

**“Pão de abelha” do Nordeste Transmontano:
caracterização química, nutricional e actividade
antioxidante.**

Andreia Vanessa Ferreira Tomás.

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais.*

Orientado por:

Miguel José Rodrigues Vilas Boas

Bragança

2013

Agradecimentos

Ao meu orientador, Doutor Miguel Vilas Boas, que foi incansável na orientação deste trabalho, pela dedicação, disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e paciência. Um muito obrigado.

À Doutora Soraia pela atenção, disponibilidade, empenho, pela ajuda sempre presente, por tudo que me ensinou e pelo carinho com que me recebeu desde o início. Um muito obrigado.

Aos meus colegas do laboratório, pelos bons momentos passados tanto a trabalhar como nas pausas para o cafezito. À Filipa e ao Márcio, pelo apoio e amizade, sempre disponíveis em ajudar e pelos conselhos transmitidos. À Joana e à Méliça pela ajuda e amizade. À Doutora Isabel Ferreira, Doutora Lillian, Doutor João, Doutor Ricardo, Inês, Ângela, Carla, Sofia e à Rafaela, pelo bom acolhimento, pelo apoio e pelos momentos e conselhos dados. Ao Tó e Azucena pelo carinho e pela amizade.

Ao Ricardo, ao Nuno, à Maria e à Rosalina pela ajuda e disponibilidade que tiveram em me ajudar.

Aos meus amigos, que estão presentes em todos os momentos, que ouviram os meus problemas, medos, ansiedades, alegrias e me apoiaram. Ao João e ao Salsa pelas conversas na hora da refeição, sempre divertidas.

O meu obrigado a todos os amigos e familiares que não foram citados, mas que torcem por mim e estão felizes por mais uma conquista.

E por fim o meu especial obrigado aos meus pais, porque sem eles esta etapa não seria possível, pelo apoio, amor paciência e carinho. À minha irmã e cunhado pelas conversas e conselhos dados.

Um muito obrigado a todos vocês!!!

Resumo

O “pão de abelha” é um produto da colmeia com origem no pólen transportado pelas abelhas para o interior da colmeia, ao qual é adicionado mel e enzimas digestivas e posteriormente armazenado, nos favos, dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação. É uma fonte de nutrientes para as abelhas, rica em proteínas, minerais, gorduras e outras substâncias fundamentais para o desenvolvimento da colônia. Uma das contribuições para o seu elevado valor nutritivo deve-se à presença de uma quantidade significativa de vitaminas e compostos fenólicos, que como antioxidantes naturais, são responsáveis por muitas das suas propriedades biológicas. As potencialidades da aplicação do “pão de abelha” como suplemento alimentar e como nutracêutico depende em grande parte da sua riqueza na composição química a qual varia diretamente com a flora da região e com a época de recolha por parte das abelhas.

Neste trabalho estudaram-se 17 amostras de “pão de abelha” do Nordeste transmontano de Portugal, do concelho de Bragança e Vinhais, uma amostra de “pão de abelha” comercial e uma amostra de pólen proveniente também da mesma região, para posteriores comparações durante o estudo. O estudo incidiu na análise da composição polínica, dos parâmetros nutricionais, (nomeadamente a humidade, as cinzas, as gorduras, as proteínas, os açúcares redutores por HPLC), a presença de vitamina E, os teores totais de compostos fenólicos e flavonoides totais, e atividade antioxidante.

A análise polínica das 17 amostras de “pão de abelha” mostrou a predominância dos pólenes da família Fabaceae com valores de abundância de 48%. Isto não se verifica para a amostra de “pão de abelha” comercial e para o pólen apícola uma vez que na sua composição, o pólen mais abundante é da família dos Mirtaceae, e das Cistaceas, respetivamente.

A composição das amostras apresentou teores de humidade, cinzas, proteínas e gorduras, de 7-19%, 2-8%, 16-25% e 13-17% respetivamente. O “pão de abelha” é uma matriz rica em hidratos de carbono devido à entrada de mel na sua composição, o que se observou através da análise do perfil de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde foram detetados os monossacáridos frutose, glucose e esporadicamente arabinose.

A composição em tocoferóis (vitamina E) foi avaliada pela aplicação de técnicas eletroquímicas, verificando-se que este produto apícola é também ele rico nos

diversos isómeros, encontrando-se uma presença significativa de α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol.

A análise do perfil químico das amostras de “pão de abelha” baseou-se nos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais após um processo de extração. Os teores de compostos fenólicos totais, revelaram valores compreendidos entre 12 e 52 mg/g de “pão de abelha”. A presença de flavonoides totais foi também identificada através do doseamento de flavonas/flavonois e de flavanonas/di-hidroflavonois sendo este grupo bem mais significativo com valores que oscilaram de 8-25 mg/g de “pão de abelha”.

A atividade antioxidante, avaliada através do poder redutor e pelo efeito bloqueador de radicais livres de DPPH mostrou-se elevada na maioria das amostras e sugere uma correlação com os teores em compostos fenólicos.

Pelos resultados encontrados, o “pão de abelha” é um produto com elevadas potencialidades de uso como suplemento alimentar.

Palavras-chaves: “pão de abelha”, análise polínica, parâmetros nutricionais, conteúdo fenólico, atividade antioxidante.

Abstract

Beebread is a hive product prepared with pollen collected and transported by bees into the hive, to which they add honey and digestive enzymes and subsequently stored in the combs, starting a lactic fermentation which gives it a greater power of conservation. This is a source of nutrients for bees, rich in proteins, minerals, fats and other substances essential for the development of the colony. One of the contributions to its high nutritional value is the presence of significant amounts of vitamins and phenolic compounds, that acting as natural antioxidants, are responsible for many of their bioactivity. The potential use of beebread as a dietary supplement and nutraceutical depends greatly on its chemical richness which depends largely on the flora diversity of the region and the season of collection by the bees.

This work relies on the evaluation of 17 samples of beebread from the northeast region of Portugal, from the municipalities of Bragança and Vinhais, a sample of commercial beebread and a sample of pollen from the same region, to enable further comparisons. The study focused on the analysis of pollen composition, nutritional parameters, (which includes moisture, ash, fats, proteins, sugars by HPLC), the presence of vitamin E by voltammetric techniques, the total amount of phenolic compounds, including flavonoids, and antioxidant activity.

The pollen analysis of beebread showed the dominance of pollen from Fabaceae with abundance values close to 48 %. The profile for the commercial beebread and bee pollen were however different with the Mirtaceae and rockrose as the most abundant pollen within those samples, respectively.

The samples composition presented moisture, ash, protein and fat contents as 7-19 %, 2-8 %, 16-25 % and 13-17 %, respectively. Beebread is a natural mixture rich in carbohydrates due to the presence of honey in its composition, as observed by sugar profile analysis with high performance liquid chromatography (HPLC), confirmed by the detection of the monosaccharides fructose, glucose and rarely arabinose.

The composition of tocopherols (vitamin E) was evaluated by applying electrochemical tools, and showed that this bee product is also rich in the different isomers forms, with a significant amount of α - tocopherol, β - tocopherol, γ - tocopherol and δ - tocopherol.

