Grande do Sul apresentaram atividades estatisticamente iguais a esse composto puro (p <0,01%) (Figura 46).

Em função das diferenças de especificidade e sensibilidade entre os métodos não foi possível usar quantidades iguais de antioxidantes em cada teste. Por outro lado, o uso de concentrações distintas nos dois métodos torna difícil a comparação dos resultados. Porém, independente do método escolhido, a medida da atividade antioxidante em várias concentrações fornece uma compreensão melhor do potencial dos compostos presentes (Tabela 11, Figura 45 e 46).

Embora, neste estudo todos os padrões tenham sido dissolvidos em etanol, a cinética de reação e a atividade antioxidante destes compostos foram bastante distintas. Em uma cinética de reação de 30 minutos o α-tocoferol apresentou um EC_{50}=30μg/mL e atividade

antioxidante de 96,44 ± 0,45% e 89,68 ± 0,28% por meio dos métodos do DPPH e β-caroteno, respectivamente (Tabela 11, Figura 45 e 46).

Em uma cinética lenta, duas horas de reação, o BHA apresentou um EC_{50} = 50 µg/mL e atividade antioxidante de 88,08 ± 0,58% e 84,29 ±0,15%, pelos método do DPPH e β-caroteno, respectivamente. Entretanto, para o BHT pode-se observar valores altos de atividade antioxidante (88,72 ±0,92%) quando utilizado o sistema β-caroteno/ácido linoleico, porém apenas 20,68 ± 0,15% pelo método do DPPH em uma cinética relativamente lenta (60 minutos de reação) e EC_{50}=70µg/mL, demonstrando comportamento distinto dessa substância pelos dois métodos de determinação da atividade antioxidante (Tabela 11, Figura 45 e 46).

Esses resultados sugerem não haver uma associação positiva ($p<0,01$) entre a capacidade de seqüestro de radical livre pelo método do DPPH e a atividade antioxidante pela sistema de clareamento do β-caroteno-ácido linoléico. Estes dados corroboram com resultados de Liu et al. (2007), os quais não apresentaram interdependência significativa entre a atividade de sequestro de radical DPPH e a atividade antioxidante pelo método do β-caroteno-ácido linoléico dos compostos fenólicos de oriundos de *Xylaria* sp. de *Ginkgo biloba*. Segundo os autores, essas diferenças são atribuídas aos vários mecanismos envolvidos na atividade antioxidante, conseqüência da alta especificidade da análise dos compostos lipofílicos (LIU et al., 2007).

4.2.5 Correlação entre atividade antioxidante e compostos fenólicos

Quando se analisa a relação entre a atividade antioxidante e o teor compostos fenólicos, percebe-se muitas vezes que a literatura é contraditória. Muitos autores encontraram uma correlação positiva entre os compostos fenólicos e/ou flavonóides e o potencial antioxidante de uma grande variedade de produtos alimentícios (KROYER e HEGEDUS, 2001; JAVANMARDI et al., 2003; KULISIC et al., 2004; MEDA et al., 2005; CARPES et al., 2007; LEJA et al., 2007) enquanto outros relatam uma correlação muito fraca entre atividade antioxidante e compostos fenólicos (ZHENG e WANG, 2001; ATOUI et al., 2005).

Neste estudo foi observada uma relação estatisticamente significativa (p<0,01) entre atividade antioxidante pelo método do DPPH e teor de compostos fenólicos totais (R=0,63) (Figura 47A) e flavonóides totais (R=0,60) (Figura 47 B). No entanto, a variabilidade da atividade de seqüestro do radical nas amostras de pólen apícola parece não corresponder ao teor de compostos fenólicos totais, sendo manisfestado pelo baixo coeficiente de correlação (R^2 = 0,3917). Este mesmo comportamento foi observado com a variável flavonóides totais (R^2 = 0,3604).

Entretanto, não houve uma relação estatisticamente significativa (p>0,01) entre teor de compostos fenólicos (R=-0,05) e flavonóides (R=0,18) com a porcentagem de inibição pelo método β-caroteno/ácido linoléico. Porém, Carpes et al. (2007) encontraram baixa correlação entre atividade antioxidante pelo método do β-caroteno e o teor de compostos

fenólicos em extrato de pólen apícola de Alagoas e Paraná (União da Vitória).

Essa variação pode ser explicada pelas diferenças no mecanismo de ação entre os dois métodos. Existe também uma similaridade entre as metodologias empregadas na atividade antioxidante pelo método do radical estável DPPH e a determinação dos compostos fenólicos totais, pois em ambos os casos há transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, por meio da doação de um hidrogênio.

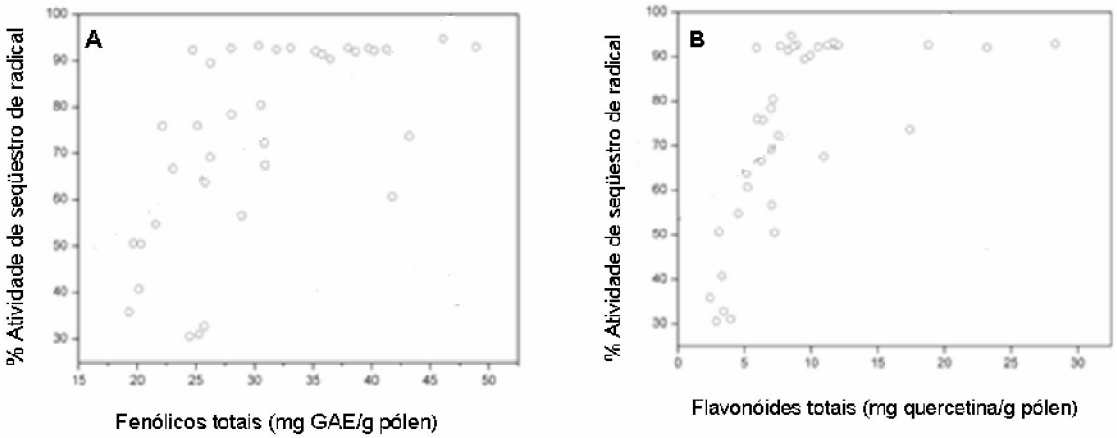


FIGURA 47 - CORRELAÇÃO ENTRE FENÓLICOS TOTAIS E % ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAL (A) E ENTRE FLAVONÓIDES TOTAIS E % ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAL (B).

Essa mesma correlação foi percebida por Parejo et al. (2002) que encontraram uma correlação positiva entre atividade de seqüestro do radical DPPH e o teor de compostos fenólicos totais estimados pelo método de Folin-Ciocalteu em ervas mediterrâneas (R= 0,70) e plantas

aromáticas (R=0,83). Estes resultados indicam que a atividade de seqüestro do radical DPPH pode ser fundamentada com base na análise do Folin-Ciocalteu e que esses dois métodos dependem de um mecanismo similar, ou seja, a propensão de doação de hidrogênio.

Katsube et al. (2004) estudaram as características antioxidantes de 52 tipos de plantas do Japão através da análise da oxidação da molécula de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e os resultados foram correlacionados com o método de seqüestro do radical DPPH* e teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Neste estudo, foi encontrada alta correlação entre a atividade de seqüestro do radical DPPH e o teor de compostos fenólicos totais (Folin Ciocalteu) (R=0,969) e uma redução da correlação da oxidação da LDL com a atividade antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH (R=0,877). Isto foi uma conseqüência da afinidade do antioxidante frente à molécula LDL e os mecanismos característicos envolvidos nos métodos utilizados como: atividade de seqüestro do radical livre, quelação do metal e ligação em sítios fundamentais na molécula de LDL.

Ainda que em diversos trabalhos o conteúdo fenólico de certos alimentos está bem correlacionado com a atividade antioxidante, o conteúdo fenólico total não tem sido o único fator determinante da atividade, pois outras substâncias não fenólicas contidas poderiam também exercer tal atividade (LARRAURI et al. 1996; LARRAURI et al., 1998).

4.2.6 Atividade antibacteriana dos extratos de pólen apícola (EPE)

O pólen apícola é um alimento que, além da sua qualidade nutricional, possui compostos fenólicos com atividade antioxidante (SERRA BONVEHÍ et al., 2001; KROYER e HEGEDUS, 2001). Apesar disto, pouco se sabe sobre o seu potencial antimicrobiano. Desta forma, as 36 amostras de pólen apícola da região Sul do Brasil foram submetidas à análise de atividade antibacteriana.

Foram utilizados os métodos de difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM), contra cinco bactérias patogênicas humanas (*Bacillus subitilis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442, *Streptococcus mutans Ingbritt* 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e *Klebsiella pneumoniae)* e quatro bactérias fitopatogênicas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas* vesicatoria pv vesicatoria, *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria, *Pseudomonas* syringae pv. tomato).

As Figuras 48 e 49 ilustram o teste de difusão em ágar com as bactérias *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus,* respectivamente. O teste controle utilizado demonstrou que o etanol usado nas extrações não apresentou nenhuma ação inibitória, enquanto que a clorexidina, usada como controle positivo, apresentou a mesma ação com as diferentes bactérias testadas (Figura 48).

Todos os extratos etanólicos de pólen apícola da Região Sul do Brasil não apresentaram inibição contra os nove microrganismos testados

e seguiram a mesma resposta que as apresentadas nas Figuras 48 e 49 (Tabela 12).

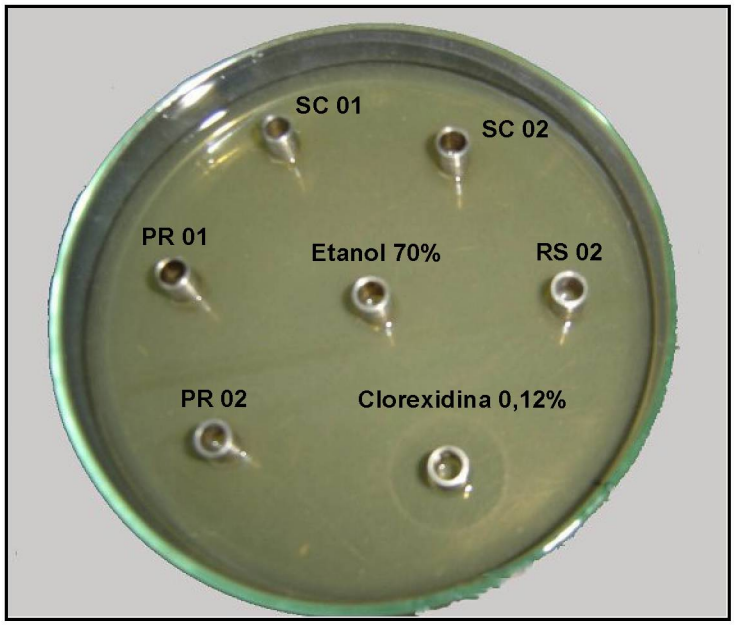


FIGURA 48 - TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA (EPE) (PR 01, PR 02, SC 01, SC 02, RS 02) CONTRA *STREPTOCOCCUS MUTANS.*

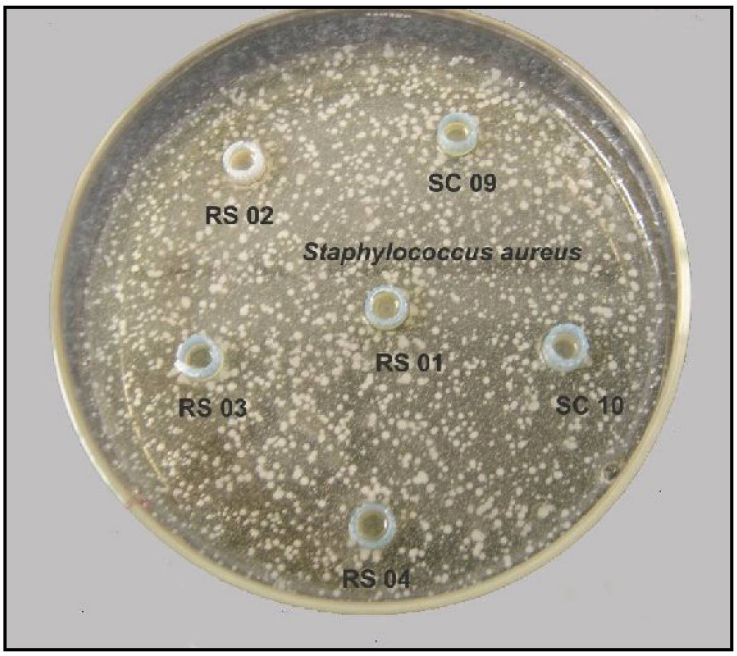


FIGURA 49 - TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA (EPE) (RS 01, RS 02, RS 03, SC 09, SC 10) CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

TABELA 12 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PÓLEN (EPE) PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

EPE	Bactérias*								
	Streptococcus mutans	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas euruginosa*	*Klebsiella pneumoniae*	*Bacillus subtilis*	*Agrobacterium tumefaciens*	*Xanthomonas vesicatoria*	*Xanthomonas axonopodis*	*Pseudomonas syringae*
PR 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 06	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 08	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 09	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 06	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 08	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 09	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 06	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 08	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 09	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ETANOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CLOREXIDINA	3	3	3	3	3	3,5	3,5	3,5	3,5

* diâmetro do halo de inibição (cm)

Os extratos de pólen apícola também não demostraram inibição bactericida nas concentrações testadas, para os microrganismos utilizados neste estudo. Apesar dos extratos de pólen apícola da Região Sul do Brasil apresentar alto teor de compostos fenólicos com atividade antioxidante, estes não foram capazes de inibir a atividade bacteriana pelos métodos utilizados.

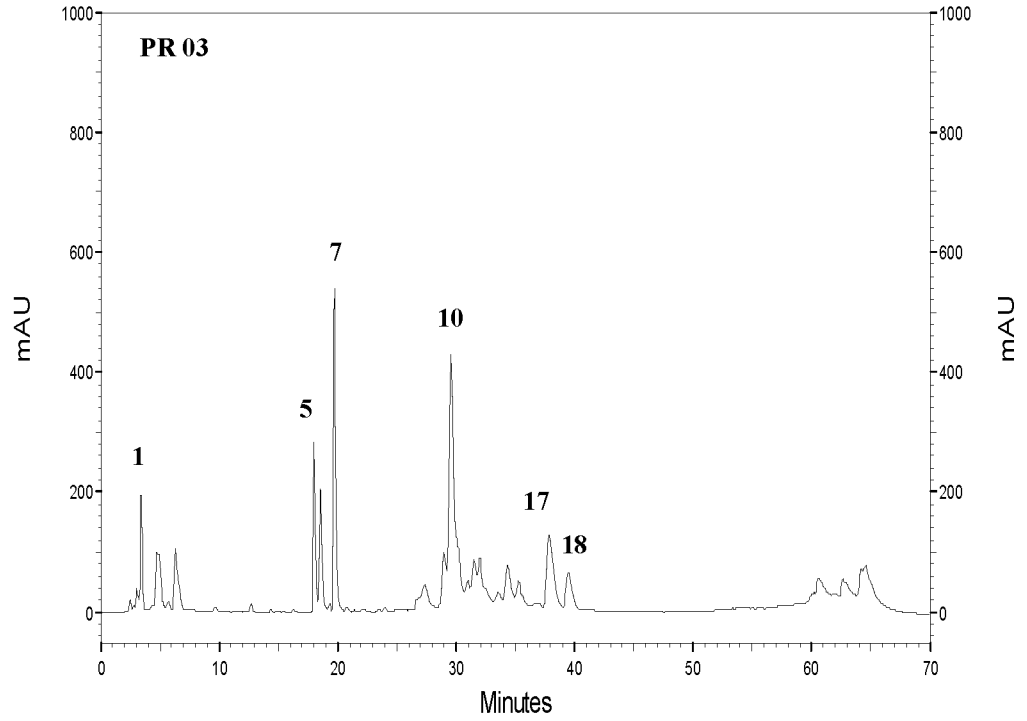
Os resultados encontrados foram diferentes dos encontrados por Basim et al. (2006), que avaliaram a atividade antibacteriana do pólen da Turquia contra treze bactérias fitopatogênicas que causam várias pragas em frutas e vegetais. Neste estudo o pólen apícola apresentou atividade contra esses microrganismos e as zonas de inibição apresentaram variações em relação a concentração de extrato de pólen utilizados. Entre as bactérias testadas, a *A. tumefaciens* foi a mais sensível na concentração de 1/5 dos extratos de pólen e a sensibilidade das bactérias seguiram a seqüência *A. tumefaciens*, *P. syringae* pv. *tomato*, X. *axonapodis* pv. *vesicatoria* > *E. amylovora*, *P. conrrugata*, *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* > *A. vitis*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* > *E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, P. *syringae* pv. *phaseolicola* > *P. syringae* pv. *syringae*. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças botânicas dos polens apícolas estudados. Pois, sabe-se que a composição química do pólen está relacionado com a origem floral, geografia do solo e condições climáticas.

4.2.7 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

Após uma prévia classificação das 36 amostras dos extratos de pólen apícola pela técnica de varredura na região UV-visível, CLAE, CCDAE, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante foi possível perceber a predominância de 3 grandes tipos de pólen. Ou seja, foi possível verificar uma grande similaridade no perfil de absorção entre as amostras de um mesmo Estado (Figuras 34, 35 e 36). Foram então eleitas as amostras PR 03, SC 03 e RS 09 para avaliação do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação dos compostos foi realizada utilizando detector de arranjo de diodo comparando-se o tempo de retenção, o espectro de absorção e co-cromatografia com os padrões disponíveis.

As Figuras 50-52 demonstram uma composição complexa com vários picos em diferentes tempos de retenção. O perfil cromatográfico dos extratos etanólicos do pólen apícola indicou a presença de aproximadamente 24 compostos e perfis distintos.