The analysis of the chemical profile of t beebread was achieved based on the total phenolics and flavonoid content after an ethanolic extraction process. The amount of phenolic compounds, revealed values comprised between 12 and 52 mg/g of beebread. The presence of flavonoids was also confirmed by the evaluation of flavones/flavonols and flavanones/di-hydroflavonoids group with the latter being much more frequent with values that ranged from 8-25 mg/g beebread.

The antioxidant activity, measured by the reducing power and the blocking effect of free radical DPPH, was high in most of the samples and suggests a correlation with the levels of phenolic compounds.

The results pointed to beebread as a a product with high potential for use as a food supplement .

Keywords: Beebread, pollen analysis, nutritional parameters, phenolic content, antioxidant activity.

Resumen

El “pan de abejas” es un producto de la colmena se originó en el polen recogido por las abejas dentro de la colmena, al que se añade la miel y las enzimas digestivas y, posteriormente almacenado en los panales, a partir de una fermentación láctica que da mayor poder conservación. Es una fuente de nutrientes para las abejas, rica en proteínas, minerales, grasas y otras sustancias esenciales para el desarrollo de la colonia. Una de las contribuciones a su alto valor nutricional debido a la presencia de cantidades significativas de vitaminas y compuestos fenólicos, tales como antioxidantes naturales que son responsables de muchas de sus propiedades biológicas. La posible aplicación de “pan de abeja”, como un suplemento dietético y nutracéuticos depende de la cantidad de su riqueza en la composición química de los cuales varía directamente con la flora de la región y en el momento de la recogida por las abejas.

En este trabajo se estudiaron 17 muestras de “pan de abeja” Montes noreste de Portugal, en el municipio de Bragança, una muestra de “pan de abeja” y una muestra comercial de polen de la misma región, también , para las comparaciones posteriores durante el estudio. El estudio se centró en el análisis de la composición de polen, parámetros nutricionales, (incluyendo la humedad, cenizas, grasas, proteínas, azúcares por HPLC), la presencia de vitamina E técnicas de voltametría, la concentración total de compuestos fenólicos tales como fenol flavonoides totales y totales y actividad antioxidante.

El análisis polínico de 17 muestras de “pan de abeja”, mostró el predominio del polen de las Fabaceae con valores de abundancia de 48 %. Este no es el caso de la muestra de “pan de abeja” apícola comerciales y polen de una vez en su composición, el polen es más abundante de la familia de Mirtaceae, ce de jara, respectivamente.

La composición de las muestras tenía la humedad, cenizas, proteína y grasa, 7-19%, 2-8%, 16-25% y 13-17%, respectivamente. El “pan de abejas” es una matriz rica en hidratos de carbono debido a la entrada de la composición de miel, que se observó por análisis del perfil de azúcar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que fue detectado monosacáridos fructosa, esporádicamente glucosa y arabinosa.

La composición de tocoferoles (vitamina E) se evaluó mediante la aplicación de técnicas electroquímicas, comprobar que este producto apícola es también rica en él

varios isómeros, encontrando una importante presencia de α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol .

El análisis del perfil químico de las muestras de “pan de abeja” se basa en el contenido de fenoles totales y flavonoides total después de un proceso de extracción. El contenido de compuestos fenólicos totales, reveló valores comprendidos entre 12 y 52 mg/g de “pan de abeja”. La presencia de flavonoides también se identificó a través de ensayo de flavonas/flavonoles, flavanonas/grupo di-hidroflavonois que es mucho más significativa con valores que variaron desde 8 hasta 25 mg/g “pan de abejas”.

La actividad antioxidante, medida por el poder reductor y el efecto de bloqueo de radicales libres DPPH fue alta en la mayoría de las muestras y sugiere una correlación con los niveles de compuestos fenólicos.

Los resultados encontrados, el "pan de abeja " es un producto con un alto potencial para su uso como un suplemento alimenticio.

Palabras clave: “Pan de abejas”, el análisis de polen, los parámetros nutricionales, contenido fenólico, la actividad antioxidante.

Índice geral

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
RESUMEN	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XIV
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XV

Capítulo I- Introdução

1.1. MEL	2
1.2. GELEIA REAL	3
1.3. PRÓPOLIS	3
1.4. CERA.....	4
1.5. VENENO DAS ABELHAS.....	5
1.6. PÓLEN.....	5
1.6.1. Estrutura do grão de pólen.....	7
1.7. PÃO DE ABELHA.....	8
1.7.1. Propriedades	9
1.7.2. Produção, colheita e armazenamento	10
1.8. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO “PÃO DE ABELHA”	10
1.8.1. Água	11
1.8.2. Proteínas e aminoácidos	11
1.8.3. Lípidos.....	11
1.8.4. Hidratos de carbono	12
1.8.5. Compostos fenólicos	12
1.8.6. Vitaminas	13
1.9. TÉCNICAS UTILIZADAS	14
1.9.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	14
1.9.1.1. Detetor de Índice de Refração (RI)	14
1.9.2. Técnicas voltamétricas	15
1.9.2.1. Voltametria de impulso diferencial	16
1.10. OBJETIVOS.....	18

Capítulo II - Material e Métodos

2.1. AMOSTRAGEM	20
2.2. SOLVENTES E REAGENTES	21
2.3. ANÁLISE POLÍNICA	21
2.4. HUMIDADE.....	22
2.5. CINZAS.....	22
2.6. PROTEÍNAS.....	23
2.7. GORDURAS	23
2.8. AÇÚCARES	24
2.8.1. Preparação das amostras.....	24
2.8.2. Condições cromatográficas	24
2.9. TOCOFERÓIS	25
2.9.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	25
2.9.2. CONDIÇÕES ELETROQUÍMICAS	25
2.10. CONTEÚDO FENÓLICO.....	26
2.10.1. Extração.....	26
2.10.2. Fenóis totais.....	27
2.10.3. Flavonas e flavonóis.....	27
2.10.4. Flavanonas e di-hidroflavonois	28
2.11. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
2.11.1. Poder redutor	28
2.11.2. Efeito bloqueador de radicais livres	29

Capítulo III - Resultados e Discussão

3.1. ANÁLISE POLÍNICA	32
3.2. HUMIDADE.....	35
3.3. CINZAS.....	36
3.4. PROTEÍNAS.....	36
3.5. GORDURAS	36
3.6. AÇUCARES	37
3.7. TOCOFERÓIS	38
3.8. CONTEÚDO FENÓLICO.....	41
3.8.1. Fenóis totais.....	42
3.8.2. Flavonóides	42
3.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
3.9.1. Efeito bloqueador de radicais livres	43
3.9.2. Poder redutor	44
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