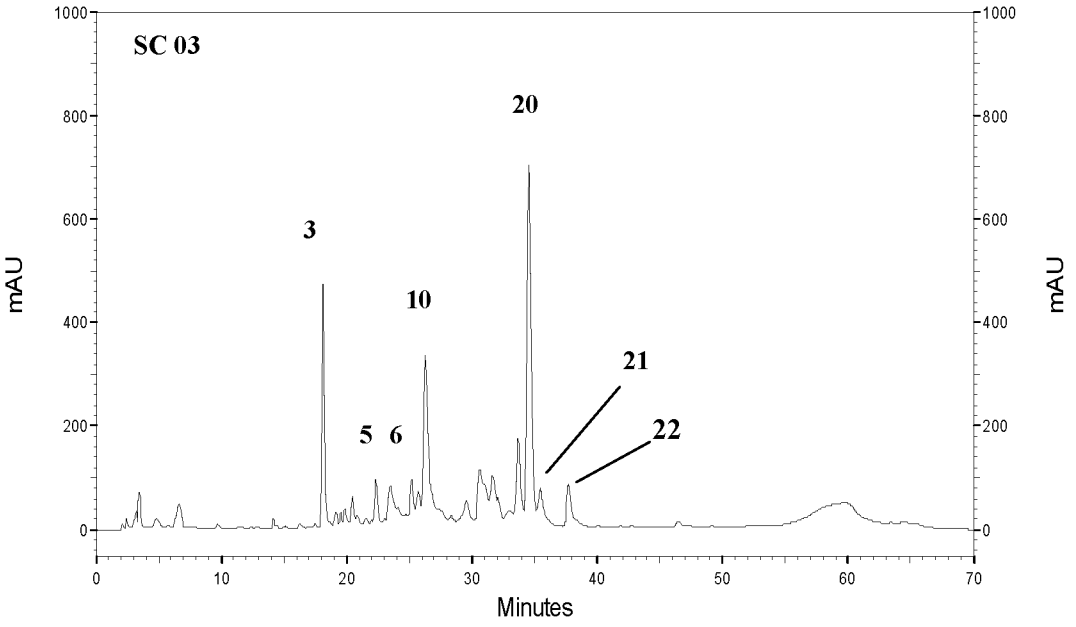
O extrato de pólen apícola PR 03 mostrou um perfil cromatográfico diferenciado das demais amostras analisadas com picos mais pronunciados no tempo de retenção em torno de 20 minutos e após 60 minutos (Figura 50).



Concentração: 100 mg/mL com 10µL de injeção. (1), UV $\lambda_{máx}$ 259 nm, RT = 3,46 min; (5), UV $\lambda_{máx}$ 253 nm, RT = 18,00 min; (7), UV $\lambda_{máx}$ 263 nm, RT = 19,74 min; (10), UV $\lambda_{máx}$ 319 nm, RT = 29,54 min; (17), UV $\lambda_{máx}$ 309 nm, RT = 37,86 min; (18), UV $\lambda_{máx}$ 313 nm, RT = 39,48 min.

FIGURA 50 - CROMATOGRAMAS EM CLAE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) - AMOSTRA PR 03.

Na amostra SC 03 foi possível identificar e quantificar os flavonóides rutina e miricetina, com teores de 84,06mg/100 e 69,49mg/100g de pólen, respectivamente (Figura 51). Estes dois compostos podem justificar a alta atividade antioxidante dessa amostra.



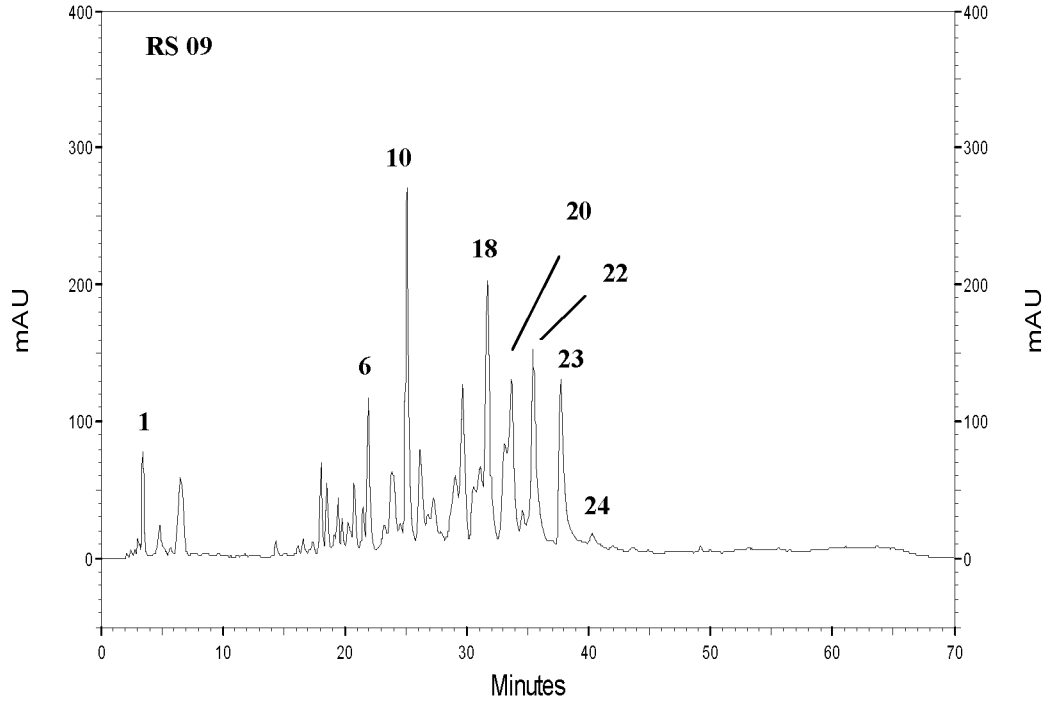
Concentração: 100 mg/mL com 10µL de injeção. (3), UV $\lambda_{máx}$ 254 nm, RT = 18,00 min; (5), Rutina (84,06 mg de rutina/100 g de pólen); (6), Miricetina (69,49 mg de miricetina/100g de pólen); (10), UV $\lambda_{máx}$ 351 nm, RT = 26,24 min; (20), UV $\lambda_{máx}$ 316 nm, RT =34,52 min; (21), UV $\lambda_{máx}$ 311 nm, RT =35,43 min; (22), UV $\lambda_{máx}$ 297 nm, RT =37,69 min.

FIGURA 51 - CROMATOGRAMAS EM CLAE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) - AMOSTRA SC 03.

O cromatograma referente ao pólen apícola da amostra RS 09 apresentou um maior número de picos (24 picos) entre as amostras analisadas (Figura 52). Entretanto, apenas a rutina pode ser identificada na concentração de 99,10mg /100g de pólen da amostra RS 09 (Figura 52).

A presença de rutina no pólen apícola indica a qualidade nutricional e biológica do pólen em função de sua elevada atividade antioxidante. No mercado europeu, uma quantidade mínima de 20mg de rutina/100g de

pólen é necessária para a padronização do pólen comercializado na Espanha (SERRA BONVEHÍ et al., 2001).



Concentração: 100 mg/mL com 10µL de injeção. (1), UV $\lambda_{máx}$ 259 nm, RT = 3,46 min; (6), Rutina (99,10 mg de rutina/100 g de pólen); (10), UV $\lambda_{máx}$ 263 nm, RT = 25,08 min; (18), UV $\lambda_{máx}$ 273 nm, RT = 31,65 min; (20), UV $\lambda_{máx}$ 289 nm, RT = 33,64 min; (22), UV $\lambda_{máx}$ 296 nm, RT = 35,42 min; (23), UV $\lambda_{máx}$ 297 nm, RT = 37,73 min; (24), UV $\lambda_{máx}$ 267 nm, RT = 40,28 min.

FIGURA 52 - CROMATOGRAMAS EM CLAE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) - AMOSTRA RS 09.

Serra Bonvehì et al. (2001) identificaram treze compostos fenólicos no pólen apícola da Espanha, entre eles sete foram ácidos fenólicos como: ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siringico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, éster etílico do ácido 4-hidroxibenzóico, ácido trans-cinâmico e os flavonóides rutina, quercetina, miricetina, kanferol e isoramnetina. Leja et al. (2007) estudaram os constituintes fenólicos

(fenólicos totais, fenilpropanóides, flavonóis e antocianinas) de pólen apícola de 12 espécies diferentes da região da Krakow na Polônia. Neste estudo foi encontrada uma grande variabilidade de compostos fenólicos nas espécies investigadas e na maioria das amostras examinadas a alta atividade antioxidante estava relacionada ao nível de fenilpropanóides.

De acordo com essas evidências químicas, o pólen da Região Sul do Brasil parece possuir uma composição distinta que lhe possibilita elevada ação antioxidante (Figuras 45; 46, 50-52).

O perfil químico obtido pela técnica de CLAE/DAD demonstrou poucos compostos com alta polaridade, provavelmente ácidos fenólicos e uma grande variedade de compostos mais apolares, provavelmente flavonóides. Devido à não disponibilidade de padrões, não foi possível a identificação da maioria dos compostos presentes no pólen apícola da Região Sul do Brasil pela técnica de CLAE/DAD.

Segundo D'arcy (2005), o UV - DAD não é o sistema de detecção mais adequado para determinação do ácido gálico e crisina quer em 290 mn ou 340 mn. Neste caso, a análise por cromatografia líquida com espectrômetro de massas (LC-EM) foi mais adequada.

Estudos realizados por Tomás-Barberán et al. (1989) mostraram que o polen apícola de *jara* continha principalmente quercetina e isoramnetina-3-glicosídeo, e concentrações traços de miricetina e kaempferol-3-glicosideos. Este flavonóide é similar ao encontrado no pólen natural de *jara*, sugerindo que este padrão de flavonóide pode ser usado como marcador químico. Similarmente, o composto 8-methoxi-

kaempferol-3-glicosideo pode ser marcador bioquímico do pólen apícola de *almond*, pois não está presente em pólens de outros vegetais. Desta forma, as características dos padrões de flavonóides podem ser usados como marcadores bioquímicos da planta originaria (CAMPOS et al., 1997; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1989).

4.2.8 Purificação dos Extratos Etanólicos de Pólen Apícola

Uma das principais dificuldades nas análises por CLAE de compostos fenólicos e flavonóides em produtos apícolas como pólen e mel, está principalmente na extração de flavonóides e no preparo das amostras em função do seu alto teor de açúcar (FERRERES et al., 1994). O fracionamento líquido-líquido produz interfaces inconvenientes, as quais não permitem a completa recuperação dos flavonóides. Entretanto este problema pode ser resolvido usando uma resina polimérica não iônica Amberlite XAD-2 (FERRERES et al., 1994).

Neste estudo foi usado a resina pura Amberlite XAD-2 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) para a completa absorção dos compostos fenólicos e, posterior eluição com metanol (Figura 53).

D'arcy (2005) utilizou dois métodos para extrair os compostos fenólicos em méis com o uso de resina hidrofóbica: (1) misturando a solução de mel com a resina XAD-2 por 10 minutos antes de empacotar na coluna de vidro e (2) adicionando a solução de mel à resina já empacotada (método de eluição). A recuperação de todos os compostos

fenólicos foi maior quando o autor usou o método de mistura da solução de mel com a resina XAD-2.

Os flavonóides glicosilados frequentemente necessitam de hidrólise para remover o açúcar, seja ela ácida, básica ou enzimática. Segundo Sivam (2002), a análise de CLAE ultravioleta com detector de arranjo de fotodiodo é o método padrão para a detecção de flavonóides.

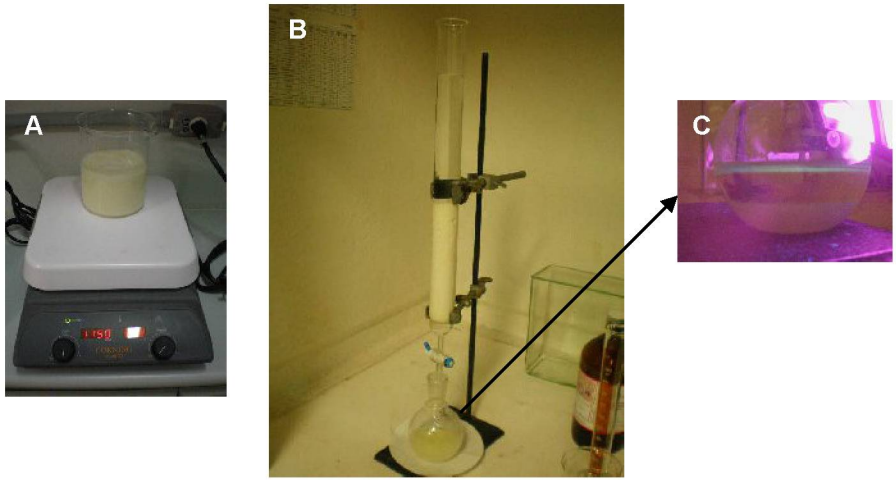


FIGURA 53 - (A) HOMOGENEIZAÇÃO DA RESINA XAD2 COM O EXTRATO DE PÓLEN, (B) EMPACOTAMENTO EM COLUNA E (C) EXTRATO METANÓLICO IRRADIADO COM LUZ U.V 366 nm.

O uso de resina polimérica hidrofóbica, tipo Amberlite XAD2, se faz muito importante na recuperação de compostos fenólicos presentes no pólen apícola. O teor de compostos fenólicos e flavonóides dos extratos de pólen após o uso da resina polimérica variaram de 20,17 a 33,39mg GAE/g de pólen e 6,54 a 17,49mg de quercetina/g de pólen, respectivamente. A amostra SC 3 apresentou a maior variação no teor de

flavonóides totais antes e após a resina Amberlitte XAD2 (28,33 e 6,54 de mg quercetina/g de pólen), respectivamente (Tabela 13).

TABELA 13 – ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS DE PÓLEN APÍCOLA APÓS O USO DA RESINA HIDROFÓBICA

Extratos etanólicos de pólen apícola								
	Compostos fenólicos totais (mg GAE/g pólen apícola)		Flavonóides totais (mg quercetina/g pólen apícola)		Atividade antioxidante (%)*			
					Método β-caroteno		Método DPPH	
	Antes**	Após**	Antes**	Após**	Antes**	Após**	Antes**	Após**
PR 03	46,09	20,17	8,50	17,49	76,40	86,43	24,61	94,73
SC 03	48,89	33,39	28,33	6,54	79,33	89,21	40,73	92,54
RS 09	30,39	25,37	11,67	14,72	92,84	93,29	14,83	94,05

* concentração do extrato 0,5 mg/mL ; ** antes e após o uso da resina Amberlitte XAD-2

A redução no teor de compostos fenólicos após o uso da resina (Tabela 13), provavelmente, foi devido à retirada dos compostos fenólicos polares que puderam ser carreados na fração aquosa. Essa redução foi também percebida nos cromatogramas dos extratos de pólen apícola (Figura 54-56). Por outro lado, a atividade de seqüestro do radical DPPH aumentou significativamente nos extratos de pólen apícola purificados com resina hidrofóbica (Tabela 13). Apesar do teor de compostos fenólicos totais ter diminuído em torno de duas vezes, a resina Amberlite XAD2 proporcionou uma adsorção de compostos fenólicos de efetiva atividade antioxidante, podendo ser um tratamento indicado na caracterização de compostos fenólicos do pólen apícola.

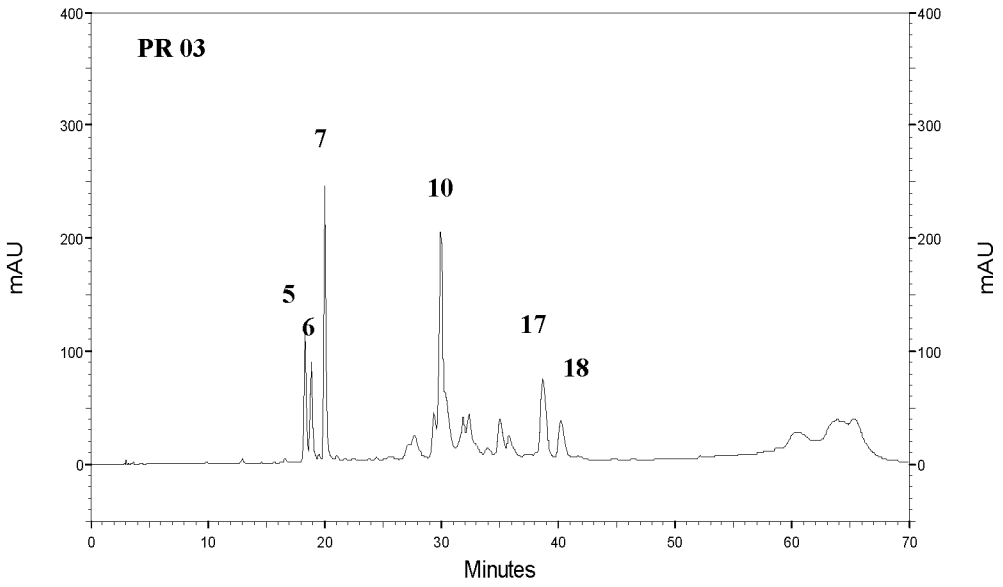
A atividade antioxidante dos extratos de pólen apícola pelo método do β-caroteno teve um acréscimo, entretanto menos significativo (Tabela 13). Provavelmente, isto aconteceu pela retirada dos compostos polares presentes no extrato, já que o método de alguma forma é influenciado por esses compostos. Neste método o complexo fenômeno interfacial chamado de *paradoxo polar* influencia o comportamento dos antioxidantes, pois os antioxidantes polares restantes na fase aquosa estão mais diluídos e são desta forma, menos efetivos para proteger o lipídeo. Koleva et al. (2002) estudaram a atividade antioxidante medida pelo método do β-caroteno em extratos de *Sideritis Labiatae* da Bulgária e, descobriram que os inibidores mais ativos do descoloramento do β-caroteno foram principalmente os extratos apolares.

4.2.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos etanólicos de pólen apícola após o uso da resina Amberelite XAD2.

Quando se compara os cromatogramas dos extratos etanólicos de pólen apícola (EPE) antes e após a filtração com resina Amberlite XAD2, pode-se verificar a presença de novos picos e o desaparecimento de outros. Os compostos que possuíam tempo de retenção inferior a 18 minutos desapareceram, provavelmente porque são mais polares e foram arrastados após a lavagem com água (Figura 54-56). Segundo D'arcy (2005), os novos compostos formados podem ser devido a reações químicas de compostos como ácido clorogênico e ácido ferulico com a resina Amberlite XAD2. Entretanto, o autor sugere maiores estudos com

relação e essas afirmações.

A amostra PR 03 teve apenas a retirada dos compostos com tempo de retenção inferior a 18 minutos, sendo que após esse tempo o perfil cromatográfico manteve-se igual ao extrato não purificado pela resina, ou seja, sem nenhuma provável interação com a resina hidrofóbica (Figura 54).

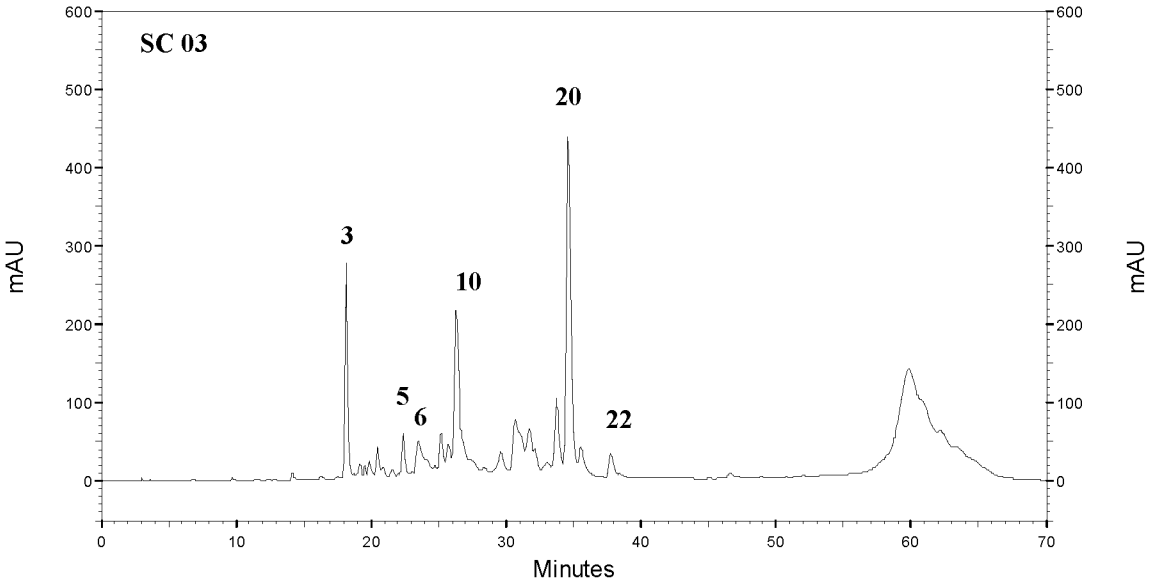


Concentração: 7mg/mL com 5µL de injeção. (5), UV $\lambda_{máx}$ 252 nm, RT = 18,34 min; (6), UV $\lambda_{máx}$ 263 nm, RT = 18,84 min; (7), UV $\lambda_{máx}$ 263 nm, RT = 20,04 min; (10), UV $\lambda_{máx}$ 320 nm, RT = 29,92 min; (17), UV $\lambda_{máx}$ 309 nm, RT = 38,64 min; (18), UV $\lambda_{máx}$ 313 nm, RT = 40,19 min.

FIGURA 54 – PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA (EPE) DA AMOSTRA PR 03 APÓS O USO DA RESINA XAD2.

A resina XAD2 possibilitou a retirada dos poucos compostos polares presentes na amostra SC 03, que foram solubilizados e arrastados após a lavagem com água ácida. Foi possível identificar e quantificar os flavonóides rutina e miricetina, com teores de 77,15mg/100

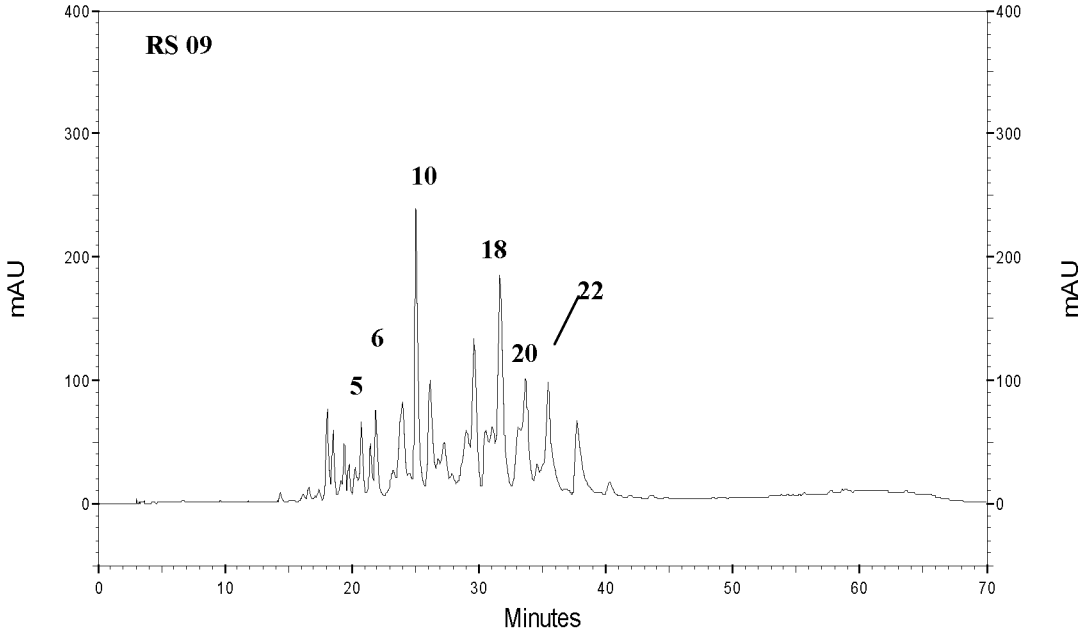
e 23,53 mg/100g de pólen, respectivamente na amostra SC 03 (Figura 55).



Concentração: 7mg/mL com 5µL de injeção. (3), UV $\lambda_{máx}$ 253 nm, RT = 18,17 min; (5), Rutina (77,15 mg de rutina/100 g de pólen); (6), Miricetina (23,53 mg de miricetina/100g de pólen); (10), UV $\lambda_{máx}$ 351 nm, RT = 26,27 min; (20), UV $\lambda_{máx}$ 317 nm, RT = 34,60 min; (22),), UV $\lambda_{máx}$ 307 nm, RT = 37,77 min.

FIGURA 55 – PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA DA AMOSTRA SC 03 APÓS O USO DA RESINA XAD2.

A rutina também foi encontrada na concentração de 42,63 mg/100g de pólen da amostra RS 09 (Figura 56). Quando se compara os cromatogramas da amostra RS 09 antes e após o uso da resina XAD2, constata-se que houve um deslocamento no tempo de retenção de alguns picos (ex. pico 10 e 20) e a supressão de outros (ex. pico (24), UV $\lambda_{máx}$ 267 nm, RT = 40,28 min) (Figura 52 e 56).



Concentração: 7mg/mL com 5µL de injeção. (5), UV $\lambda_{máx}$ 253, RT = 21,47 min; (6) Rutina (42,63 mg de rutina/100 g de pólen); (10), UV $\lambda_{máx}$ 264 nm, RT = 25,05 min; (18), UV $\lambda_{máx}$ 273 nm, RT = 31,63 min; (19), UV $\lambda_{máx}$ 290 nm, RT = 33,64 min; 20(C), UV $\lambda_{máx}$ 296 nm, RT = 35,43 min; (22), UV $\lambda_{máx}$ 297 nm, RT = 37,75 min; (23), UV $\lambda_{máx}$ 267 nm, RT = 38,55 min.

FIGURA 56 – PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA DA AMOSTRA RS 09 APÓS O USO DA RESINA XAD2.

Yao (2002) relatou em seus experimentos que a resina Amberlite XAD2 não possibilitou a recuperação de ácidos fenólicos, como o ácido gálico e o ácido elágico em soluções ácidas de méis (pH 2). D'arcy (2005), otimizando a extração de compostos fenólicos com resina XAD2, encontrou ácido caféico, ácido ferúlico, ácido ρ-coumárico, além de flavonóides quercetina, hesperetina e crisina em méis da Australia. Segundo D'arcy (2005), a recuperação de flavonóides tais como, hesperetina e crisina foram superior a 80% com o uso da resina Amberlite XAD2 em solução de mel. Esses resultados corroboram com os

apresentados por Tomás-Barberán et al. (1992) e Martos et al. (1997). Isto confirma que o método usado neste foi apropriado para a extração de flavonóides em pólen apícola.

4.2.8.2 Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos etanólicos de pólen apícola após o uso da resina XAD2

Os extratos etanólicos de pólen apícola purificados por meio de resina hidrofóbica XAD-2 foram submetidos à CG-EM (Figura 57). Nesse estudo, para a identificação dos compostos foram utilizados as bases de dados de espectros de massas NIST107, NIST21 e WILEY139, componentes da estação de trabalho do software CLASS-5000 versão 2.2.

A amostra PR 03 apresentou um perfil cromatográfico contendo 10 picos (Figura 57A), porém apenas 4 compostos foram identificados (Tabela 14). Os compostos representativos da amostra foram ácidos graxos (carboxílicos), identificados na forma de ésteres metílicos de C16 (Pico 5), C18:2 (Pico 6) e C18:3 (Pico 7), com predominância deste último (42,4%). Estes compostos representaram 59,5% da composição total. Foi identificado o ácido benzóico, metil éster (Pico 1) representando 3,9% da amostra. A massa molecular e a característica espectral dos fragmentos de cada composto da amostra PR 03 são apresentados na Tabela 14.

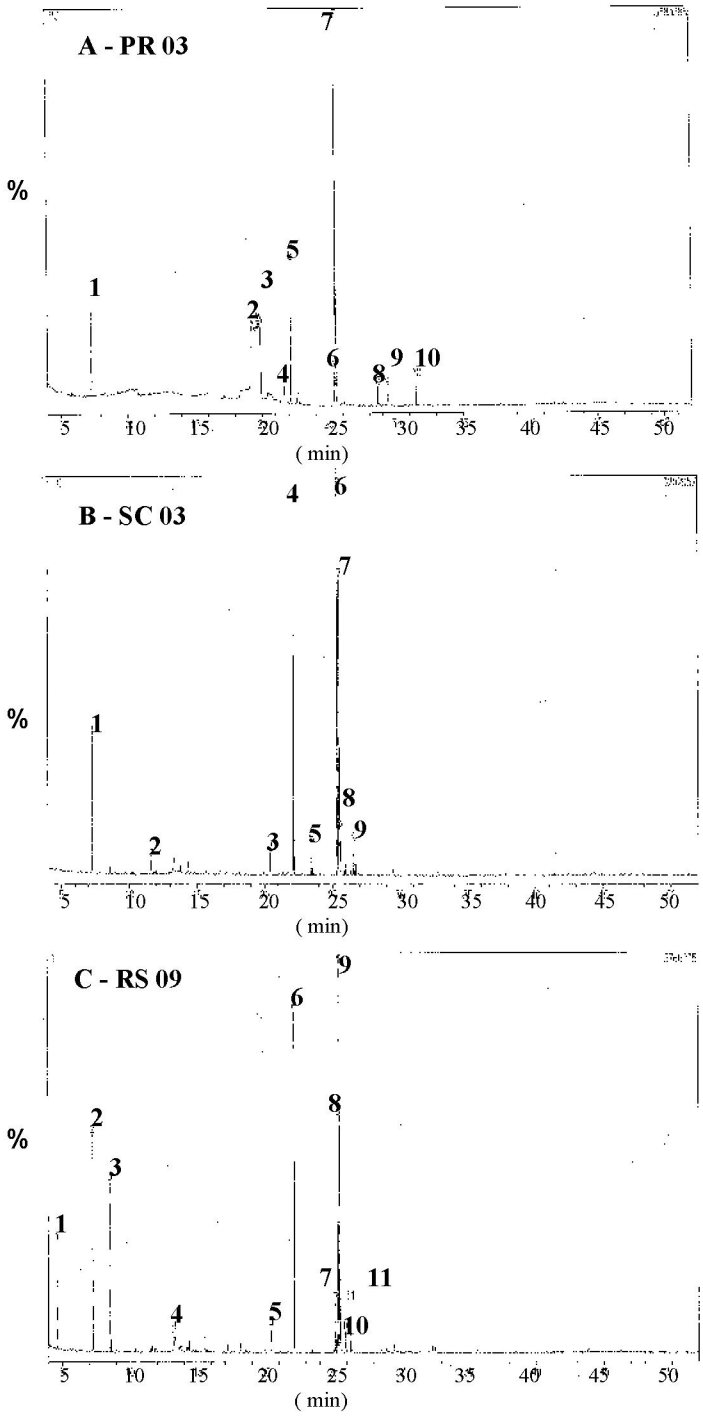


FIGURA 57 – PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CG-EM DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE POLEN APÍCOLA APÓS O USO DA RESINA XAD2. (A) PR 03; (B) SC 03; (C) RS 09.

TABELA 14 – COMPOSTOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PÓLEN APÍCOLA (AMOSTRA PR 03)

Pico número*	Nome	TR** (min)	m/z*** (%)
1	Ácido benzóico, metil éster	7,30	136 [35, M^+], 105 (100), 77 (83), 51 (60)
2	nd****	19,71	224 [28, M^+], 118 (100), 209 (40), 91 (20), 179(12), 77 (12), 41(12)
3	nd	19,86	224 [32, M^+], 118 (100), 209 (40), 41 (16), 91 (16), 77 (12), 179 (12), 193 (12), 96 (8), 65 (4)
4	nd	21,65	161 [M^+], 43 (100), 55 (52), 79 (52), 93 (32), 105 (12), 121 (12), 135 (4), 149 (4)
5	Ácido hexadecanóico, metil éster	22,17	270 [M^+], 74 (100), 43 (68), 87(60), 55 (16), 143 (8)
6	Ácido 9,12-octadecadienóico, metil éster	25,38	294 [M^+], 41 (100), 67 (92), 81 (72), 88 (55), 95 (40), 109 (12), 123 (8), 135 (8), 150 (4)
7	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico, metil éster	25,53	292 [M^+], 41 (100), 55 (68), 79 (76), 93 (36), 108 (20), 121 (8), 135 (6), 149 (6)
9	nd	29,37	234 [4, M^+], 98 (100), 41 (96), 85 (80), 55 (48), 79 (36), 112 (10), 126 (4), 154 (4), 194 (4)
10	nd	31,54	194[4, M^+], 91(100), 117(16), 65(8)

* Relacionado ao cromatograma apresentado na Figura 57 A **Tempo de retenção (min) *** relação massa/carga **** nd: não detectado

A amostra SC 03 apresentou um perfil cromatográfico relativamente simples, sendo detectados 9 picos (Figura 57 B) e identificados apenas 5 compostos com o espectrômetro de massas (Tabela 15). Foi Identificado os mesmos três ácidos graxos (Pico 4, 6 e 7) observados na amostra PR 03, mudando apenas a disposição relativa entre os picos. Desta forma, o ácido hexadecanóico, metil éster, o ácido 9,12-octadecadienóico, metil éster e o ácido 9,12,15-octadecatrienóico, metil éster perfazem 83,6% dos compostos encontrados na amostra SC 03 (Tabela 15). Também foram identificados ácidos carboxílicos aromáticos (ácidos fenólicos) relativos aos picos 1 e 2, contribuindo com 6,7% na composição total da amostra SC 03. A massa molecular e a característica espectral dos fragmentos de cada composto da amostra SC 03 são apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 – COMPOSTOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PÓLEN APÍCOLA (AMOSTRA SC 03)

Pico número*	Nome	TR** (min)	m/z*** (%)
1	Ácido benzóico, metil éster	7,29	136 [32, M^+], 105 (100), 77 (92), 51 (68)
2	Ácido 4-metóxi-benzóico, metil éster	11,66	166[24, M^+], 135(100), 40(65), 77(32), 63(16), 92(16), 107(16)
3	nd****	20,45	224 [24, M^+], 118 (100), 40 (32), 209 (32), 91(20), 77(16), 193(12), 65(8), 103(8), 179 (8)
4	Ácido hexadecanóico, metil éster	22,18	143[8, M^+], 74(100), 43 (72), 87(60), 55(36)
5	nd	23,48	157[4, M^+], 88(100), 43(80), 55(44), 101(36), 70(20)
6	Ácido 9,12-octadecadienóico, metil éster	25,40	294 [M^+], 41 (100), 67 (82), 81 (64), 82 (36), 96 (32), 110 (12), 135 (4), 150 (4)
7	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico, metil éster	25,51	292 [M^+], 41 (100), 55 (72), 79 (56), 95 (28), 108 (12)
8	nd	25,60	137[M^+], 41(100), 55(96), 69(44), 83(28), 97(16), 110(8)
9	nd	26,61	150[M^+], 41(100), 67(84), 55 (80), 81(60), 95(36), 110(12)

* Relacionado ao cromatograma apresentado na Figura 57 B **Tempo de retenção (min) *** relação massa/carga **** nd: não detectado

A amostra RS 09, apresentou um perfil cromatográfico representado por 11 compostos dos quais 8 puderam ser identificados por meio do espectrômetro de massas (Figura 57C, Tabela 16). Foram identificados dois ácidos fenólicos (Picos 2 e 3) representando 15,3% da composição da amostra, sendo que o composto relativo ao pico 2 (ácido benzóico, metil éster) também foi detectado na amostra PR 03 e SC 03. Foram identificados os mesmos três ácidos graxos (Pico 6, 8 e 9) encontrados nas amostras PR 03 e SC 03, os quais contribuem com 70,4% da composição total. Outros ácidos também foram encontrados, um di-ácido de cadeia menor C3 (Pico 1) C19 (Pico 10). O composto relativo ao pico 5 com tempo de retenção de 20,45 minutos também é comum nas três amostras, no entanto não foi possível sua identificação (Figura 57C e Tabela 16). A massa molecular e a característica espectral dos fragmentos de cada composto da amostra RS 09 são apresentados na Tabela 16.