Índice de figuras

Figura 1 - Geleia real.....	3
Figura 2 - Própolis a isolar a colmeia.....	4
Figura 3 - Parede do grão de pólen, mostrando o arranjo espacial das camadas.	7
Figura 4 - Pólen apícola e imagem ao microscópio (<i>Cistus ladanifer</i>).....	8
Figura 5 - Amostra de “pão de abelha”.	9
Figura 6 - Voltametria de impulso diferencial: (a) – perfil de aplicação de potenciais; (b) – voltamograma diferencial de impulso.....	17
Figura 7 - Origem geográfica das amostras de “pão de abelha” (a) freguesias de Bragança; (b) freguesias de Vinhais.....	20
Figura 8 - Extração de gorduras pelo método de Soxhlet.	23
Figura 9 - Célula eletroquímica de três elétrodos.....	26
Figura 10 - Redução do DPPH.....	30
Figura 11 - Fotografias de tipos polínicos das amostras de “pão de abelha”. (a) Poaceae; (b) Fabaceae; (c) Campanulaceae; (d) Ranunculaceae; (e) Asteraceae; (f) Mirtaceae; (g) Boraginaceae; (h) Lamiaceae.....	34
Figura 12 - Cromatograma de padrões de açúcares: 1- arabinose; 2- frutose; 3- glucose; 4-sacarose; 5- turanose; 6- maltose; 7- trealose.....	37
Figura 13 - Perfil de açúcares de uma amostra de “pão de abelha”BB12, : 1- arabinose; 2- frutose; 3-glucose.....	38
Figura 14 - Voltamograma de impulso diferencial obtido com uma velocidade de 0,03 V s ⁻¹ e uma amplitude de modulação de 0,06 V, para soluções de hexano:etanol (40:60) com H ₂ SO ₄ (0,002 moldm ⁻³) /TBAP (0,03 moldm ⁻³) de: (i) extrato, 5 mgmL ⁻¹ ; (ii). padrões de tocoferol.....	39
Figura 15 - Voltamogramas de impulso diferencial obtidos com uma velocidade de 0,03 V s ⁻¹ e amplitude de modulação de 0,06 V, para soluções de hexano:etanol (40:60) com H ₂ SO ₄ (0,002 moldm ⁻³) /TBAP (0,03 moldm ⁻³) e padrões de tocoferóis:(i) 5 μmoldm ⁻³ (ii) 10 μmoldm ⁻³	39
Figura 16 - Atividade bloqueadora de radicais de DPPH para as amostras.	44
Figura 17 - Poder redutor das amostras.....	45

Índice de tabelas

Tabela 1 - Percentagem das famílias identificadas nas amostras de "pão de abelha"...	33
Tabela 2 - Parâmetros nutricionais das amostras de “pão de abelha”.....	35
Tabela 3 - Conteúdo em tocoferóis nas amostras de “pão de abelha”.....	40
Tabela 4 - Composição fenólica	41

Abreviaturas e símbolos

Ap – Abreviatura utilizada para referenciar a amostra de pólen

BB - Abreviatura utilizada para referenciar as amostras de “pão de abelha”

BBc - Abreviatura utilizada para referenciar a amostra comercial

DAD - detetor diode-array

DPPH – 2.2-difenil-1-picril-hidrazilo

DNP – 2.4-dinitrofenilhidrazina

DPV – Voltametria diferencial de impulso

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IR – Índice de refração

MeOH – Metanol

rpm – Rotações por minuto

TBAP – Perclorato de tetrabutilamônio

UV – UltraVioleta

Vis – Visível



Capítulo 1

Introdução

- 1.1. Mel
- 1.2. Geleia real
- 1.3. Própolis
- 1.4. Cera
- 1.5. Veneno das abelhas
- 1.6. Pólen
- 1.7. Pão de abelha
- 1.8. Composição química
do “pão de abelha”
- 1.9. Técnicas utilizadas
- 1.10. Objetivos

A apicultura é uma atividade agrícola de gestão e criação de abelhas com o objetivo principal de recolher produtos apícolas, em particular o mel. São, no entanto, cada vez mais diversos os produtos apícolas explorados, considerando as suas potencialidades em termos nutricionais e farmacológicos, como promotores da saúde humana. A sua utilização na dieta humana e medicina popular é referida desde a antiguidade.[1] Destes produtos os que mais se destacam são, o mel, a cera, o pólen, a própolis, a geleia real e o veneno de abelha (apitoxina), mas mais recentemente surge o interesse por um outro produto derivado da colmeia, o “pão de abelha”, que é constituído por, pólen mel e enzimas digestivas.

1.1. Mel

O mel define-se como uma substância natural doce produzida pelas abelhas *Apis mellífera* a partir do néctar de plantas, de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores presentes nas partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem e transformam, combinando com substâncias específicas próprias e depositam nos favos da colmeia para que “amadureça”. [2]

Na sua composição estão presentes mais de 180 componentes, mas é essencialmente uma solução sobressaturada de açúcares, principalmente, frutose e glucose (>60%), com um teor de humidade aproximado de 18%, apresentando também uma grande variedade de compostos secundários, incluindo os flavonoides e ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas e vitaminas.[3] A composição específica do mel pode variar dependendo de fatores, como a sua procedência, o método de extração e particularmente a sua origem botânica (mel de néctar monofloral ou multifloral ou mel de melada). A sua composição em hidratos de carbono confere-lhe um alto valor energético, no entanto, são também reconhecidas outras propriedades medicinais atribuídas ao mel, como antioxidante, anti-inflamatório, antiulcerosas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anticarcinogênicas.[2;3;4]

1.2. Geleia real

A geleia real, o alimento da rainha, é um produto natural de origem animal, segregado pelas abelhas jovens e contendo uma quantidade notável de proteínas, lípidos, açúcares, vitaminas, enzimas e substâncias minerais. Esta sua composição apresenta fatores vitais específicos e substâncias biocatalisadoras nos processos de regeneração das células, desenvolvendo uma importante ação fisiológica e potenciando a sua aplicação na indústria cosmética e farmacêutica.[3] Assim, a geleia real possui propriedades farmacológicas como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, atividade bio-estimulante, imuno-moduladora, radio-protetivo, anticarcinogénico, entre muitas outras.[5]



Figura 1- Geleia real (Fonte:<http://www.medicinapratica.com.br/tag/geleia-real>).

1.3. Própolis

A própolis é uma substância produzida pelas abelhas a partir da recolha de secreções e exsudados dos rebentos de plantas. À resina recolhida e mastigada pelas abelhas são adicionadas enzimas da saliva, pólen e cera de abelha. Esta resina é usada na colmeia para selar as paredes, fortalecer as extremidades dos favos e embalsamar invasores mortos que as abelhas não têm capacidade de remover para o exterior da colmeia. Além de ser utilizado como material de construção é uma importante ferramenta das abelhas contra microrganismos patogénicos.[7;8]

Ao longo da história, a própolis foi usada como remédio no tratamento de um variado número de patologias.[7;9] Estudos atuais da atividade biológica da própolis comprovaram a sua ação antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, hépato-protetora, antifúngica, antiviral, antiparasitária, imuno-modeladora, anti-inflamatória,

etc.[10;12;13;14] O sucesso das aplicações médicas da própolis provocou um incremento do interesse pela sua composição química.[11] Maioritariamente, a própolis é constituída por resinas ricas em ácidos fenólicos e flavonoides (55%), por cera (30%), compostos voláteis (10%) e pólen (5%).[9] A sua composição é, no entanto, bastante dependente da flora existente em redor da colmeia, bem como das características geográficas e climáticas do local onde se encontra apiário.[7]



Figura 2 - Própolis a isolar a colmeia (Fonte:<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pr%C3%B3polis>).

1.4. Cera

A cera é outro dos produtos de origem animal obtido nas glândulas ceríferas das abelhas obreiras com idades compreendidas entre os 12 e os 18 dias. É um produto de cor branca, se bem que por vezes apresenta uma cor amarela devido ao contato do mel, do pólen e própolis.[3] As abelhas usam a cera de abelha para a construção do favo, em que as células iniciais são levantadas para o armazenamento de pólen e mel. Para que esta seja produzida no interior da colmeia a temperatura tem de rondar os 33 a 36°C, É composta maioritariamente por uma mistura de ácidos gordos, ceroleína, vitamina A e outras substâncias com diferentes propriedades bactericidas, emolientes, cicatrizantes e anti-inflamatórias.[3;7] Desde a antiguidade que a cera de abelha é utilizada no tratamento das doenças da pele. Ultimamente tem adquirido valor terapêutico na associação com outros produtos apícolas ou farmacêuticos, na preparação de unguentos e cremes de beleza.[7]

1.5. Veneno das abelhas

O veneno das abelhas também conhecido como apitoxina é produzido por uma glândula de secreção ácida e outra de secreção alcalina que existem no abdómen da abelha obreira. É composto por melitina, enzimas (fosfolipases) e isolectina. A sua função protetora requer a injeção no corpo do inimigo através de um ferrão. Na fuga a abelha, quase sempre, deixa o ferrão na vítima e conseqüentemente parte do abdómen que se encontra ligado, pelo que, a abelha acaba por morrer pouco tempo depois. Isto fica-se a dever à elasticidade da pele humana, que após a introdução do ferrão impede que o mesmo consiga sair pelos mesmos orifícios.[7] Este veneno, em doses controladas, pode ter uma ação benéfica como anti-inflamatório, prevenção e cura de reumatismo, ação anticoagulante, vasodilatador e hipotensor. [8] A melitina, a maior fração da apitoxina, demonstrou ter uma ação bloqueadora da produção de superóxido em neutrófilos, o principal mecanismo envolvido na destruição celular decorrente de um processo inflamatório.[3;16;17] A aplicação mais interessante no ser humano é no tratamento da artrite reumatoide. Estudos clínicos recentes mostraram que a taxa de sucesso para este produto varia de 70 a 90%.[18;19;20]

1.6. Pólen

O pólen é o elemento germinal masculino, produzido nas anteras das flores, indispensáveis para a fecundação e conseguinte transformação de flor em frutos. Apresenta-se como um pó com uma coloração que varia em relação à espécie que lhe deu origem, sendo mais frequentemente amarelo ou castanho claro, no entanto, podemos encontrar pólen branco, rosa, laranja, verde, roxo e negro como ocorre no caso da papoila comum (*Papaver rhoeas* L.).[3] O pólen, como alimento azotado, é necessário para o desenvolvimento das abelhas melíferas; uma colónia de abelhas adultas poderia manter-se bastante tempo sem pólen, tendo como único alimento o mel ou xarope de açúcar, no entanto, não ia ter condições para a criação de larvas, porque para estas é indispensável o pólen.[7]

Do ponto de vista químico, o pólen é constituído por 35% de proteínas, das quais mais de metade está na forma de aminoácidos livres, representando elementos essenciais para a vida capazes de serem assimilados pelo organismo. Adicionalmente,

contém 40% de hidratos de carbono, representados por várias formas de açúcares, 5% de gorduras, 3% de minerais e 7 a 10% de humidade. Os restantes 13% são elementos minoritários, dos quais poucos foram identificados como, o ácido pantotênico, ácido nicotínico, ácido fólico, cianocobalimina e também algumas vitaminas A, C, D e E.[22] Atualmente o pólen é estudado em muitos laboratórios do mundo por ser um produto de origem natural com um valor dietético excepcional. São lhe reconhecidos efeitos positivos nas funções digestivas e intestinais, no aumento do apetite, como alimento energético, no combate à neurose e à depressão mental, contra infeções da próstata e para o controlo dos diabetes.[3;22;23;24]

O pólen recolhido das flores pelas abelhas melíferas é misturado por estas com néctar e algumas substâncias salivares, originando um grânulo ou carga que as mesmas transportam para a colmeia nas suas patas posteriores. Este pólen pode ser recolhido pelo apicultor à entrada da colmeia, através da colocação de um dispositivo, “caça-pólen”, que permite que a abelha entre por um orifício limitante para o interior da colmeia, mas o grânulo de pólen fique retido no exterior, acumulando-se numa gaveta. Este pólen, denominado de pólen apícola, é um produto da colmeia com elevadas potencialidades como alimento funcional.[7] Algumas das suas propriedades devem-se à composição, que contém uma grande quantidade de polifenóis e de flavonoides (que ocorrem na maioria sob a forma glicosilada). Os flavonoides possuem diferentes atividades fisiológicas e farmacológicas importantes,[25] oferecendo proteção indireta, ativação do sistema de defesa endógeno e pela modulação diferentes processos fisiológicos. Outro grupo de compostos contidos no pólen são os fitoesteróis, com várias atividades biológicas mas a que tem maior relevância é contribuir para a redução o colesterol no organismo.[26] Desta forma, são várias as propriedades associadas com o consumo de pólen entre elas estão: antibacteriana, antifúngica, antioxidante, imunomoduladores, radioprotetivo, anti-anêmico, antidiarreico e ajuda na prevenção da osteoporose.[23;24]

1.6.1. Estrutura do grão de pólen

O grão de pólen é uma estrutura bi ou tricelular. Está rodeado por duas camadas morfológicas e quimicamente distintas. A camada externa, exina, é formada por esporopolenina muito resistente que só se degrada por oxidação, apresentando padrões morfológicos típicos para cada espécie ou grupo de plantas. A camada interna, intina, é formada por celulose e menos resistente, mas com uma aparência homogênea. A exina contém os principais componentes morfológicos que se prestam à caracterização dos grãos de pólen. Subdivide-se ainda numa camada externa mais ou menos esculpada, a sexina e uma porção interna, relativamente homogênea e sem esculturas, a nexina. Os elementos estruturais da sexina são, basicamente, colunas, que se projetam a partir da superfície da nexina, Figura 3. Esses elementos apresentam formas variáveis nos diferentes grãos de pólen, mas geralmente, apresentam uma porção cilíndrica com uma expansão na extremidade.[3;7]

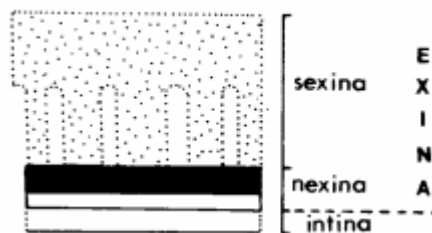


Figura 3 - Parede do grão de pólen, mostrando o arranjo espacial das camadas (Fonte: <http://www.webbee.org.br/pesquisa/palinologia.pdf>).