TABELA 16 – COMPOSTOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PÓLEN APÍCOLA (AMOSTRA RS 09)

Pico número*	Nome	TR** (min)	m/z*** (%)
1	Ácido propanodióico, dimetil éster	4,63	132[M^+], 59 (100), 101(64), 42(52), 74(40)
2	Ácido benzóico, metil éster	7,29	136 [32, M^+], 105 (100), 77 (92), 51(68)
3	Ácido fenilacético, metil éster	8,59	150[16, M^+], 91(100), 65 (16), 40(8)
4	1-Dodeceno	13,29	111 [7, M^+], 43(100), 55(76), 69(40), 83(28), 97(16)
5	nd****	20,45	224[24, M+], 118 (100), 209(32), 91(20), 40 (16), 77 (12), 193(12), 96(8), 179(8), 165 (4)
6	Ácido hexadecanóico, metil éster	22,18	143[8, M^+], 74(100), 43 (48), 87(60), 55(32)
7	nd	25,21	161[4, M^+], 41(100), 79(96), 67(52), 91(48), 55(44), 105 (20), 119 (8), 133 (4), 147 (4)
8	Ácido 9,12-octadecadienóico, metil éster	25,39	294 [M^+], 41 (100), 67 (88), 55(84), 81 (64), 82 (37), 96 (36), 110 (12), 135 (4), 150 (4)
9	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico, metil éster -	25,53	292 [M^+], 41 (100), 79 (72), 55 (68), 67(56), 93 (32), 108 (16), 121(8), 135(4), 149(4)
10	Ácido nonadecanóico, metil éster	25,97	312[M^+], 74(100), 43(80), 87(60), 55(36), 143(8)
11	nd	26,29	161[M^+], 41(100), 67(76), 81(56), 55(52), 95(28), 100(8), 121(8)

* Relacionado ao cromatograma apresentado na Figura 57 C **Tempo de retenção (min) *** relação massa/carga **** nd: não detectado

Neste estudo, os extratos etanólicos de pólen foram analisados previamente por Infra Vermelho (IV) e pode-se observar as frequências de estiramento do grupo OH, dos grupos COOH entre 3000 e 3500 cm^{-1} confirmado pela presença da carbonila C=O do grupo carboxílicos entre 1600 e 1750 cm^{-1}. Pode-se observar os ácidos graxos na forma de ésteres metílicos, os quais são predominantes nestas amostras. Desta forma ficou comprometida a identificação de outros compostos presentes como os flavonoides esperados.

Os ácidos fenólicos encontrados nas três amostras podem ser responsáveis pela alta atividade antioxidante do pólen apícola, entretanto, muitos compostos não foram identificados pela técnica de CG-EM com a técnica de derivatização utilizada neste estudo (metilação com diazometano). É também sabido que esta técnica de derivatização pode degradar compostos fenólicos, justificando desta forma a não detecção de flavonóides nas amostras analisadas. Uma sugestão seria aplicar outro tipo de tratamento para promover a separação dos ácidos carboxílicos dos compostos fenólicos.

Sabe-se que um grande número de métodos analíticos é sugerido na literatura para a separação e identificação de compostos fenólicos. A maioria destes protocolos é baseada na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com espectrofotometria na região do UV em função de não ser necessário a derivatização antes da análise (JUSTESEN e KNUTHESEN, 2001; MATTILA e KUMPULAINEN, 2002). Entretanto, comparado à espectrometria de massas, o espectro UV-vis não fornece dados suficientes para a identificação desses compostos (CHEN et al.,

2001; YAO et al., 2005). Desta forma a cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massas (CG-EM) pode fornecer resultados mais detalhados, desde que a metodologia de derivatização esteja adequada. O estudo de compostos fenólicos não voláteis e termolábeis por CG-EM pressupõe sua conversão em compostos voláteis e termotolerantes por meio de uma derivatização química apropriada (VAN BEEK, 2002; ZUO et al., 2002).

Segundo Proestos et al. (2006) a sililação é um procedimento alternativo para a análise de CG-EM de compostos não voláteis e termolábeis, como a maioria dos compostos fenólicos. A sililação é uma reação de substituição nucleofílica em que um hidrogênio ativo do –OH, -COOH, =NH, $-NH_2$ ou –SH é substituído por um grupo trimetilsilil. Os compostos silils devem ser de baixa basicidade e capazes de estabilizar uma carga negativa no estado de transição (CHU et al., 2001). Entretanto, a silização necessita de maiores estudos na identificação dos derivados silil, pois depende de grande habilidade e estrutura laboratorial, uso de reagentes tóxicos e específicos como BSTFA (N, O-bis trimetilsilil trifluoroacetamida), TMCS (trimetil clorosilano), HMDS (hexametildisilazano), DMDCS (dimetildichlorosilano) e tolueno (PROESTOS et al., 2006). A cromatografia gasosa de flavonóides parece ser um tópico de interesse contínuo, pois é objeto de estudo de vários autores (FÜZFAI e MOLN'AR-PERL, 2007; LIU et al., 2007; CHEN e ZUO, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM) é muito usada para a identificação de compostos fenólicos em extratos de plantas, porém, são poucos os

laboratórios brasileiros que possuem esse equipamento com experiência na análise de compostos fenólicos e flavonóides, além de ser uma técnica extremamente cara. Segundo Proestos et al. (2006), o uso do CLAE-EM fornece uma importante vantagem na combinação da capacidade de separação do cromatógrafo líquido com o poder do espectrômetro de massas, como um método de identificação e confirmação de compostos químicos (PROESTOS et al., 2006).

Este estudo fomentou dados importantes com a determinação da atividade antioxidante e a identificação e concentração de alguns flavonóides e ácidos fenólicos nas amostras de pólen apícola da Região Sul do Brasil. Alguns polifenóis puderam ser identificados com ajuda de técnicas instrumentais tais como CLAE-DAD e CG-EM; mas muitos dos compostos fenólicos não foram identificados e, desta forma, há a necessidade de complementar este estudo com técnicas mais apropriadas como CLAE-EM. Estes dados científicos sobre a concentração de polifenóis totais e flavonóides em pólen apícola irão possibilitar a completa caracterização química do pólen apícola da Região Sul do Brasil e a sua consolidação como um alimento saudável e nutritivo para a indústria de alimentos e consumidores.

4.2.9 Caracterização palinológica

Segundo Barth (2004) estudos sobre análise polínica de produtos apícolas do sul do Brasil não são freqüentes. Porém, sabe-se que os méis oriundos dessa região são predominantemente de Asteraceae (Compositae), em especial de *Senecio brasiliensis, maria-mole* e *Lithrea* sp. *aroeira* (BARTH, 1989; MORETI et al., 2002). Em outros estudos, como de Barth (1990), Barth e Dutra (2000) verificaram que os tipos polínicos de diversas espécies de Asteraceae, *Eucalyptus, Myrcia* e *Mimosa scabrella* ocorrem com bastante freqüência nos méis da Região Sul do Brasil.

As *cargas de pólen* analisados nesse estudo continham uma mistura de tipos polínicos de diferentes espécies florais, cuja coloração variou de amarelo claro até cores mais escuras como o roxo e marrom. Foram identificados 22 tipos polínicos nas 36 amostras de pólen apícola da região Sul do Brasil (Tabelas 17, 18 e 19). Com exceção da amostra PR 12 que se caracterizou como monofloral, todas as demais amostras de pólen apícola apresentaram pelo menos dois tipos polínicos. O pólen apícola PR 12, oriundo de um dos apiários de União da Vitória (PR) tinha na sua composição exclusivamente o pólen do tipo *Baccharis* (Asteraceae) (Tabela 17).

TABELA 17 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO PARANÁ

*Imagem	Tipos Polínicos	Amostras de pólen apícola do Estado do Paraná															
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
1	Euphorbiaceae	PD															
2	Asteraceae *Elephantopus*	PII		PIO						PD					PIO		
3	Asteraceae *Eupatorium*		PD		PD		PA	PIO	PA		PD				PII		PA
4	Asteraceae *Gochnatia*				PII				PIO			PA					
5	Asteraceae *Baccharis*					PD							PD			PII	
6	Sapindaceae *Matayba*	PII															
7	Myrtaceae *Eucalyptus*		PII		PA							PA					PA
8	Mimosaceae *Mimosa scabrella*		PA				PA								PA		
9	Verbenaceae *Aegiphila*		PII														
10	Brassicaceae			PD			PII							PII	PD	PA	
11	Arecaceae Tipo I					PII		PD						PA			
12	Arecaceae Tipo 2													PA			
13	Anacardiaceae *Schinus*									PA							
14	Anacardiaceae Tipo I					PII											
15	Anacardiaceae *Astronium*					PIO					PII						
16	Leguminosae					PIO											
17	Boraginaceae *Cordia*							PA									
18	Arecaceae															PD	

* Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); PD = pólen dominante (> 45%); PA = pólen acessório (15 - 45 %); PII = pólen isolado importante (3 – 15%); PIO = pólen isolado ocasional (< 3%).

TABELA 18 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DE SANTA CATARINA

*Imagem	Tipos Polínicos	Amostras de pólen apícola do Estado de Santa Catarina									
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
1	Euphorbiaceae							PA	PII		PII
2	Asteraceae *Elephantopus*		PII								PA
3	Asteraceae *Eupatorium*	PD		PII				PA	PA	PA	
4	Asteraceae *Gochnatia*			PII	PII					PD	PII
5	Asteraceae *Baccharis*	PII			PA		PII	PII			
7	Myrtaceae *Eucalyptus*			PD		PD					
10	Brassicaceae		PD				PII				
11	Arecaceae Tipo I					PII					PD
14	Anacardiaceae Tipo I				PA					PII	
16	Leguminosae								PA		
19	Anacardiaceae Tipo 2				PA	PA		PII			
20	Rosaceae *Prunus*						PD				

* Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); PD = pólen dominante (> 45%), PA = pólen acessório (15 - 45 %); PII = pólen isolado importante (3 – 15%); PIO = pólen isolado ocasional (< 3%).

TABELA 19 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DO PÓLEN APÍCOLA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

*Imagem	Tipos Polínicos	Amostras de pólen apícola do Estado do Rio Grande do Sul									
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
2	Asteraceae *Elephantopus*	PA	PII	PII	PII	PA		PII		PA	PII
3	Asteraceae *Eupatorium*				PA	PA	PII		PII		
4	Asteraceae *Gochnatia*							PA			
5	Asteraceae *Baccharis*									PA	
6	Sapindaceae *Matahyba*	PA	PD						PD		
7	Myrtaceae *Eucalyptus*						PD	PA		PD	
10	Brassicaceae	PA	PA	PD	PD						PD
11	Arecaceae Tipo I		PA	PA		PA					PA
20	Rosaceae *Prunus*		PIO								
21	Rosaceae						PA				
22	Loranthaceae *Struthanthus*									PII	

* Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); PD = pólen dominante (> 45%); PA = pólen acessório (15 - 45 %); PII = pólen isolado importante (3 – 15%); PIO = pólen isolado ocasional (< 3%).

Pólen das famílias Euphorbiaceae (Figura 58, imagem 1) e Asteraceae (tipo *Elephantopus*) (Figura 58, imagem 2) foram dominantes (>45%) apenas nas amostras PR 01 e PR 09, respectivamente (Tabela 17). Porém, com exceção da amostras RS 06 e RS 08, todas as amostras do Estado do Rio Grande do Sul continham o tipo *Elephantopus* como pólen acessório (15-45 %) e pólen isolado importante (3-15%) (Tabela 17; Figura 58, imagem 2).

Nos estados do Paraná e Santa Catarina, o tipo *Eupatorium* (Asteraceae) (Figura 58, imagem 3) apareceu em 50% das amostras, enquanto que no Rio Grande do Sul o tipo *Elephantopus* esteve presente em 80% das amostras (Tabelas 17,18 e 19).

O tipo polínico *Mimosa scabrella*, característica da região de Curitiba PR, apareceu como pólen acessório (15-45%) apenas nas amostras PR 02 (Lapa), PR 06 (União da Vitória) e PR 14 (Curitiba). Entretanto, este tipo polínico não foi encontrado nos demais estados da região Sul (Tabela 17, Figura 58, imagem 8). Os tipos polínicos presente na amostra PR 14 estão representados na Figura 59.

Na amostra PR 11 foi detectado o tipo *Gochnatia* (Asteraceae) (Tabela 17, Figura 58, imagem 4) na categoria pólen acessório e como pólen isolado foi observado o tipo *Eucalyptus* (Myrtaceae) (Figura 58, imagem 7).

As várias espécies da família Asteraeceae encontrados no pólen apícola da Região Sul foram identificada também por meio da microscopia de luz e estão apresentadas na Figura 60.

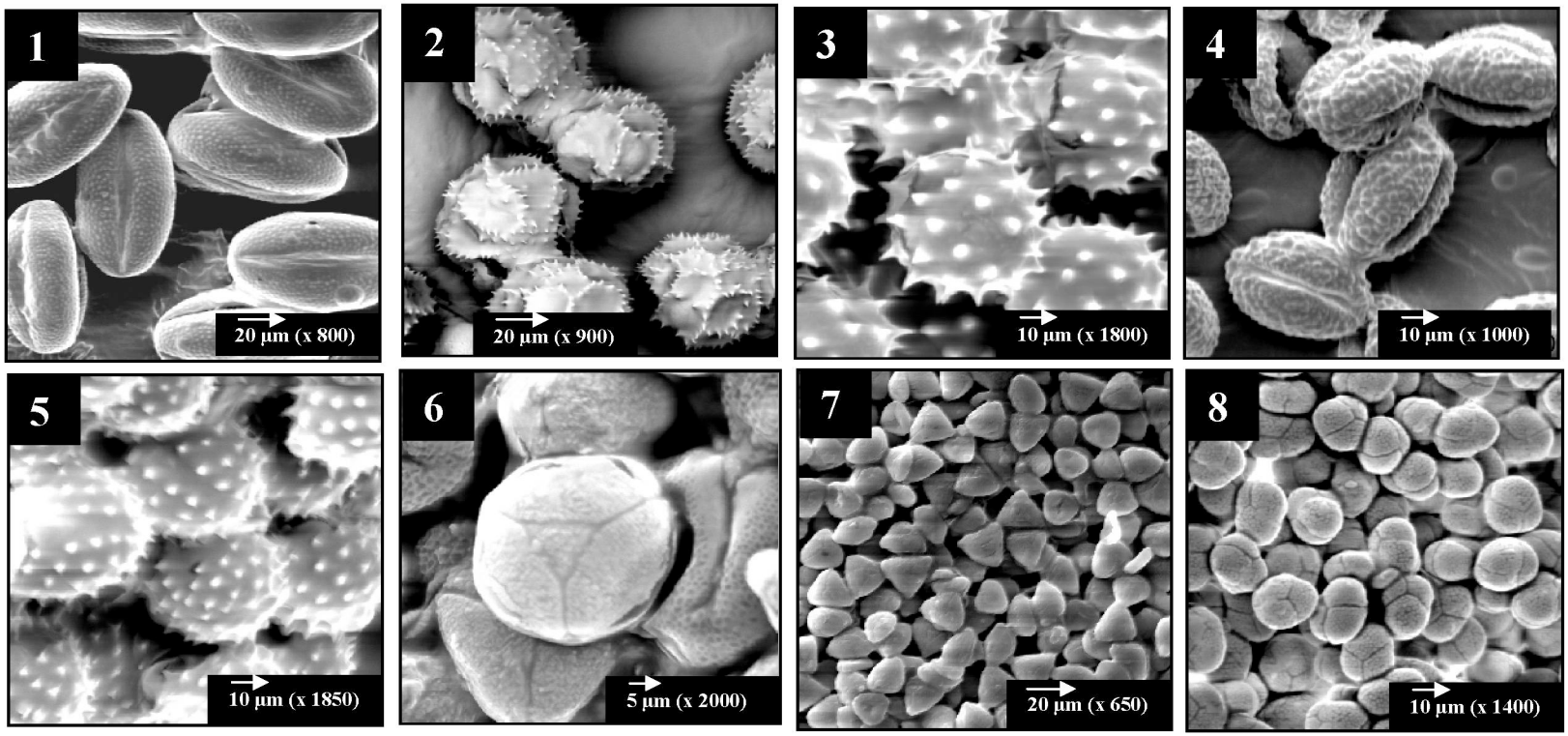


FIGURA 58: TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. IMAGENS MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: 1. EUPHORBIACEAE; 2. ASTERACEAE *ELEPHANTOPUS*; 3. ASTERACEAE *EUPATORIUM*; 4. ASTERACEAE *GOCHNATIA*; 5. ASTERACEAE *BACCHARIS*; 6. SAPINDACEAE *MATAYBA*; 7. MYRTACEAE *EUCALYPTUS*; 8. MIMOSACEAE *MIMOSA SCABRELLA*.

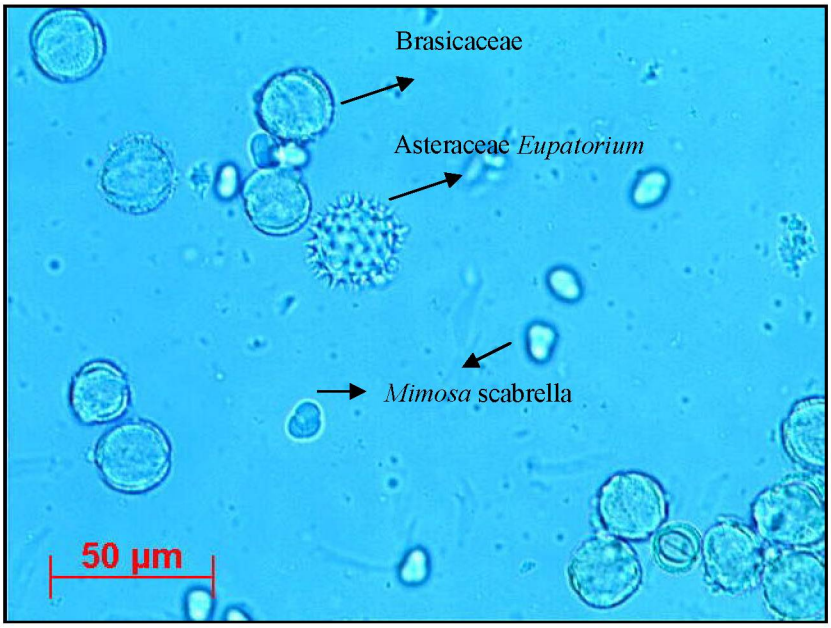


FIGURA 59 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS NA AMOSTRA PR 14. MICROSCOPIA ÓPTICA (400 X).