A estrutura do grão de pólen é importante em apicultura, particularmente para a classificação da origem botânica do pólen e do mel. Esta classificação é efetuada por análise microscópica dos grãos de pólen e requer uma avaliação sistemática da sua estrutura. Podemos encontrar estruturas muito diversas com várias formas; as mais frequentes são estruturas perfuradas, faveolada, granulada, verrugada, gemada, reticulada, estriada entre muitas outras. Na Figura 4 apresenta-se uma imagem obtida para o pólen apícola de *Cistus ladanifer*. [7]

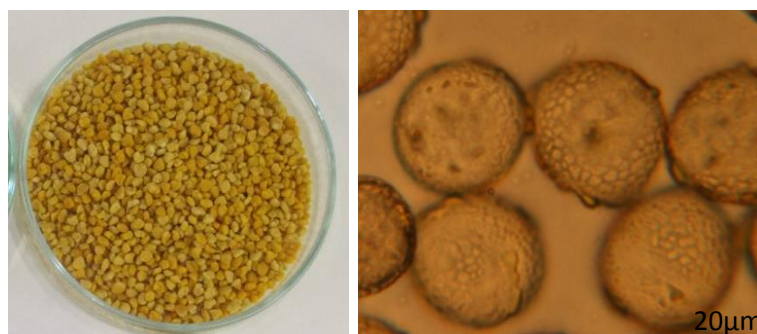


Figura 4- Pólen apícola e imagem ao microscópio (*Cistus ladanifer*).

1.7. Pão de abelha

Após capturado o pólen nas flores e transportado para o interior da colmeia, as abelhas adicionam-lhe mel e enzimas digestivas para posterior armazenamento e compactação nos favos, dando-se início a uma fermentação láctica que lhe confere um maior poder de conservação e o transforma em “pão de abelha”. Esta é efetivamente a fonte principal de nutrientes das abelhas, rica em proteínas, minerais, gorduras e outras substâncias fundamentais para o desenvolvimento da colónia e manutenção da sua produtividade. No interior da colmeia é fácil localizar este produto pelo seu aspeto colorido, encontrando-se normalmente no primeiro quadro após a zona de criação, o que permite uma rápida alimentação das larvas.[27] O “pão de abelha” é uma fonte de proteínas, rica em aminoácidos essenciais, vitaminas (C, B1, B2, E, H), pigmentos, enzimas como a amílase e fosfatase, flavonoides e diversos minerais como cálcio, ferro, magnésio, fósforo, entre outros.[28] Apesar da sua origem, a composição proteica do pólen é mais elevada que a encontrada no “pão de abelha”, no entanto, esta diferença não se reflete no seu valor nutricional, pois apesar de conter menos proteínas que o pólen a deterioração da estrutura de grão devido ao processo de fermentação ocorrido, permite que o conteúdo proteico esteja mais biodisponível.[27;28] A elevada quantidade de ácido láctico no “pão de abelha”, aproximadamente seis vezes mais elevada que no pólen, reflete-se num grau de acidez mais acentuado e conseqüentemente num valor de pH mais baixo. Esta acidez do “pão de abelha” é responsável pela sua autoconservação pois inibe o crescimento dos bolores e outros microrganismos o que não se verifica na conservação do pólen que requer uma secagem logo após a recolha para evitar a sua degradação.[27]



Figura 5- Amostra de “pão de abelha”.

1.7.1. Propriedades

A combinação de várias substâncias biologicamente ativas presentes no “pão de abelha” tem potenciado os estudos para a sua aplicação como suplemento alimentar na prevenção e tratamento de diversas doenças. O seu teor elevado em vitamina B melhora o metabolismo e o funcionamento do sistema nervoso e estimula a produção de glóbulos vermelhos nas crianças, mas também nos adultos.[28] O seu consumo, bem como também o de pólen, apresenta um efeito positivo sobre o sistema imunitário e antioxidante das pessoas, aumentando o desempenho físico dos desportistas na medida em que fornece uma maior fonte de energia e retarda o processo de envelhecimento. Adicionalmente, são também associados ao consumo de “pão de abelha” efeitos calmantes e capacidade de indução do apetite.[28]

Em apiterapia o “pão de abelha” é usado com êxito em combinação com outros métodos de tratamento para pessoas da terceira idade e para crianças, recomendando-se o consumo de “pão de abelha” em casos de anemia, hepatite, diabetes e perturbações do tubo digestivo, tais como, colites, prisão de ventre e diarreia. Adicionalmente, refere-se a capacidade do consumo de “pão de abelha” na diminuição do índice de colesterol, melhoria da função hepática e vesicular e redução a tensão arterial. [27;28] Muitos especialistas em saúde referem-se ao “pão de abelha” como um alimento completo, confirmando a relevância da sua aplicação milenar, como um suplemento consumido por muitas culturas em todo o mundo. Hipócrates, chamado o “pai da medicina moderna”, usava-o como substância de cura há mais de 2500 anos atrás.[27;28]

1.7.2. Produção, colheita e armazenamento

O “pão de abelha” é de digestão mais fácil que o pólen apícola, e também de fácil conservação, mas a sua produção requer algum conhecimento por parte do apicultor. Se for colhido de maneira apropriada pode-se reduzir significativamente os níveis de stresse da colónia, associados com a redução da quantidade de proteína disponível. Para produzir “pão de abelha” em grandes quantidades, é necessário condicionar a presença da rainha numa parte da colmeia. Nessa parte da colmeia, uma vez que não existe criação que consuma o “pão de abelha”, é produzida uma quantidade excedente. Deste modo, pode-se colher facilmente os favos em que o pão de abelha está maduro, sem condicionar o desenvolvimento da colónia.

O pão de abelha pode depois ser retirado do interior do favo, com instrumentos adequados como os furadores ou ainda por trituração do favo congelado. A sua conservação, apesar de mais fácil que para o pólen, requer também uma secagem para redução do teor de humidade, evitando-se assim o eventual desenvolvimento de bolores. O pão de abelha fresco pode também ser conservado no congelador, ou misturado com mel. A concentração de pão de abelha no mel não deve ultrapassar os 15%. O consumo de pão de abelha pode ser efetuado diretamente ou pode ser adicionado a outros alimentos como iogurtes. Em geral, o pão de abelha é um produto mais saboroso e é mais digerível que as cargas de pólen. [7]

1.8. Composição química do “pão de abelha”

A utilização do “pão de abelha” é particularmente relevante para consumo como suplemento alimentar devidos às suas potencialidades nutracêuticas e conseqüentemente devido à sua composição química. De um modo geral é um produto constituído por água, proteínas, aminoácidos livres, lípidos, açúcares, fibras, sais minerais, vitaminas e pigmentos.