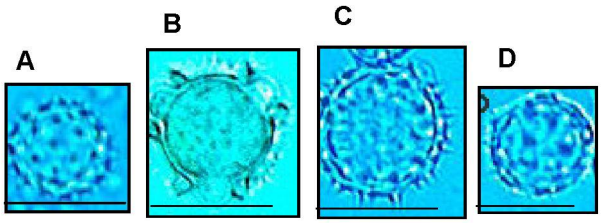


FIGURA 60 - ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE ENCONTRADAS NO PÓLEN APÍCOLA DA REGIÃO SUL. MICROSCOPIA ÓPTICA, 50 µM, 400 X. A: ASTERACEAE *BACCHARIS*; B: ASTERACEAE *ELEPHANTOPUS*; C: ASTERACEAE *EUPATORIUM*; D: ASTERACEAE *GOCHNATIA*.

O Estado do Paraná foi o que apresentou a maior riqueza de tipos polínicos (18 tipos), representando 82% do total identificado neste estudo.

Estes resultados corroboram com os estudos de Ramalho et al. (1991) com *Apis mellifera*, que verificaram a presença de *Allophylus, Baccharis,*

Campomanesia, Cecropia, *Citrus, Eucalyptus, Matayba, Mimosa scabrella, Paspalum* e *Vernonia* em méis do Estado do Paraná, constatando se tratar de um produto basicamente heterofloral, mas nos resultados desse autor se deu uma maior ocorrência de *Eucalyptus*.

O tipo polínico *Brassicaceae* (Figura 59 e Figura 61, imagem 10) foi encontrado em pólens dos três estados da Região Sul do Brasil, porém no Estado do Rio Grande do Sul, ele apareceu em 30% das amostras como pólen dominante (>45%). O tipo *Eucalyptus* foi o dominante, estando presente em 20% das amostras oriundas do Estado de Santa Catarina (Tabela 18). O Estado de Santa Catarina também é um importante produtor de mel, pólen apícola e própolis, porém são escassos os conhecimentos sobre os grãos de pólen encontrado nesses produtos (BARTH, 2004).

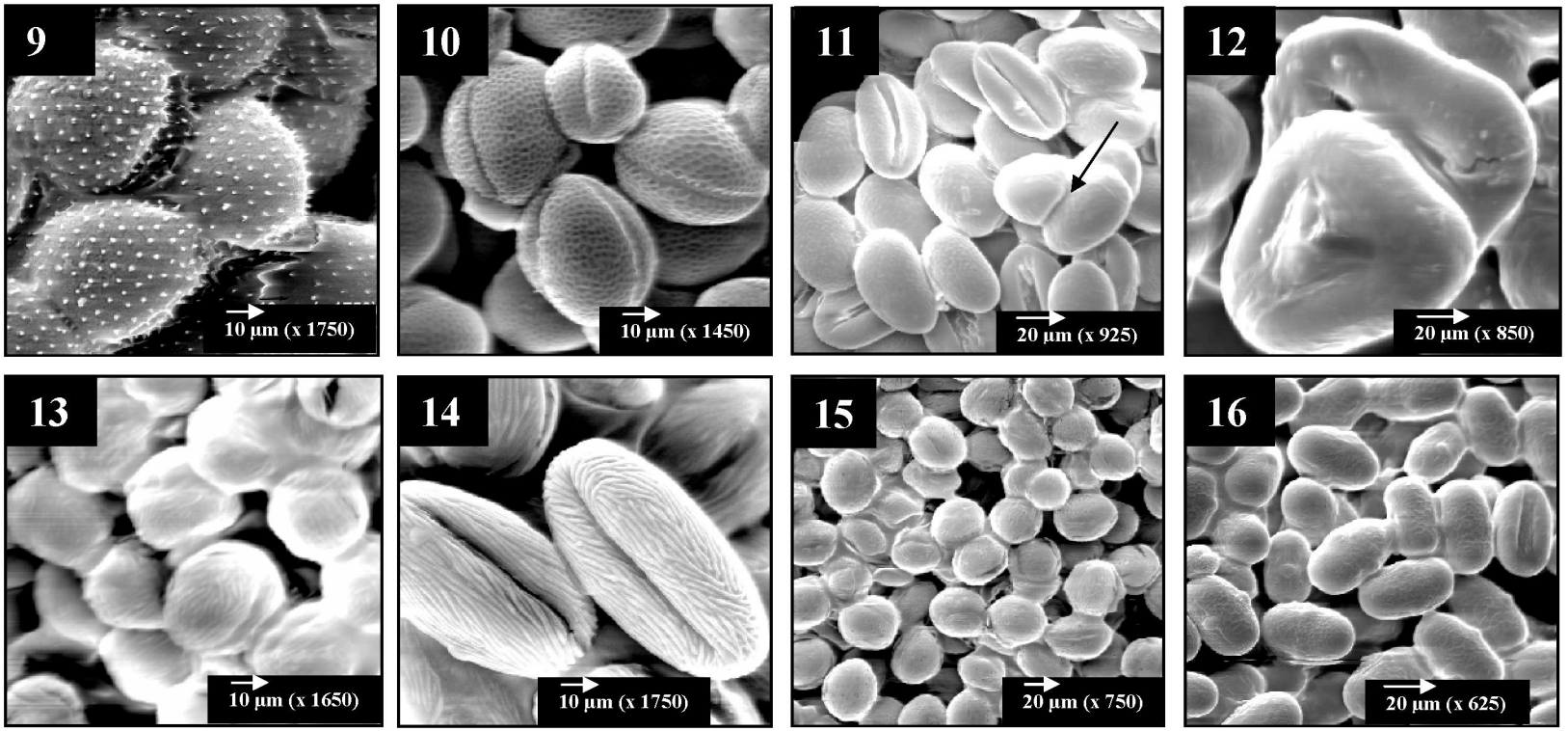


FIGURA 61 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. IMAGENS MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: 9 VERBENACEAE *AEGIPHILA*; 10. BRASSICACEAE; 11. ARECACEAE TIPO I, NA SETA PRETA *PINUS*; 12. ARECACEAE TIPO 2; 13. ANACARDIACEAE *SCHINUS*; 14. ANACARDIACEAE TIPO I; 15. ANACARDIACEAE *ASTRONIUM*; 16. LEGUMINOSAE.

A Bracatinga (*Mimosa scabrella*) é uma planta apícola muito importante no Estado de Santa Catarina (BARTH, 1989) e seu mel foi analisado por Campos (1998) e classificado como mel de melato. O melato contém enzimas derivadas de secreções das glândulas salivares e do intestino de insetos sugadores de plantas e sempre foi classificado como mel inferior ao floral no mercado interno, por ser pouco atrativo devido a sua cor escura e sabor marcante, entretanto a partir dos anos 80 o mercado alemão mostrou-se bastante interessado nesse produto (CAMPOS, 1998).

O pólen das Famílias Leguminosae (Tabela 17; Figura 61, imagem 16) e Arecaceae (Tabela 18, Figura 62, imagem 18) apareceu individualmente em apenas uma amostra dentre as 36 analisadas. Esses tipos polínicos foram encontrados respectivamente na amostra PR 05, coletada na região de Pato Branco e na PR 15, coletada na região de Balsa Nova, ambas no Estado do Paraná.

A amostra RS 06 teve como pólen dominante o *Eucalyptus*, entretanto observou-se como pólen acessório o tipo polínico da família Rosaceae inédito entre as 36 amostras de pólen apícola analisadas (Tabela 19; Figura 62, imagem 21).

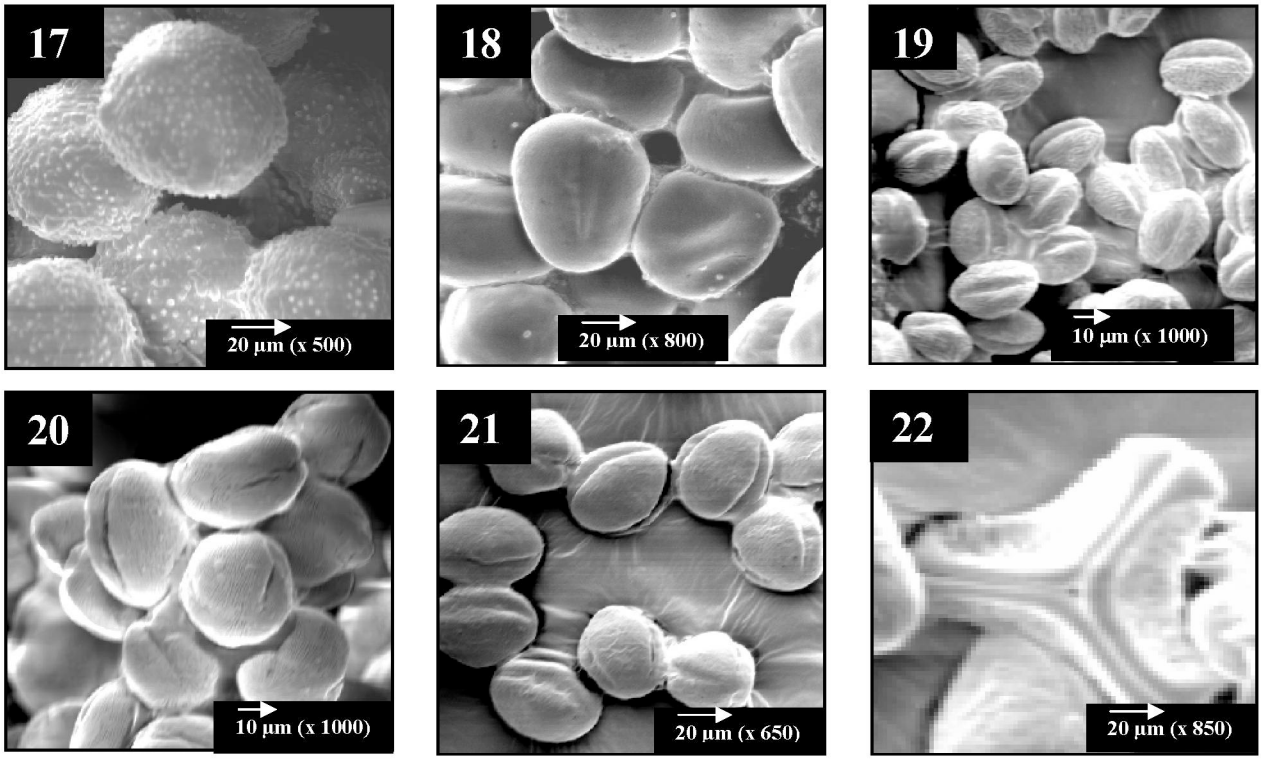


FIGURA 62 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. IMAGENS MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: 17. BORAGINACEAE *CORDIA*; 18. ARECACEAE; 19. ANACARDIACEAE TIPO 2; 20. ROSACEAE *PRUNUS*; 21. ROSACEAE; 22. LORANTHACEAE *STRUTHANTHUS.*

O tipo polínico *Struthanthus* (Loranthaceae) esteve presente apenas como pólen isolado (3-15%) na amostra RS 09 (Tabela 19; Figura 62, imagem 22). Estes tipos polínicos podem ser vistos por microscopia óptica na Figura 63. A Anacardiaceae Tipo 1 pode ser encontrada nas amostras PR 5, SC4 e SC 9 como pólen isolado (Figura 63). No entanto, a Anacardiaceae *Astronium* estava presente no pólen apícola da amostra PR 05 e PR 10 também como pólen isolado (Tabela 17, Figura 64).

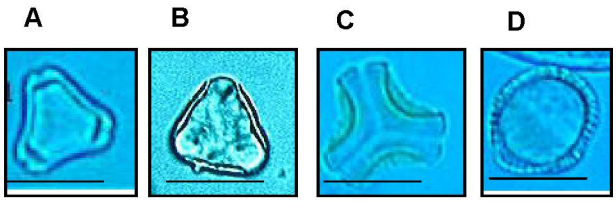


FIGURA 63 - TIPOS POLÍNICOS OBSERVADOS NAS CARGAS DE PÓLEN DA REGIÃO SUL DO BRASIL. MICROSCOPIA ÓPTICA (50 µ, 400 X). A: MYRTACEAE *EUCALYPTUS*; B: ROSACEAE; C: LORANTHACEAE *STRUTHANTHUS*; D: ANACARDIACEAE TIPO 1.

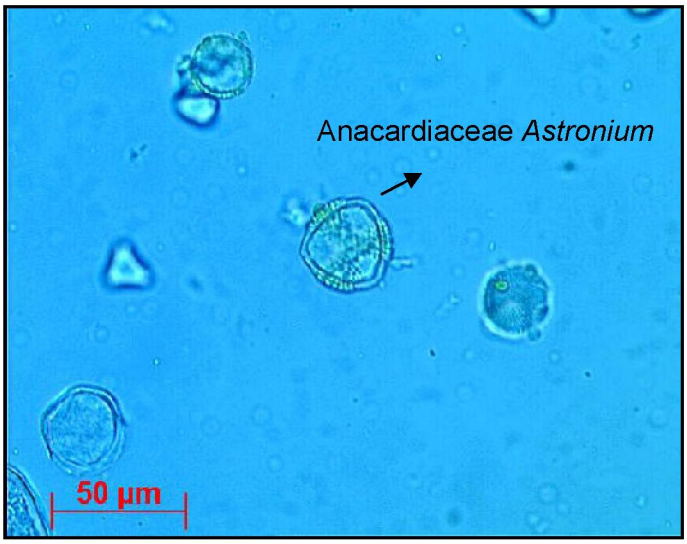


FIGURA 64 - ANACARDIACEAE *ASTRONIUM* PRESENTE NO PÓLEN APÍCOLA DAS AMOSTRAS PR 05 (< 3%) E PR 10 (3 – 15%). MICROSCOPIA ÓPTICA (400 X).

5 CONCLUSÕES

Tomando-se os resultados apresentados ao longo deste estudo, pode-se concluir que 47% das amostras analisadas estavam com teor de umidade superior ao limite estabelecido pela Legislação Brasileira, sendo que 60% dessas amostras eram do estado do Rio Grande do Sul, indicando a necessidade de melhorias no processo de secagem e armazenagem.

O teor de proteína foi bastante homogêneo entre as amostras com média de 20,47± 2,64%. O conteúdo total de proteína variou de 15,04 a 27,69%, sendo que os teores de proteínas das amostras do Estado de Santa Catarina foram estatisticamente diferentes as dos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná.

A composição mineral do pólen apícola mostrou uma grande variação entre as amostras analisadas e os minerais predominantes foram fósforo, potássio, cálcio e magnésio. Com exceção do teor de zinco, os outros minerais das amostras do estado do Paraná apresentaram-se superiores aos teores de minerais dos demais estados da Região Sul. Isso pode ser explicado pela grande diversidade de tipos polínicos encontrados no pólen apícola desse Estado.

O alto teor de proteínas (20,47± 2,64%), açúcares redutores (48,79± 4,16%) e baixo teor de lipídeos encontrados (4,86± 0,65%) fazem do pólen apícola um excelente complemento alimentar.

Os teores de flavonóides totais expressos em equivalentes de quercetina variaram de 2,10 a 28,33 mg de quercetina/g de polen. O polen de São Joaquim SC (SC 03) que apresentou maior teor de compostos fenólicos também apresentou o maior teor de flavonóides (28,33mg de quercetina/g de pólen).

Os valores de EC_{50} para os extratos de pólen variaram de 810 a 4690µg/mL, com um valor médio de 1920µg/mL.

A atividade antioxidante dos extratos de pólen pelo método do DPPH variou de 30,54% a 94,73%, com uma média de 73,44% e por meio do método β-caroteno/ácido linoléico variou de 69,78 a 93,12% com média de 83,60%.

Os antioxidantes comerciais usados na indústria alimentícia, BHT, BHA e α-tocoferol, apresentaram valores de atividade diferentes entre os dois métodos de atividade antioxidante empregados (DPPH e β-caroteno). O pólen apícola do Estado do Rio Grande do Sul apresentou atividade antioxidante estatisticamente igual ao antioxidante natural (α-tocoferol) e ao BHT e superior BHA. O pólen apícola do Estado de Santa Catarina apresentou atividade antioxidante igual ao BHA, porém foi estatisticamente inferior ao α-tocoferol e ao BHT (p <0,05%).

A variabilidade da atividade de seqüestro do radical nas amostras de pólen apícola parece não corresponder ao teor de compostos fenólicos totais, sendo manisfestado pelo baixo coeficiente de correlação (R^2=0,3917). Este mesmo comportamento foi observado com a variável flavonóides totais (R^2=0,3604) no estudo da correlação entre atividade de seqüestro do radical e teor de compostos fenólicos e flavonóides totais.

Não houve uma relação estatisticamente significativa (p>0,01) entre teor de compostos fenólicos (R=-0,05) e flavonóides com a porcentagem de inibição pelo método β-caroteno/ácido linoléico.

Nenhum dos extratos etanólicos de pólen apícola da Região Sul do Brasil apresentaram inibição contra os nove microrganismos testados. Os extratos de pólen apícola não se mostraram inibitórios nem bactericidas nas concentrações testadas, para os microrganismos utilizados neste experimento.

A alta atividade antioxidante dos EPE SC 03 e RS 09 podem ser devido à presença dos flavonóides rutina e miricetina, os quais foram identificados pela técnica de CLAE-DAD.

A atividade de seqüestro do radical DPPH aumentou significativamente nos extratos de pólen apícola purificados com resina hidrofóbica. Apesar do teor de compostos fenólicos totais ter diminuído em torno de duas vezes, a resina Amberlite XAD2 proporcionou uma adsorção de compostos fenólicos de efetiva atividade antioxidante, podendo ser um tratamento indicado na caracterização de compostos fenólicos do pólen apícola.

O ácido hexadecanóico, metil éster, o ácido 9,12-octadecadienóico, metil éster e o ácido 9,12,15-octadecatrienóico identificados por CG-EM estavam presentes nas amostras de pólen apícola analisadas.

Os ácidos fenólicos encontrados pela técnica de CG-EM nas três amostras analisadas podem ser responsáveis pela alta atividade

antioxidante do pólen apícola, entretanto, muitos compostos não foram identificados por esta técnica com a derivatização com diazometano.

Com exceção da amostra PR 12, todas as outras (35 amostras de pólen apícola) foram classificadas como heteroflorais. O pólen apícola PR 12, oriundo de um dos apiários de União da Vitória (PR) tinha na sua composição exclusivamente o pólen do tipo *Baccharis* (Asteraceae).

Foram encontrados 22 tipos polínicos nas 36 amostras de pólen apícola analisados. Os tipos polínicos encontrados em maior número nas amostras de pólen apícola da Região Sul foram os da família Asteraceae.