1.8.1. Água

O conteúdo em água é o fator que mais influencia a capacidade de conservação do “pão de abelha”. A quantidade de água do pão de abelha fresco é variável entre 12-20% dependendo muito da época de recolha, do clima e do maneio do produto.[7]

1.8.2. Proteínas e aminoácidos

O “pão de abelha” é rico em prótidos, proteínas e aminoácidos livres. A quantidade de proteínas varia muito com a origem floral. O conteúdo médio de proteínas é de 18% mas o mais interessante, e o que eleva em grande parte o valor nutritivo do “pão de abelha” é que contém todos os aminoácidos proteinogénicos. O perfil de aminoácidos é importante também para a abelha, e é sabido que esta, quando é possível, seleciona o pólen não em função da quantidade de proteínas mas sim em função da natureza e proporção dos aminoácidos presentes.[3;7]

1.8.3. Lípidos

A quantidade total de lípidos no “pão de abelha” é muito variável, e como para as proteínas, depende da espécie botânica. Na literatura encontra-se uma variabilidade de valores para a composição lipídica, variando entre 1 a 15%. Na sua composição encontram-se grande parte de triglicéridos com predominância de ácidos gordos insaturados. O ácido gordo maioritário, segundo alguns autores, é o ácido linoleico, um ácido gordo insaturado com 18 átomos de carbono e considerado um ácido gordo essencial na nutrição humana. No entanto, também se encontra o ácido palmítico, o ácido oleico e o ácido linolénico.[29]

Para além dos triglicéridos e dos ácidos gordos, estão presentes outros compostos de carácter lipídico como esteróis, pigmentos e carotenóides.[7]

1.8.4. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são a porção maioritária do “pão de abelha”, chegando até 60% do total. Este grupo inclui açúcares, algum amido e fibra. O pólen, procedente das anteras das flores, contem de forma natural uma certa quantidade de açúcares, não muito grande, que incrementa quando é recolhido pelas abelhas devido ao néctar que as abelhas usam para aglutinar os grãos e formar a carga. Segundo a literatura foram identificados 15 açúcares diferentes entre monossacáridos, dissacáridos e trissacáridos. A glucose e a frutose, presentes também no mel, são os açúcares encontrados em maior percentagem observando-se também alguns dissacáridos como a sacarose e maltose. A percentagem de trissacáridos é muito pequena, inferior a 1%. [7]

1.8.5. Compostos fenólicos

Um outro grupo de substâncias observado em quantidades significativas no “pão de abelha” e cada vez mais estudado são os flavonóides, uma família de compostos químicos do tipo fenólico, que importa implicações benéficas para a saúde. Alguns autores ponderam também a sua utilização como marcadores da origem floral, o que serviria para detetar fraudes relacionadas com a origem polínica.

Os compostos fenólicos incluem maioritariamente ácidos fenólicos simples, flavonas, flavonóis, flavanonas e di-hidroflavonois mas também outros compostos derivados. Todas estas substâncias são classificadas como metabolitos secundários de grande importância com diversas potencialidades nomeadamente como antioxidantes. Esta atividade antioxidante dos compostos fenólicos e dos seus ésteres depende muito do número de grupos hidroxilo existente na molécula. A presença do grupo carboxilato, um aceitador de densidade eletrónica por efeito mesomérico, confere aos derivados hidroxilados do ácido benzóico uma menor tendência para se comportarem como dadores de prótons, comparativamente aos derivados hidroxilados do ácido cinâmico. [30]

1.8.6. Vitaminas

As vitaminas encontram-se no “pão de abelha” em proporções mais elevadas comparativamente ao pólen, principalmente a vitamina C e as vitaminas do grupo B. A quantidade e diversidade vitamínica está relacionada, uma vez mais, com a espécie botânica que lhe deu origem. A vitamina E, pertencente a um grupo de compostos estruturalmente relacionados designados como tocóis também está presente no “pão de abelha”. São antioxidantes fenólicos naturais presentes em óleos vegetais, sendo responsáveis por algumas das propriedades benéficas dos alimentos. Podem neutralizar os radicais de forma eficaz, protegendo o organismo, e mais especificamente evitar o ataque pelos radicais livres dos ácidos gordos poli-insaturados. São também importantes a nível intracelular, uma vez que a sua presença aumenta a resistência das membranas e impede que estas sejam lesadas, uma vez mais através da neutralização de radicais livres.[31;32]

1.9. Técnicas utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas várias técnicas, como espectroscópicas, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e voltametria de impulso diferencial, apresentando-se uma descrição sumária destas duas últimas metodologias analíticas, uma vez que são técnicas com uma maior especificidade.

1.9.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Cromatografia líquida de alta eficiência (anteriormente designada por cromatografia líquida de alta pressão), HPLC, é uma técnica cromatográfica utilizada para separar os componentes de uma mistura e assim identificar e quantificar cada um dos componentes. Em geral, o método envolve uma amostra de líquido que passa ao longo de um material adsorvente sólido empacotado numa coluna, utilizando um caudal de solvente líquido. Cada analíto da amostra interage de forma ligeiramente diferente com o material adsorvente, retardando assim o fluxo dos analítos. Se a interação é fraca, os analítos saem da coluna num curto espaço de tempo, e, se a interação é forte, então o tempo de saída, eluição, é longo. O esquema de um instrumento de HPLC geralmente inclui um amostrador, bombas e um detetor. Vários detetores são de uso comum, tais como UV/Vis, matriz de díodos (DAD), índice de refração (RI) ou com base em espectrometria de massa.[33] Neste trabalho foi utilizado o detetor de índice de refração.

1.9.1.1. Detetor de Índice de Refração (RI)

O detetor de índice de refração (RI) mede mudanças no índice de refração. Uma célula de vidro é dividida em duas câmaras (células). O fluxo que sai da coluna do HPLC passa através da “célula da amostra” enquanto a outra, chamada “célula de referência”, é cheia apenas com a fase móvel. Quando o efluente que passa pela célula da amostra não contém analíto, o conteúdo das duas células é o mesmo. Nesse caso, quando um feixe de luz incide sobre as células, o feixe observado não sofre desvio. Mas se o efluente contiver quaisquer componentes diferentes dos da fase móvel ocorrerá um desvio do feixe devido à diferença nos índices de refração nos líquidos. Medindo-se essa diferença a presença dos componentes pode ser observada.

O detetor de índice de refração é menos sensível que o detetor de ultravioleta, sendo esta a principal razão pela qual ele é menos usado do que este, no entanto possui algumas vantagens como para compostos que não absorvem luz ultravioleta tais como os açúcares, álcoois ou iões inorgânicos ou para os casos em que o solvente absorve na região ultravioleta. Adicionalmente a intensidade observada comum de índice de refração é proporcional à concentração do analíto. Por essas vantagens, o índice de refração é usado com frequência para detecção de açúcares.[34]

1.9.2. Técnicas voltamétricas

As técnicas voltamétricas permitem a determinação de componentes eletroativos, isto é, que podem ser oxidados ou reduzidos. Estas técnicas requerem o recurso a uma célula eletroquímica, geralmente constituída pela solução, o eléctrodo de trabalho onde ocorre a reação, o eléctrodo de referência, cujo potencial é fixo e constante e um eléctrodo auxiliar. O eléctrodo de trabalho pode atuar como um dador (para a redução) ou recetor (para a oxidação) de eletrões transferidos para ou de espécies em solução, segundo apresentado na equação. 1,



onde O é a espécie oxidada e R a reduzida.