O tipo polínico *Brassicaceae* foi encontrado em pólens dos três estados da Região Sul do Brasil, porém no Estado do Rio Grande do Sul, ele apareceu em 30% das amostras como pólen dominante (>45%). Porém, o tipo *Eucalyptus* foi o dominante, estando presente em 20% das amostras oriundas do Estado de Santa Catarina. Com exceção da PR 13 todas as amostras do Estado do Paraná continham pólen da família Asteraceae.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1) Estudar os efeitos bioativos do pólen apícola em função da sua sazonalidade;

2) Obter frações distintas por meio de coluna aberta de sílica-gel (LH20, sefadex etc);

3) Testar a atividade biológica das diferentes frações, analisando se há um efeito sinergístico;

4) Isolamento de Compostos com Atividade Antioxidante por CLAE preparative;

5) Avaliação da atividade antioxidante dos compostos isolados;

6) Identificação química dos compostos isolados por CG-MS, RMN;

7) Testar os EPE como antioxidante em vários tipos de alimentos.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. E.; TIRZITE, D.; TIRZITE, G.; ROOZEN, J.P. Antioxidant activity of 1,4-dihydropyridine derivatives in β-carotene-methyl linoleate, sunflower oil and emulsions. **Food Chemistry**, v. 66, n.2, p.189-195, 1999.

ABDILLE, M. H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n.4, p.891-896, 2005.

ADELMANN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. 2005. 186p. Universidade Federal do Paraná, Ciências Farmacêuticas, Curitiba, PR, 2005. **Dissertação de Mestrado**.

AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.24, p. 7286-7292, 2004.

ALCARÁZ, L. E.; BLANCO S.E.; PUIG, O.N.; TOMAS, F.; FERRETTI, F.H. Antibacterial activity of flavonoids against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Theoretical Biology**, v. 205, n. 2, p. 231-240, 2000.

ALENCAR, S. M. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis melífera* africanizada de diferentes regiões do Brasil. 2002, 156p. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002. **Tese de doutorado**.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES-GUSMÁN, J.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia,* fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909 - 915, 2005.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T. L. C CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

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

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**, v.18, p.105-111, 2005.

ALVAREZ, M. A.; ZARELLI, V. E. P. ; PAPPANO, N. B.; DEBATTISTA, N. B., Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli.* **Biocell**, v. 28, p.31-34, 2004.

ANDRADE, P. B.; AMARAL, M. T.; ISABEL, P.; CARVALHO, J. C.M.F.; SEABRA, R. M.; CUNHA, A. P. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. **Food Chemistry**, v.66, n.4, p.503-510, 1999.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183–198, 2002.

AOAC, Association of Analytical Chemistry, Official Methods of Analysis of AOAC International 17 [a] Edição. Gaithersburg, 2000.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v.11, p.419-421, 2000.

ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limit the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.45 – 49, 2004.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 32, p.671- 683, 1994.

ASOLINI, F.C.; TEDESCO, A.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal Food and Technology**, v.9, p. 209-215, 2006.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n.1, p. 27-36, 2005.

ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WATERMARCK, T.; ALI–VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v.180, p.151 – 167, 2003.

AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; SOUZA, S. R.; DUTRA, V.M.L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, v.80, n.2, p.249-254, 2003.

BANNWART, G.C.M.C.; TOLEDO, M.C.F. Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ. **Boletim do SBCTA**, v.33, p.245-255, 1999.

BARANOWSKI, J. D.; NAGEL, C. W. Antimicrobial and antioxidant activities of alkyl hydroxycinnamates (alkacins) in model systems. **Canadian of Institute Food Science and Technology Journal**, v.17, p. 79 – 85, 1984.

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

BARRETO, L.M.R.C. Qualidade do pólen brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14, 2002, Campo Grande-MS. **Anais**. Campo Grande-MS, p.283-288, 2002.

BARTH, O.M. **O polen no mel no brasileiro**. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 151p., 1989.

BARTH, O.M. Pollen in monofloral honeys from Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.29, p.89-94, 1990.

BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L. Concentração de pólen em amostras de mel de abelhas monofloral do Brasil. **Geociências. Revista da Universidade de Garulhos,** n.esp., p.173-176, 2000.

BARTH, O.M. Melissopalynology in brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v.61, p.342-350, 2004.

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

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, p. 561–571, 2004.

BELL, R.R.; THORNBER, E.J.; SEET, J. L. L.; GROVES, M. T.; HO, N. P.; BELL, D. T. Composition and Protein Quality of Honeybee-Collected Pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla.* **Journal of Nutrition**, v.113, n.12, p. 2479-2484, 1983.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Lipids. Food chemistry**, Berlin, Springer Verlag, 203p., 1987.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyhaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, p.105-110, 1984.

BLAIR, J. E.; BORMAN, E. K.;BYNOE, E. T.; UPDYKE, E.L.; WILLIANS, R. E. O. **Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation**. Atlanta, G. A: United States Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, 1958.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa n.3 de 2001 de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade, de apitoxina, de cera de abelha, de geléia real, de geléia real liofilizada, de pólen apícola, de própolis, de extrato de própolis. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa. Acesso em: 12/08/2006.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.

BREYER. **O pólen apícola.** Disponível em: http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura_polen.htm. Acesso em: 20 de setembro de 2007.

BUCK A.C.; REES, R.W.; EBELING, L. Treatment of chronic prostatitis and prostatodynia with pollen extract. **Brazilian Journal Urology**, v.64, p.496–499, 1989.

CAMARGO, J. M.F. **Manual de apicultura**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda, 1972.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v.29, p.219 - 224, 1997.

CAMPOS, G. Melato no Mel e sua Determinação Através de Diferentes Metodologias.1998, 178p. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1998. **Tese de Doutorado**

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant activity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, p. 43 - 49, 1996.

CAMPOS, M.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, A.P.D; An approach to the characterisation of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n.3, p.181-185, 1997.

CAMPOS, M.G, WEBBY, R.F., MARKHAM, K.R., MITCHELL, K.A., CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.3, p.742-745, 2003.

CARPES, S.T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Study of preprarations of bee pollen extracts. Antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1818-1825, 2007.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidaions induced by CBrCl3 in liver, lung, heart, and spleen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n.3, p.854-858, 1996.

CHEN, H.; ZUO, Y. Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit. **Food Chemistry**, v.101, n.4, 1357-1364, 2007.

CHEN, H.; ZUO, Y.; DENG, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic copounds in cranberry juice by high-performance liquid cromatography. **Journal of Cromatography A**, v.913, p.387-395, 2001.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168. 2002.

CHU, T.Y.; CHANG, C.H.; LIAO, Y.C.; CHEN, Y.C. Microwave-accelerated derivatization processes for the determination of phenolic acids by gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.54, p.1163-1171, 2001.

COLLIN, S.; VANHAVRE, T.; BODART, E.; BOUSETA, A. Heat treatment of pollens: impact on their volatile flavor constituents. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.2, p.444-448, 1995.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v.7, p.66–76, 1996.

CRESPY, V.; MORAND, C. ; MANACH, C. ; BESSON, C. ; DEMIGNE, C. ; REMESY, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. **American Journal of Physiology**, v.277, p.120-126, 1999.

D'ARCY, B. **Antioxidants in Australian Floral Honeys – Identification of health-enhancing nutrient components**. Rural Industries Research and Development Corporation, 2005. Disponível em: http://www.rirdc.gov.au. Acesso em: 15 de novembro de 2007.

DAPKEVICIUS, A.; VENSKUTONIS, R.; VAN BEEK, T.A.; LISSEN, J.P.H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v.77, p.140-146, 1999.

DENISOV, E. T.; AFANAS EV, I. B. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group,. 981p. 2005.

DESCHNER, E. E.; RUPERO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H. L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanolinduced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v.7, p.1193- 1196, 1991.

DEWICK, P. M. The biosynthesis os shikimate metabolites. **Natural Products Report**. Cambridge, v. 15, n. 1, p. 15-58, 1998.

DIMMOCK, J. R. et al. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal and Chemistry**, v. 6, p. 1125-1149, 1999.

DONADIEU, D.Y. **El pollen: Terapéutica Natural**, 4ª Ed. Paris: Librairie Maloine, 32p. 1979.

DONAVAN, J.L. ; BELL, J.R. ; KASIM-KARAKAS, S. ; GERMAN, J.B.; WALZEM, R.L.; HANSEN, R.J. WATERHOUSE, A.L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1662-1668, 2001.

DOWD, L.E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analist Chemical**, v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

DUDOV, I.A.; MORENETS, A.A.; ARTIUKH, V.P.; STARODUB, N.F. Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load. **Ukraïns'kyĭ biokhimichnyĭ zhurnal**, v. 66, n.6, p.91-93, 1994.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; SOLER, C.; GARCÍA-VIGUERA, C.; ORTIZ, A.; TOMÁS-LORENTE, F. A simple extractive technique for honey flavonoid CLAE analysis. **Apidologie**, v.25, n.1, p.21-30, 1994.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biology and Chemistry**, v.226, p.497–509, 1957.

FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; LACERDA, C. A.; LANÇAS, F.M. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: New Jersey: **Humana press**, p. 203-218, 2004.

FRANKEL, E.N. **Lipid Oxidation.** The Oily Press, Dundee, 1998.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.

FRANKEL, E.N.; HUANG S.W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.5, p.1054-1059, 1994.

FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G.J. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.8, p.3597–3604, 2000.

FUNARI, S.R.C. ORSI, R.O; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; CURI, P.R.; DIERCKX, S. M.A.G.; FUNARI, A.R.M. Composições bromatológica e mineral do pólen coletado por abelhas africanizadas (Apis mellifera L.) em Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.11, n.2, p.88-93, 2003.

FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; CURI, P.R.; PEROSA, J.M.Y. Coleta de pólen e produção de mel e própolis em colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Boletim Ind. Animal**, v. 55, 189-93, 1998.

FÜZFAI, ZS; MOLN'AR-PERL, I. Gas chromatographic–mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.88–101, 2007.

GADOW, A. ; JOUBERT,E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α- tocopherol, BHT, and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.3, p.623-638, 1997.

GARCÍA, M.; PÉREZ-ARQUILLUE, C.; JUAN, T.; JUAN, M.I.; HERRERA, A. Note: Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science Technology International**, v.7, n.2, p.155-158, 2001.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n.4, 2002.

GORISTEIN, S.; DRZEWIECKI, J.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; NAJMAN, K.; JASTRZEBSKI, Z.; ZACHWIEJA, Z.; BARTON, H.; SHTABSKY, B.; KATRICH, E.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of the bioactive compounds and antioxidant potentials of fresh and cooked Polish, krainian, and Israeli garlic. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n.7, p.2726-2732, 2005.

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v.8, n.1, p.61-69, 1990.

GREENBERGER, P. A.; FLAIS, M. D. MICHAEL, J. M.D. Bee pollen-induced anaphylactic reaction in an unknowingly sensitized subject. **Allergy, Asthma & Immunology**, v.86, n. 2, p. 239-242, 2001.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Nature Publishing Group, p. 1-7, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Rradicals in Biology and Medicine.** 3 ed. Clarendon, Oxford, NY.254p, 2000.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n.7, p. 601-617, 1995.

HAMILTON – MILER, J. M. Anticariogenic properties of tea (*Camellia sinensis).* **Journal of Medicine and Microbiology**, v. 50, p. 299 – 302, 2001.

HARBORNE , J.B. **Procedures and measurement of total phenolics.** In: Methods in Plant of Biochemistry. Harbone J.B. Ed. Academic Press, London, UK., p.1-28, 1989.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. Champman and Hall, London, 295 p, 1973.

HARBONE, J. B. **Ultraviolet spectroscopy of polyphenols. Methods in polyphenol chemistry.** J.B Pridham. In: Proceedigs of plant phenolics group symposium, 1964.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HERTOG, M.; FESKENS, E.; HOLLMAN, P.; KATAN, M.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Lancet**, v.342, p. 1007-1011, 1993.

HODGSON, J. M. ; MORTON, L.W. ; PUDDEY, I.B. ; BEILIN, L.J. ; CROFT, K.D. Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in

humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.3, p.418-421, 2000.

HOGG, J.S.; LOHMANN, D.H.; RUSSELL, K. E. The kinetics of reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with phenols. **Canadian Journal of Chemical**, v.39, p.1588-1594, 1961.

HUANG, S-W.; FRANKEL, E.N.; SCHWARZ, K.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J.B. Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n.10, p.2951-2956, 1996.

IKEGAKI, M. Determinação de qualidade de propolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis, 74p, 2001. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001. **Tese de Doutorado**.

INAMORI, Y. et al. Antibacterial activity of two chalcones, xantroangelol and 4 - hidroxydericin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 1604-1605, 1991.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v.1, p.21-43,1985.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, v.73,n.2, p.245-250, 2001.

KANNER, J.; FRANKEL, E. N.; GRANIT, R.; GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E. Natural antioxidants in grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.1, p.64-69, 1994.

KATSUBE, T.; TABATA, H.; OHTA, Y.; YAMASAKI, Y.; ANUURAD, E.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Screening for antioxidant activity inedible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.8, p.2391-2396, 2004.

KEKRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury. **Critical Reviews Toxicology**, v.23, p.21- 48, 1993.

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

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. Bioscience **Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 367-369, 1997.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J. A. ; AMBROSANO, G. M. B. ; MURATA, R. M.; YATSUDA, R. ; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y.K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, v.41, n.3, p.192-196, 2000.

KORU, O.; TOKSOY, F.; ACIKEL, C. H.; TUNCA, Y. M.; BAYSALLAR, M.; GUCLU, A. U.; AKCA, E.; TUYLU, A. O.; SORKUN, K.; TANYUKSEL, M.; B. SALIH. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, v.13, p.140-145, 2007.

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

KUHNLE, G.;CHOWRIMOOTOO, G..; SCHROETER, H. ; DEBNAM, E.S. ; KAILA, S. ; RICE-EVANS, C. ; HAHN, U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucoronide. **Biochemistry Biophysic Resourch Communitary** , v.272, p.212-217, 2000.

KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R. E POPOV, S. Antibacterial, antuifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p.235-240, 2000.

KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V., MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v.85, n.4, p.633-640, 2004.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, n.3, p.329–339, 2004.

LARRAURI, J. A; RUPEREZ, P; CALIXTO, F. S; Antioxidant activity of wine pomace. **American Journal Enology and Viticultural**, v.47, n.4, p.369-372, 1996.

LARRAURI, J. A; SÁNCHEZ-MORENO, C; SAURA-CALIXTO, F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.46, n.7, p.2694-2697, 1998.

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

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic Xylaria sp. from Ginkgo biloba. **Food Chemistry**, v.105,n.2, p.548–554, 2007.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. **Flavonóides**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 17, p. 18-22, 2000.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO,A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology. **Bee World**, v. 51, n.3, p.125-138, 1970.

LU, L.C.; CHEN, Y.W.; 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.1, p.277–282, 2003.

MACHEIX, J.J.; SAPIS, J.C.; FLEURIET, A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. **Critical Review Food Science and Nutrition**, v.30, n.1, p.441-486, 1991.

MAGALHÃES, E. O. **Produção de pólen apícola**. Magalhães Ed., Itabuna, BA, CD ROOM, 2005.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho:estrutura e ação antioxidante. **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v.22, n.2, p. 233-252, 2004.

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

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists´ Society**, v.45, p. 594-598, 1968.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n.5, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, p.13-18, 1998.

MARQUES, A. N. **Cartilha de apicultura Pólen-Cera**. V.5. Ed. MEG (Mário Editora e Gráfica Ltda), Florianópolis - SC, 72 p., 2000.

MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A ; WILKINS, A.L.; DALDY, J.A; LU, Y. CLAE and CG-MS identification of the major organic constituints in new Zealand propolis. **Phytochemistry**, v.42, n.1, p. 205-211, 1996.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by CLAE with diode-array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.13, p.3660-3667, 2002.

MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.8, p.2824-2829, 1997.

MAZZA, G. **Functional Foods – Biochemical and Processing Aspects**. Technomic Publishing Co., Inc, Lancaster, 460 p., 1998.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**, CRC Press, Boca Raton, FL,180p., 1993.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G.; Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n.3, p.571-577, 2005.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.36, n.1, p. 1-11, 2002.

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. **Phytotheraphy Research**, v.15, p.127–130, 2001.

MIDDLETON, E. J. Some effects of flavonoids on mammalian cell systems, *in* **Flavonoids and Bioflavonoids**, Farkas, L., Gabor, M., and Kallay, F., Eds., Elsevier, Amsterdam, p.381 – 388, 1986.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists´ Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v.82,n.3, p. 409-416, 2003.

MIZRAHI, A.; LENSKY, Y.; **Bee products: properties, applications and apitherapy**. Plenum Press: New York, p.213-220, 1997.

MIYAKE,Y.; YAMAMOTO, K. ; OSAWA, T. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* Burm.f.) by human intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.10, p.3738 – 3742, 1997.

MC GREGOR, S.E. **Insect Pollination Of Cultivated Crop Plants Originally**.Disponível em http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/index.html). Acesso em: 16/07/2006.

MODRO, A. F. H.; MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P. ; MEIRA NETO, J. A. A. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1057-1065, 2007.

MORAZZONI, P.; LIVIO, S.; SCILLINGO, A.; MALANDRINO, S. Vaccinum myrtillus anthocyanosides pharmokinetics in rats. **Arzneimittel Forschung**, v.41, p.128-131,1991.

MORETI, A.C.C.C. **Coleta e utilização do pólen pelas abelhas**. Curso de produção de pólen. Pindamonhangaba, Instituto de Zootecnia/CATI, 32p., 1995.

MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, V.C.; RODRIGUES, R.R. Atlas do pólen de plantas apícolas. Papel Virtual Editora, 88 p, 2002.

NAMIKI, M. Anti-oxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.29, p.273-300, 1990.

NEPOMUCENO, M.F.; MAMEDE, M.E.O.; MACEDO, D.V.;ARMINDO, A.A.; PEREIRA, L.S.; TABAK, M. Antioxidant effect of dipyridamole and its derivate RA-25 in mitochondria: correlation of activity and location in the membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1418, p.285-294, 1999.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18, n.6, p.524-525, 2002.

O'CONNELL J. E.; FOX, P. F. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v.11, p.103-120, 2001.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358, 1979.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em Medicina**. Efrain Olszewer. 2. ed. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 204p, 1995.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C. H.; Katan, M.B. Bioavailabilities of quercetin 3-glucoside and querecetin-4'-glucoside do not differ in humans. **Journal of Nutrition**, n.130, p.1200 – 1203, 2000.