O objetivo destas técnicas, onde se controla o potencial ao longo do tempo, é obter uma resposta proporcional à concentração na solução. Esta reação vai ocorrer numa região de potencial em que a transferência eletrónica é favorável termodinâmica ou cineticamente.[35] Neste trabalho é utilizada a voltametria de diferencial impulso para quantificação dos níveis de vitamina E.

1.9.2.1. Voltametria de impulso diferencial

As técnicas voltamétrica por impulsos baseiam-se na medida da corrente ao longo do tempo após a aplicação de um degrau de potencial. A corrente não é medida de forma contínua, mas em intervalos de tempo predefinidos.

Estas técnicas foram desenvolvidas inicialmente para elétrodos de gota de mercúrio, já que sincronizando o crescimento da gota com os impulsos iria reduzir-se a contribuição da corrente capacitiva, por amostragem da corrente no fim de vida da gota.

Após a aplicação do impulso de potencial, a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a faradaica. Este tipo de amostragem tem a vantagem de aumentar a sensibilidade da técnica. Em elétrodos sólidos, há uma vantagem adicional de discriminação contra o bloqueamento da reação de eletrodo por adsorção. Entre as diversas técnicas de voltametria de impulso, a principal diferença reside na forma dos picos e do modo como se faz a análise da corrente.

A voltametria de impulso de diferencial, DPV, é uma técnica muito útil na medição de concentrações reduzidas de espécies orgânicas e inorgânicas. Nesta técnica os impulsos de potencial de amplitude fixa (10-100 mV), ΔE , são sobrepostos a uma rampa de potencial que aumenta de forma linear com o tempo. A corrente é medida imediatamente antes, 1, da aplicação e no final do impulso, 2 (Figura 6 (a)).

O instrumento regista a diferença de intensidade de corrente, Δi , em cada impulso, como função do potencial aplicado. Sendo a DPV uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é um pico (Figura 6 (b)).[35;36]

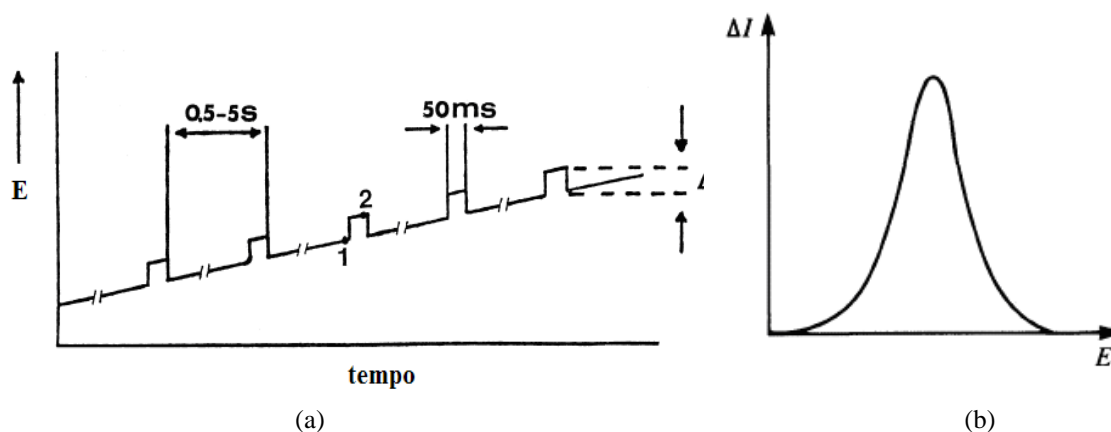


Figura 6 - Voltametria de impulso diferencial: (a) – perfil de aplicação de potenciais; (b) – voltamograma diferencial de impulso.

Para além das inúmeras vantagens apresentadas por esta técnica salientam-se, o baixo limite de deteção, cerca de 10^{-8} moldm⁻³ e a resposta na análise com elétrodos sólidos, especialmente envolvendo compostos orgânicos. Estes compostos adsorvem fortemente à superfície do elétrodo, logo, através de uma técnica diferencial pode-se ultrapassar este problema, já que a técnica discrimina os efeitos que são mais ou menos constantes antes e depois da aplicação do impulso.[35;36]

1.10. Objetivos

As potencialidades da aplicação do “pão de abelha” como suplemento alimentar e como nutracêutico depende em grande parte da riqueza da sua composição química a qual varia diretamente com a flora da região e com a época de recolha por parte das abelhas.

Este trabalho tem por objetivo avaliar as características físico-químicas do “pão de abelha” provenientes do nordeste transmontano de Portugal no que se refere ao seu valor nutritivo e à sua composição em substâncias com potencialidade bioativas, em particular os tocoferóis e os compostos fenólicos. A avaliação destes parâmetros foi realizada por técnicas espectroscópicas, cromatográficas e eletroquímicas. Com os resultados pretende-se correlacionar a composição química com a atividade biológica, definindo qual as amostras com mais potencial bioativo. Este trabalho e os resultados obtidos são uma primeira abordagem a este produto da colmeia, uma vez que ainda não existe trabalhos anteriores.

Assim sendo, como objetivos específicos, podem-se considerar os seguintes pontos:

- Identificação da origem polínica das amostras de “pão de abelha”;
- Avaliação dos parâmetros nutricionais das amostras de “pão de abelha”, nomeadamente, a humidade, cinzas, gorduras, proteínas e açúcares redutores, utilizando neste último caso a cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliação dos tocoferóis por técnicas eletroquímicas, nomeadamente a voltametria de impulso diferencial (DPV);
- Extração da componente fenólica do “pão de abelha”, utilizando soluções hidro- etanólicas de água/etanol;
- Determinação dos teores fenóis totais e flavonoides totais (flavonas/flavonois; flavanonas/di-hidroflavonois) por técnicas espectroscópicas;
- Determinação da atividade biológica dos extratos fenólicos através da avaliação da sua capacidade e potencialidades antioxidante por métodos espectroscópicos.



Capítulo 2

MATERIAL E MÉTODOS

- 2.1. Amostragem
- 2.2. Solventes e reagentes
- 2.3. Análise polínica
- 2.4. Humidade
- 2.5. Cinzas
- 2.6. Proteínas
- 2.7. Gorduras
- 2.8. Açúcares
- 2.9. Tocoferóis
- 2.10. Compostos fenólicos
- 2.11. Atividade antioxidante

Neste capítulo descreve-se a origem e o tratamento na preparação das amostras a analisar, os reagentes e os equipamentos utilizados no trabalho, assim como, os procedimentos e as condições experimentais aplicadas na avaliação do “pão de abelha”.

2.1. Amostragem

Para este estudo foram coletadas 17 amostras de “pão de abelha” (BB) na região do Nordeste transmontano. A estas juntou-se uma amostra comercial de “pão de abelha” (BBC) e uma amostra de pólen (AP) proveniente também da mesma região. A amostragem foi efetuada no interior da colmeia realizando-se um corte de uma área de favos, junto à criação, onde as abelhas armazenam o pólen. Após a recolha, o “pão de abelha” foi removido do interior do favo, triturado, homogeneizado, liofilizado e conservado num exsicador. A distribuição das amostras está apresentada na Figura 7.