OPLETALOVÁ, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. **Ceská a Slovenská Farmacie**, v. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.

ÖZCAN, M.; ÜNVER, A.; CEYLAN, D.A.; YETISIR, R. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. **Nahrung-Food**, v.48, p.188-194, 2004.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BATISDA, J.;nROSAS-ROMERO, A.; FLERLAGE, N.; BURILLO, J.; CODINA, C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.23, p.6882-6890, 2002.

PARK, Y. K.; HIKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of preparations. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n.11, p.85-90, 1998.

PARK, Y. K.; HIKEGAKI, M., ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.3, 1998.

PARK, Y. K.; KOO, M. HIKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, n.1, p. 97-106, 1997.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n.4, p. 1235-1259, 1995.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.5, p.1100–1103, 2004.

PAULINO, N. Disponível em: http://www.prodapys.com.br/br/pdp_pesq_51.htm Acesso em: 22 out. 2004.

PEKKARINEN, S.S.; STOCKMANN, H.; SCHWARZ. K.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.L. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.8, p.3036-3043, 1999.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R. M. S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova,** São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321 -326, 2002.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary, occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research,** New York, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PIERSON, M. D.; REDDY, N. R. Inhibition of Clostridiun botulinium by antioxidants and related phenolic compounds in comminuted pork. **Journal Food Science**, v.47, p. 1926 – 1929, 1982.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p. 1035-1042, 2000.

PORTER, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. Toxicology e Industrial Health, v.9, p.93-122, 1993.

PORTER, W.L. **Recent trends in food applications of antioxidants.** In: Autoxidation in Food and Biological Systems. Ed. Simic Plenum, New York, 295-365 p., 1980.

PRAT, D.E.; HUDSON, B.J.F. Natural antioxidants not exploited commercially, in Food Antioxidants. Ed. Elsevier Applied Science, London, p.171-192, 1990.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G.-J.E.; KOMAITIS, M. RP-CLAE analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.4, p.1190 -1195, 2005.

PROESTOS, D.; SERELI, D.; KOMAITIS, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-CLAE and GC-MS. **Food Chemistry**, v.95, n.1, p.44-52, 2006.

RAGGI, M.A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; MUSIANI, D.; MARINI, M. CLAE detrmination of glutathione and other thiols in human mononuclear blood cells. **Biomedical Chromatography**, v.12, p.262-266, 1998.

RAMALHO, M; KLEINERT-GIOVANNINI, A; IMPERATRIZ-FONSECA, V L (1989) Utilization of floral resouces by species of *Melipona* (Apidae, Meliponinae): floral preferences. **Apidologie**, v.20, p.185-195.

REBELLO, J.M. Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas, 130p. 2005. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. **Dissertação de Mestrado**.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**, v. 234, p. 279-283, 1994.

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

ROEDIG-PENMAN, A.; GORDON, M.H. Antioxidant properties of myricetin and quercetin in oil and emulsions. **Journal American Oil Chemical Society**, v.75, p.169-180, 1998.

ROULSTON, T.H.; CANE, J.H.; BUCHMANN, S.L. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen pistil interactions, or phylogeny? **Ecology Monography**, v.70, p.617–643, 2000.

RUGENDORFF, E.W.; WEIDNER, W.; EBELING, L. Results of treatment with pollen extract (cernilton N) in chronic prostatitis and prostatodynia. **Brazilian Journal Urology**, v.71, p.433–438, 1993.

SALOMÉ, J. A.; SALOMÉ, L. G. Manual prático de produção de pólen apícola. Florianópolis, Secretaria do Estado do Desenvolvimento Rural e da Apicultura (EPAGRI), 54p, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, v. 329, p. 29-40, 2002.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2073S-2085S, 2000.

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

SERRA BONVEHÍ, J.; SOLIVA TORRENTÓ, M.; CENTELLES LORENTE, E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.9, n.4, p.1848-1853, 2001.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Capítulo 1. Biosynthesis. Classification, and Nomenclature of Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press Ed. 558 p., 2004.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Review Food Science and Nutrition**, v.32, p. 67-103, 1992.
SHOSKES, D. A. Phytotherapy In Chronic Prostatitis, **Urology**, v.60, p.35–37, 2002.

SILVA, T.M.S.; CÂMARA, C.A.; LINS, A.C.S.; BARBOSA-FILHO, J.A.; SILVA, S.E.M.; FREITAS, B.M.; SANTOS, F.A.B. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.507–511, 2006.

SIMÕES, C. M.C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. UFSC/ Ed. UFRGS, 833p., 2001.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-149, 1965.

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

SIVAM, G. **Analysis of Flavonoids. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Editora WJ Hurst. CRC Press, Baca Raton, 2002.

SOARES, D. G. Avaliação da Capacidade Antioxidante do Butil hidroxitolueno, Propil galato, Resveratrol, Vitamina C e Vitamina E em Sistemas Biológicos e Químicos, 2001, 178 p. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS. **Dissertação de Mestrado.**

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes, **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOARES, D.G., ANDREAZZA, A.C., SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol and vitamins C and E against ABTS, DPPH and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.10, p. 1077 – 1080, 2003.

SOMERVILLE, D.C.; NICOL, H.I. Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and note on laboratory disparity. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.46, p.141-149, 2006.

SOMERVILLE, D.C. Lipid content of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45, p.1659-1661, 2005.

SOMOGY, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, p. 61-68, 1945.

SORTWELL, D. El uso de antioxidantes BHA y BHT. **Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.5, p. 9-11, 1995.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen. Biology Biochemistry Management.** Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 85p, 1974.

STROHL, M. J.; SEIKEL, M. K. Polyphenols of pine: a survey. **Phytochemistry**, v. 4, n.3, p. 383-399, 1965.

TIOSAM. Estames com anteras evidentes, carregadas de pólen. Disponível em: www.tiosam.com/enciclopédias. Acesso em: 20 de setembro de 2007.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; TOMÁS-LORENTE, F.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C. Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. **Journal Science Food Agricultural**, v. 47, p.337-340, 1989.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; BLAZQUEZ, M.A.; GARCIA-VIGUERA, C.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENT, F. A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. **Phytochemistry Analysis**, v.3, p.178-181, 1992.

VAN BEEK, T.A. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. **Journal of Cromatography A**, v.967, p.21-55, 2002.

VELIOGLU, Y.S. ; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMACH, B.D.; Antioxidant activity and total phenolics of selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.10, p.4113-4117, 1998.

VERHAGEN, H.; BECKERS, H.H.G.; COMUTH, P.A.; MAAS, L.M.; HOOR, F.T.; HENDERSON, P.T.; KLEINJANS, J.C.S. Disposition of single oral doses of butylated hydroxytoluene in man and rat. **Food Chemistry Toxicology**, v.27, n.12, p.765-772, 1989.

VRIES, J. H. M.; HOLLMAN, P. C. H. ; VAN AMERSFOOT, I.; OLTHOF, M. R.; KATAN, M. B. Red wine is poor source of bioavailable flavonols in mem. Journal of Nutrition, v.131, p. 745 – 748, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer–Verlag, 394p. , 1984.

WARNER, K. **Measuring tocopherol efficacy in fats and oils**. In *Antioxidant Methodology*; Aruoma, O. I., Cuppett, S. L., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL, p. 223-233, 1997.

WESH, S. O.; MARSTON, R. M. **Nutritional Bioavailability of Zinc**, Inglett, G. E., Ed.: ACS Symposium Series 210; American Chemical Society: Washington, DC, Chapter 2, 1983.

WEI, H.; TYE, L.; BRESNICK, E.; BIRT, D. F. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. **Cancer Resourch**, v.50, p.499-502, 1990.

WERTZEN, G. Short comings of current strategy for toxicity testing of food chemicals antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v.28, n.11, p. 743-745, 1990.

WIESE, H. **Novo manual de apicultura**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS, 292 p, 1995.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULUS, M.J.; WHYSNER, J. Safety assessment of butyladed hydroxyanisole and butyladed hydroxytoluene as antioxidant food additives. **Food Chemistry and Toxicology**, v.37, p. 1027-1038, 1999.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.7, p. 838-849, 2004.

WILT, T., MAC DONALD, R., ISHANI, A, 2000. **Cernilton for benign prostatic hyperplasia**. Cochrane Database Systematic Reviews. Disponível em: https://www.farrlabs.com. Acesso em em 12 de março de 2007.

YAGI, K. Lipid peroxides and human diseases. **Chemistry and Physical Lipids**, v.45, p. 337-351, 1987.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAO, J. CLAE method for evaluation of the fre rdaical-scavenging activity of foods by using DPPH. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p.1201-1204, 1998.

YEN, G. C.; DUH, P. D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.3, p.629-632, 1994.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.8, p. 4083-4089, 2001.

YAO, L.H. Flavonoids and other polyphenols in Australian tea and honey. 2002, 165p. The University of Queensland. Sta. Lucia, Queensland, Australia, 2002. **PhD thesis**.

YAO, L.; JIANG, Y.; D'ARCY, B.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; CAFFIN, N. A.; Raymont, K. Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian Eucalyptus honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.2, p. 210 – 214, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.49,n.11, p. 5165-5170, 2001.

ZUO, Y.; Wang, C.; Zhan, J. Separation, characterization and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.13, p.3789-3794, 2002.

A N E X O 1.

STUDY OF PREPARATIONS OF BEE POLLEN EXTRACTS, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Ciênc. agrotec., Lavras, v. 31, n. 6, p. 1818-1825, nov./dez., 2007

STUDY OF PREPARATIONS OF BEE POLLEN EXTRACTS, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Estudo das preparações de extratos de pólen apícola, atividade antioxidante e antibacteriana

Solange Teresinha Carpes[1], Rosicler Begnini[2], Severino Matias de Alencar[3], Maria Lúcia Masson[4]

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antioxidant activity, phenolic content and antibacterial activity of pollen extracts obtained with different concentrations of ethanol. Each extraction condition (ethanol solutions from 40 to 90%) had a different effect in the phenolic compounds content. Although, the pollen extract obtained at 60, 70 and 80% of ethanol showed relatively higher levels of phenolic compounds (>10 mg/g) and did not present statistical significant difference between the extraction conditions. The amount of total phenolics ranged from 3.6 to 8.1 and 6.6 to 10.9 mg GAE/g for Alagoas state and Parana state pollen, respectively. The higher value for antioxidant activity index was 83.30% for the pollen from Alagoas state and 81.15 % for Parana state pollen. The highest degree of antioxidant activity was found in the extraction at 60% of ethanol solution for Parana state pollen, which also showed the highest concentration of polyphenol compounds. *Staphylococcus aureus* was inhibited by the ethanolic extract of Alagoas state pollen in all the concentrations of solvent, except the ethanolic extract of pollen at 90%. The extract at 60% of ethanol solution (Parana sample) inhibited *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella sp.*

Index terms: Pollen, antioxidant, antibacterial activity.

RESUMO

Objetivou-se, neste estudo determinar compostos fenólicos, a atividade antioxidante a antibacteriana dos extratos etanólicos de pólen, obtidos com diferentes concentrações de etanol. As diferentes condições de extração (etanol de 40 a 90%) apresentaram diferentes efeitos no conteúdo dos compostos fenólicos extraídos. Os extratos de pólen obtidos com etanol a 60, 70 e 80% apresentaram maiores níveis de compostos fenólicos (>10 mg/g) e não apresentaram diferenças estatísticas entre essas condições de extração. A quantidade de compostos fenólicos nos extratos de pólen variou de 3.6 a 8.1 e 6.6 a 11 mg de equivalente em ácido gálico por g de pólen (GAE), para os estados de Alagoas e Paraná, respectivamente. Os maiores índices de atividade antioxidante para o pólen do estado de Alagoas foi de 83.30% e 81.15 % para o pólen do estado do Paraná. O pólen do estado do Paraná extraído com etanol a 60%, apresentou o maior índice de atividade antioxidante e também a maior concentração de compostos fenólicos. A bactéria *Staphylococcus aureus* foi inibida pelo extrato etanólico do pólen de Alagoas, em todas as concentrações, exceto no extrato etanólico a 90%. O extrato etanólico a 60%, no pólen do Paraná, inibiu *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella sp.*

Termos para indexação: Pólen apícola, atividade antioxidante e antibacteriana.

(Received in jule 7, 2006 and approved in april 19, 2007)

INTRODUCTION

Pollen, as well as other apicultural products, has gained increased attention for its therapeutic properties, as antibacterial (GARCÍA et al., 2001; PROESTOS et al., 2005), antifungicidal (GARCÍA et al., 2001), anti-caryogenic (ALMAS et al., 2001) and immunomodulatory (GEBARA et al., 2002) effects. Other potential applications of pollen include its use in apitherapy and as a functional food in the food industry due to pollen nutritional properties. Bee gathered pollen is considered a valuable special food with varied enhancing effects in health (BOGDANOV, 2004).

The therapeutic action has been attributed to several phenolic compounds with antioxidant activity, present in these products. All bee-derived products such as honey, propolis and pollen have been applied for centuries in traditional medicine as well as in nutritional supplementation (ISLA et al., 2001).

The bioactive properties of apicultural pollen extracts can be increased using a solvent suitable for its extraction, improving the activity of free radicals sequestration (antirust activity) (DI PAOLA-NARANJO et al., 2004). Appropriate extracts of pollen can be used as

[1]Professora do Curso de Tecnologia em Processos Químicos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR – Pato Branco – Paraná, Brasil – Doutoranda em Tecnologia de Alimentos – Setor de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná/UFPR – Jardim das Américas – Cx. P. 19011 – 81531990 – Curitiba, PR – solangecarpes@gmail.com

[2]Pós-Graduanda em Sistemas de Produção Tecnológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR – Pato Branco, PR, Brasil.

[3]Professor do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição/LAN – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ESALQ – Universidade Federal de São Paulo/USP.

[4]Professora do Setor de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná/UFPR – Jardim das Américas – Cx. P. 19011 – 81.531-990 – Curitiba, PR.

functional food or alimentary supplement had the amount of phenolic composites and its capacity of sequestered the responsible free radicals for it carcinogenesis and stress oxidative (TANG et al., 2005).Pollen grains have specific characteristics according to the floral species or cultivation methods, but the quality depends on the collection process, cleanness, drying and storage applied by beekeepers with the objective to increase the product shelf-life.

Honey-bee collected pollen can be considered as a potential source of energy for human consumption. Pollen contains nutritional compounds like carbohydrates, proteins, amino acids, lipids, vitamins, minerals and traces of micronutrients (SERRA BONVEHÍ & ESCOLÁ JORDÁ, 1997). In addition, pollen contains significant amounts of polyphenolic substances, mainly flavonoids (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005). These phenolic compounds are essential for the plants physiology due to its contribution in the morphology (form and structure). The polyphenols are involved in plants growth and reproduction; they also supply resistance against pathogens by the action of the phytoalexins and protection against plagues increasing the astringency of the plant as a food, becoming indigestible to predators. The polyphenols constitute one of the most numerous metabolic groups of plants and are integral part of people and animals diet (COOK & SAMMAN, 1996).

Until recently the interest in these compounds has been focused in the harmful effects on health caused by the ability of certain polyphenols to bind and precipitate macromolecules, such as proteins, carbohydrates and digestive enzymes, reducing the digestibility of foods. Nowadays, the interest in phenolic compounds has increased due to the antioxidant and free radical scavenging activities (DORMAN et al., 2003).

Several researchers found out that polyphenols are antioxidants with redox properties which allow them to act as reducing agents, hydrogen donators, and singlet oxygen quenchers (CALDWELL, 2003). The polyphenols also have metal chelation properties (RICE-EVANS et al., 1996). These compounds league metals to it (chelation of metals) and react with free radicals and genotoxic susbtances or carcinogenics (TANG et al., 2005). Epidemiologic studies have shown a correlation between an increased consumption of phenolics antioxidants and a reduced risk of cardiovascular disease and certain types of cancer (COOK & SAMMAN, 1996).

The fact that French people have a low incidence of coronary heart disease, despite having a diet rich in fat and being heavy smokers, is also known to be correlated with wine consumption (KANNER et al., 1994). Despite much interest in the antioxidant activity of red wine, it is uncertain which of the phenols exhibit the greatest antioxidant effect (MINUSSI et al., 2003). These researchers showed a positive correlation between total phenolic and total antioxidant potential, for all wines analyzed. Some authors state the necessity of additional inquiries to evaluate the relative composition of polyphenolic substances in pollen and extracts of pollen, as well as the differences in its specification to evaluate its function and contribution regarding to the antioxidant activities (SERRA BONVEHÍ & ESCOLÁ JORDÁ, 1997).

The aim of this work was to determine the phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of pollen relating to the concentration of ethanol used as solvent. Pollen samples were collected in Parana and Alagoas states, in the south and northeastern regions of Brazil, respectively. The purpose of this study was also to demonstrate a possible relationship between phenolic content and antioxidant activity of pollen.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of pollen ethanolic extracts (PEE)

The pollen samples (2g) were milled, homogenized and extracted individually using 15 mL of ethanol solution as extraction solvent in different concentrations (PEE 40, PEE 50, PEE 60, PEE 70, PEE 80 and PEE 90%) at temperature of 70°C for 30 min with constant agitation. The supernatant was separated and the solid residue was re-extracted. Then, the ethanol extracts of pollen were combined and stored at 5°C for further analysis. All samples were extracted in duplicate.

Total phenolic content of pollen ethanolic extracts (PEE)

Total polyphenols content was quantified according to the Folin-Ciocalteau spectrophotometric method using galic acid as reference standard (SINGLETON et al., 1965). In each sample of 0,5 mL, 2 mL (1:10 dilution) of Folin-Ciocalteau's reagent and 2 mL of Na_2CO_3 (4%w/v) were added, storing this mixture in dark at room temperature for 2 hours. The absorbance of all samples was measured at 740 nm using a UV-VIS spectrophotometer. Results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry weight of pollen (mg GAE/g dw) and are presented as the mean of duplicate analyses.

Antioxidant activity of pollen ethanolic extracts (PEE)

The antioxidant activity was determined by the oxidation of β -carotene and linoleic acid. β - carotene

(5 mg) (Sigma Co) was dissolved in 5 mL of chloroform and was pipetted into a flask containing 60 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40 (polyoxyethylene sorbitan monopalmitate). The chloroform was removed using a rotoevaporator at 40°C for 5min; afterwards, 50 ml of distilled water was added slowly with vigorous agitation to the residue, to form an emulsion. Aliquots of 1 mL of this emulsion were added to a tube containing 0.5 mL of PEE diluted 1:10, and the absorbance was measured at 470 nm, immediately, against a blank, consisting of the emulsion without β -carotene. The tubes were placed in a water bath at 40°C and absorbance of all the samples at 470 nm were taken at zero time (t=0). Measurement of absorbance was continued until the color of β -carotene disappeared in the control reaction (t=180 min) at 60 min intervals. The antioxidant activity of the extract was evaluated in terms of bleaching of β -carotene (ALENCAR, 2002). Antioxidant index (AI) was calculated using the following equation:

AI = (β -carotene content after 3 h of assay/initial β -carotene content) x 100

Antibacterial activity of pollen ethanolic extracts (PEE)

The disk diffusion assay described in detail by Bauer et al. (1966) was used in this study, with some modifications. The stock cultures of bacterials (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtillis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442 and *Klebsiella sp*) were grown in nutrient broth (Difco Co) at 26-27°C for 24 h in a shaker. Aliquots of 40μL of pollen ethanolic extract were applied in paper disk and placed in plates containing nutrient agar that was previously inoculated with active cultures of these microorganisms with sterile swabs. Antibacterial activity was assessed by measuring the diameter of the inhibition zone around each disk after 24 hours of inoculation at 37°C. The control (40 μ L of ethanol) used in all the plates and extracts analized in duplicate. Gentamicin (40μ L) was used as the positive control for bacteria.

Statistical analysis

Data were submitted to the analysis of variance (ANOVA). Tukey test was used to evaluate the significant differences between means (comparison of means) at the level of $p<0.05$, using the software MSTAT-C (MSTAT-C, 1998). Correlation analyses of antioxidant activity (Y) versus total phenolic content (X) were carried out using the correlation and regression program Statgraphics plus 4.1 and OriginPro 7.0 (OriginLabCorporation).

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic content of pollen ethanolic extracts (PEE)

Several authors have found phenolic and flavonoid compounds in pollen (PROESTOS et al., 2005). Recent studies of total polyphenols in pollen collected by native bees of the region of Vienna in Austria indicated that the pollen collected by bees generally show characteristic amounts of total polyphenols with some variations due to its botanical origin.

Total phenolic compounds content of pollen extracts was solvent-dependent. The amount of total phenolics varied in different conditions of extraction and ranged from 3.6 to 8.1 and 6.6 to 10.9 mg GAE/g of dry material to Alagoas and Parana pollen, respectively (Figures 1 and 2). The highest total phenolic levels were detected in pollen extracts from Parana samples (Figure 1). Figure 1 shows that each extraction condition had a different effect in the phenolic compounds content. Pollen extracted in ethanol at 60, 70 and 80% of concentration showed relatively higher levels of phenolic compounds (>10 mg/g) and did not present significant difference between the extraction conditions.

Nevertheless, statistical difference was found between the other extraction conditions (40, 50 and 90%). These results showed that the extraction conditions (solvent concentrations) influenced the extraction of phenolic compounds of Parana pollen (Figure 1). Kroyer & Hegedus (2001) achieved 8.2 mg/g of polyphenolics substances in natural bee-collected flower pollen, which could be significantly increased in the extracts (21.4-24.6 mg/g) with the highest content of total polyphenols in the ethanol extract.

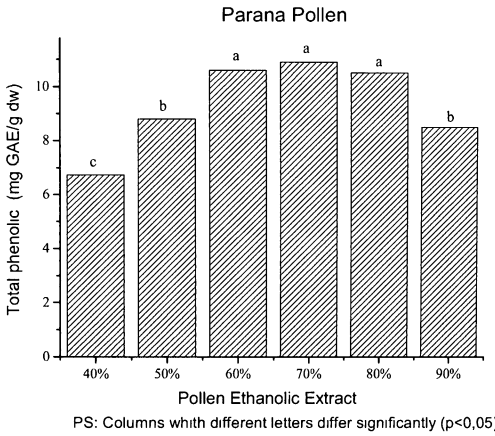


Figure 1 – Polyphenolic compounds in pollen of Parana state.

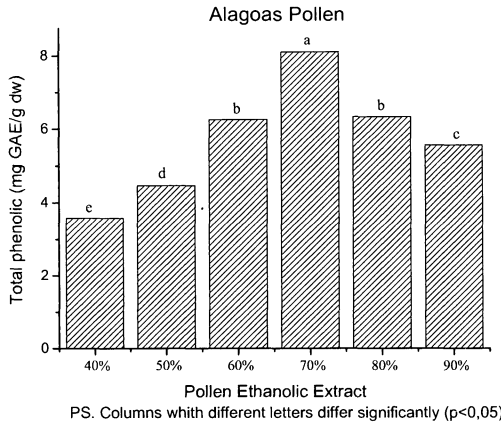


Figure 2 – Polyphenolic compounds in pollen of Alagoas state.

Comparing Figures 1 and 2, it can be observed that the content of total phenolic compounds of PEE 60, 70 and 80 % from Parana pollen (10.8, 10.9 and 10.6 mg/g) was higher than the one from Alagoas (6.2, 8,1 and 6.3 mg/g,). The content of total phenolic compounds of Alagoas pollen varied from 3.6 to 8.1 mg g^{-1}. Pollen extracted in ethanol at 70 % of concentration showed relatively higher levels of phenolic compounds (8.1 mg/g) and have significant difference between the other extraction conditions (Figure 2). The ethanolic extractions performed in Alagoas pollen samples did not have significant differences between the treatment conditions, PEE at 60% and 90%, in the level of 95% according to the Tukey test.

The determination of total phenolic compounds through Folin-Ciocalteau method is important in many food materials. Folin-Ciocalteu reagent, a mixture of phosphotungstic ($H_3PW_{12}O_{40}$) and phosphomolybdic ($H_3PMo_{12}O_{40}$) acids, is reduced to blue oxides of tungstene (W_8O_{23}) and molybdene (Mo_8O_{23}) during phenol oxidation. Blue coloration is followed at 760 nm and reflects the quantity of polyphenols usually expressed as gallic acid equivalent (GAE) or catechin equivalent. This method was useful and rapid for evaluating pollen samples because bee pollen contains many kinds of phenolics (SERRA BONVEHÍ et al., 2001).

Antioxidant activity of pollen ethanolic extracts (PEE)

The β-carotene bleaching method is based on the loss of the yellow colour of β -carotene due to its reaction with radicals which are formed by linoleic acid oxidation in an emulsion. In this method, the β -carotene undergoes rapid discoloration in the absence of an antioxidant. The linoleic acid free radical formed upon the abstraction of a hydrogen atom from one of its diallylic methylene groups attacks the highly unsaturated β -carotene molecules. As a result, β-carotene will be oxidized and broken down in part, subsequently the system looses its chromophore and characteristic orange colour, which can be monitored spectrophotometrically (DORMAN et al., 2003).

The absorbances of all samples at 470 nm were taken at zero time and every 60 min until the color of β -carotene disappeared in the control reaction. The antioxidation index was calculated as being the reason the tax of bleaching of each group enters on the control tax.

In this work, the extracts from both samples of pollen were found to hinder the extent of β -carotene bleaching by neutralizing the linoleate free radical and other free radicals formed in the system. The antioxidant activity through β -carotene-linoleate model system of ethanol pollen extracts (40 to 90%) are shown in Figures 3 and 4. The antioxidant ability of the control decreased drastically versus time.

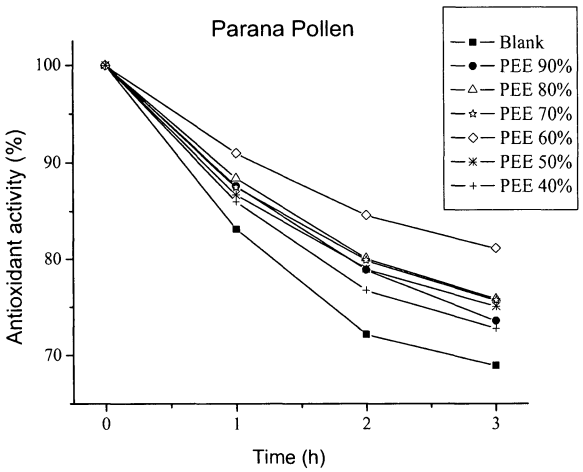


Figure 3 – Antioxidant activity (%) of Parana state pollen.

All the extraction conditions with regard to the concentration of ethanol, presented some antioxidant activity, therefore they were superior to the control. The highest antioxidant activity index was found in the Alagoas pollen extracted with ethanol at 70%, after 3 hours of treatment (AA= 83.3%). Nevertheless, the highest degree of antioxidant activity was achieved in the PEE at 60% of Parana pollen, with index around 81% (Figures 3 and 4). This treatment condition also has the highest concentration

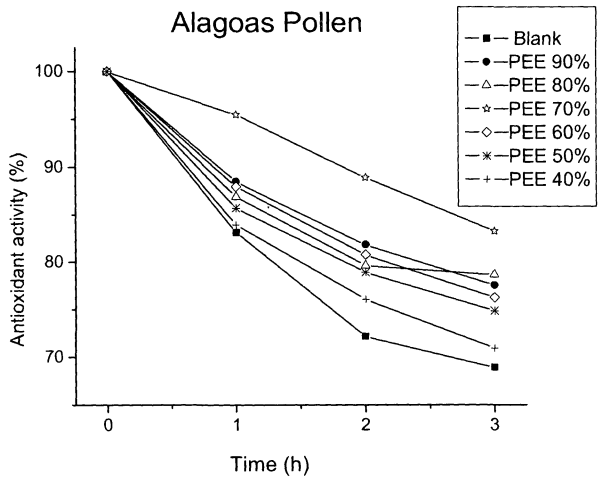


Figure 4 – Antioxidant activity (%) of Alagoas state pollen.

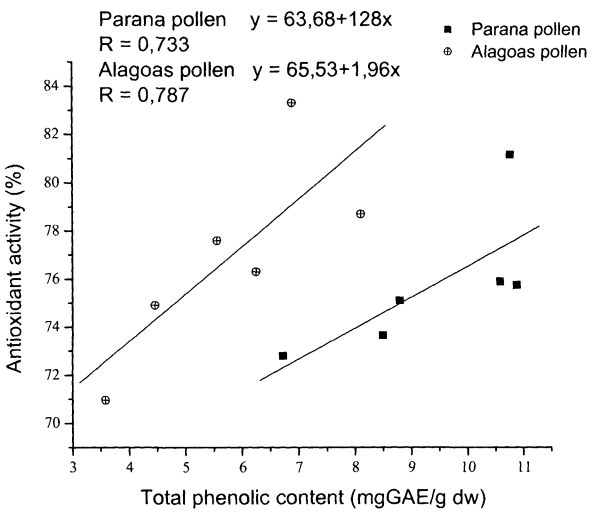


Figure 5 – Linear correlation of antioxidant activity versus total phenolic content of 40-90% ethanol concentration of Parana pollen and Alagoas pollen.

of polyphenol compounds, although low correlation between the content of total polyphenols and the antioxidant activity of the pollen preparations (Figure 5). The correlation between antioxidant activity (Y) and total phenolic contents (X) of ethanolic extracts of Parana pollen presented a correlation coefficient of R = 0.73 ($Y = 63.68 + 1.28\ X$) and Alagoas pollen showed a correlation coefficient of R = 0.78 ($Y = 65.54 + 1.96\ X$) according to Figure 5. Theses results suggest that the antioxidant activity of Parana pollen and Alagoas pollen are influenced by the phenolic compounds (Figure 5). However other authors found that the antioxidant activity had a higher correlation (71%) with total phenolic content in plant extracts of basil (*Ocimum basilicum* L) which are used in the traditional medicine, as a culinary herb (JAVANMARDI et al., 2003).

Antibacterial activity of pollen ethanolic extracts (PEE)

Antibacterial activity of all pollen extract analized was according to the disk diffusion assay, and the results are shown in Tables 1 and 2. The PEE of Parana pollen at 60% shows the same inhibition degree against *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella sp.* *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* bacteria were not inhibited for Parana pollen in all extraction conditions applied (different ethanol solution concentrations); however *Bacillus cereus* was inhibited by the pollen of Alagoas in PEE at 50 and 60 % of ethanol. *Bacillus subtilis* bacteria were inhibited for Parana pollen in PEE at 40%, 50%, 60% and 70% (Table 1) and for Alagoas pollen in PEE at 50%, 70% and 90% (Table 2). In this study, the PEE of Parana pollen at 90% showed the biggest clear zones around each disk (7.0 mm) against *Klebsiella sp.* Nevertheless, *Klebsiella* was also inhibited by the pollen from Alagoas in extracts of 60 and 70 %. The Alagoas extract pollen at 70%, contained highest concentrations of phenolic content with antioxidant and antibacterial activity.

Pseudomonas aeruginosa bacteria were inhibited by 80% and 90% and *Staphylococcus aureus* bacteria were inhibited by extracts of pollen at 50%, 60%, 70% and 80 % of ethanol solution (Table 2). These different patterns of sensitivity are due to different phenolic compounds in pollen (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

Gentamicin was the antibiotic used for comparison, showing different ways of action to each bacterium. The control proved that the ethanol used in the extractions did not have inhibiting action.

Table 1 – Antibacterial activity of Parana state pollen ethanolic extracts (PEE).

PEE[a]	Bacillus cereus *(mm)*[c]	Bacillus subtilis *(mm)*	Pseudomonas aeruginosas *(mm)*	Staphylococcus aureus *(mm)*	Klebsiella sp. *(mm)*
40 %	0	0.5	0	0	0
50 %	0	4.0	0	0	0
60 %	0	2.0	2.5	0	2.5
70 %	0	3.0	1.5	0	3.5
80 %	0	0	0	0	3.0
90 %	0	0	0	0	7.0
Control*	0	0	0	0	0
A[b]	8.0	11.0	8.5	9.0	8.0

[a] PEE – Pollen Ethanolic Extract [b]Antibiotic – gentamicin [c]diameter of the inhibition zone * ethanol [a]

Table 2 – Antibacterial activity of Alagoas state pollen ethanolic extracts (PEE).

PEE[a]	Bacillus cereus *(mm)*[c]	Bacillus subtilis *(mm)*	Pseudomonas aeruginosas *(mm)*	Staphylococcus aureus *(mm)*	Klebsiella sp. *(mm)*
40 %	0	0	0	0	0
50 %	0.5	0.5	0	1.0	0
60 %	0.5	0	0	1.5	3.5
70 %	0	2.0	1.0	3.0	1.5
80 %	0	0	1.0	1.5	0
90 %	0	2.0	1.0	0	0
Control*	0	0	0	0	0
A[b]	8.0	11.0	8.5	9.0	8.0

[a] PEE - Pollen Ethanolic Extract [b]Antibiotic – gentamicin [c] diameter of the inhibition zone * ethanol

CONCLUSION

The content of total phenolic compounds in pollen extracts was found to be solvent-dependent. The best extraction conditions, relating to biological properties, were PEE at 70 ethanol solution. The amount of total phenolics varied in different conditions of extraction and ranged from 3.6 to 8.1 and 6.6 to 10.9 mg GAE/g of dry material to Alagoas and Parana pollen, respectively. Although too little antibacterial activity was observed in extract of Parana pollen at 80% and 90% of ethanol, theses extracts showed higher amounts of total phenolic content with antioxidant activity above of 80%. In such a way it is possible that the concentration of phenolic compounds does not determine the antibacterial activity, but the nature of phenolic compounds present in extracts. As different extracts exhibited different antioxidant and antibacterial activities, there may be different kinds of phenolic content in different pollen extract. According to the results obtained, pollen seems to have interesting biological properties, and can be considered as a functional food. Other studies will be necessary to establish quality parameters to standardize the Brazilian product. Due to the great biodiversity of Brazil, more studies are necessary for a better understanding of the functional properties of pollen.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Henrique Brayer for suggestions and interest in this work. This work was supported by UTFPR, UFPR and PIDCT (CNPq).

BIBLIOGRAPHY

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis melífera* africanizada de diferentes regiões do Brasil.** 2002. 120 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALMAS, K.; MAHMOUD, A.; DAHLAN, A. A comparative study of propolis and saline application on human dentin: a SEM study. **Indian Journal Dentist Resourch**, New Delhi, v. 12, p. 21-70, 2001.

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

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antiobiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 45, p. 493-496, 1966.

BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and beeswax. **Apiacta**, [S.l.], v. 38, p. 334-341, 2004.

CALDWELL, C. R. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa L.*) phenolics. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Madison, v. 51, n. 16, p. 4589-4595, 2003.

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

DI PAOLA-NARANJO, R. D.; SÁNCHEZ, J. S.; PARAMÁS, A. M. G.; GONZALO, J. C. R. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. **Journal Chromatography A**, [S.l.], v. 1054, n. 1/2, p. 205-210, 2004.

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 Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

GARCÍA, M.; PÉREZ-ARQUILLUE, C.; JUAN, T.; JUAN, M. I.; HERRERA, A. Note: pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science Technology International**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 155-158, 2001.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 365-369, 2002.

ISLA, M. I.; MORENO, M. I. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, n. 2, p. 165-170, 2001.

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

KANNER, L.; FRANKEL, E.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E. Natural antioxidants in grapes and wines. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 1, p. 64-69, 1994.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Techonologies**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 171-174, 2001.

MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURAN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, London, v. 82, n. 3, p. 409-416, 2003.

MSTAT-C. **A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments**. [S.l.]: Norway, 1998.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NICHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 4, p. 1190-1195, 2005.

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

SERRA BONVEHÍ, J.; ESCOLÁ JORDÁ, R. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 3, p. 725-732, 1997.

SERRA BONVEHÍ, J.; SOLIVA TORRENTÓ, M.; CENTELLES LORENTE, E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 4, p. 1843-1853, 2001.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, [S.l.], v. 16, p. 144-158, 1965.

TANG, B.; ZHANG, L.; GENG, Y. Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow ingection spectrofluorimetry detecting hydroxyl radicals. **Talanta**, [S.l.], v. 65, n. 3, p. 769-775, 2005.