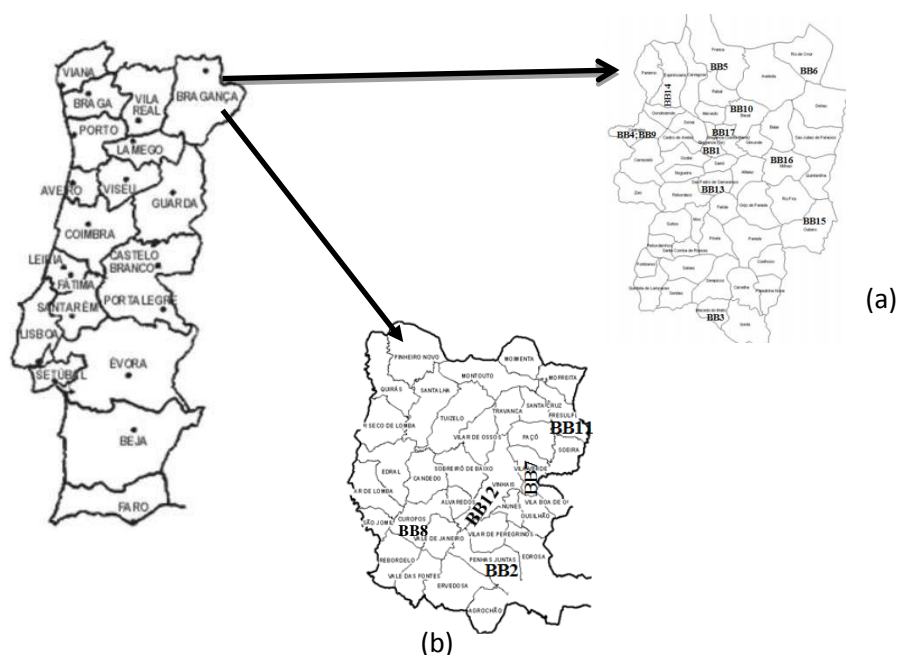


Figura 7 - Origem geográfica das amostras de “pão de abelha” (a) freguesias de Bragança; (b) freguesias de Vinhais.

2.2. Solventes e reagentes

Para a execução experimental, utilizou-se como solventes metanol e etanol (Panreac, p.a), acetonitrilo (Fisher Scientific, qualidade HPLC), *n*-hexano (Lab-Scan, 95% qualidade HPLC) e etanol (Panreac, qualidade HPLC). Como reagentes utilizaram-se, carbonato de sódio, hidróxido de sódio, reagente de Folin-Ciocalteu, ácido acético glacial, ácido sulfúrico, ácido fórmico, adquiridos à Panreac (Barcelona, Espanha). O cloreto de alumínio foi adquirido à Riedel-de-Häen (Alemanha) e o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) à Fluka (Buchs, Suíça). O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foi obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA).

Os padrões utilizados para a quantificação dos compostos fenólicos, como o ácido gálico, a quercetina e a pinocembrina, foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA), assim como os tocoferóis (α -, β -, γ -, e δ -isoformas) e os açúcares (arabinose, frutose, glucose, sacarose, turanose, maltose e trealose).

Todos os restantes produtos químicos e solventes foram de grau analítico e adquiridos a partir de fornecedores comuns. A água foi tratada através de um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.3. Análise polínica

A forma, o tamanho e a estrutura do grão de pólen, e com menor especificidade, a cor, permitem identificar as espécies botânicas de que provêm os grãos de pólen. As preparações microscópicas das diferentes cargas do pólen realizam-se mediante a acetólise do pólen, a qual permite separar os grãos de pólen e eliminar a intina e outros compostos orgânicos.[37;38]

O método acetolítico utilizado consiste em colocar 0,2 g de amostra num tubo de ensaio, e adicionar 5 mL da mistura acetolítica (anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado numa proporção de 9:1). Esta mistura é mantida num banho-maria, previamente aquecido a 90°C, durante 5 minutos com agitação regular. Em seguida, procede-se à centrifugação durante 10 minutos a 2500 rpm, desprezando-se o sobrenadante, e repetindo o mesmo procedimento mas agora com água destilada, o que permitirá lavar a amostra dos reagentes da acetólise. Após desprezar novamente o

sobrenadante, adiciona-se 5 mL de uma mistura de glicerina e água destilada numa proporção 1:1, deixando repousar 24h para que o grão de pólen recupere a sua forma. Posteriormente realizam-se as preparações microscópicas, selando-se com parafina ou verniz.

A análise microscópica é realizada num microscópio óptico LEICA DMRD, com câmara de video integrada Leica DC100, e utilizando um software específico de captura de imagem LEICA QWIN Std. versão 2.3. A identificação, é realizada com o apoio a chaves botânicas de identificação e com a observação da morfologia do grão de pólen, efetuando-se uma contagem de 400 grãos de pólen para a quantificação percentual.

2.4. Humidade

A determinação da humidade requer a utilização de um método com temperaturas controladas, evitando-se a desidratação das moléculas de frutose, e consequentemente um resultado superior ao real. O teor de humidade das amostras foi avaliado pelo método gravimétrico até peso constante. Para tal pesou-se inicialmente 2 g de amostra triturada e homogeneizada, colocando-se na estufa a 60°C, durante 2 horas. Este procedimento foi realizado em triplicado, e os resultados vêm expressos em percentagem.[39]

2.5. Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada por um método gravimétrico após incineração. Pesou-se num cadinho de porcelana 2 g de amostra liofilizada, colocando-se numa mufla a 600°C durante 3 horas. Após arrefecimento, o cadinho foi pesado para determinar a quantidade de cinzas remanescentes. Este procedimento, repetido até peso constante, foi efetuado em triplicado expressando-se os resultados em percentagem. [40]

2.6. Proteínas

Para a determinação do teor em proteínas foi aplicado o método kjeldahl desenvolvido por Johann Kjeldahl em 1883, e que consiste na determinação indireta, baseando-se na quantificação do azoto orgânico total. Esse processo iniciou-se com a digestão da 2 g de amostra liofilizada por adição de ácido sulfúrico e de um catalisador metálico que acelera o processo de oxidação da matéria orgânica. Após a degradação da amostra e transformação do azoto em sulfato de amónio segue-se um processo de neutralização, de destilação e finalmente a titulação do amónio libertado. Para a conversão do teor de azoto em proteína total utilizou-se um fator de 6.25, exprimindo-se os resultados em percentagem de proteína.[42] Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.7. Gorduras

A determinação da componente lipídica presente nas amostras de “pão de abelha” foi efetuada por extração sólido-líquido utilizando como solvente extrator o éter dietílico. O processo de extração foi realizado num sistema de Soxhlet durante 4 horas, Figura 8, utilizando-se uma quantidade de amostra liofilizada de aproximadamente 2 g. Após a extração, a solução resultante foi levada à secura num evaporador rotativo, pesando-se de seguida a gordura obtida, exprimindo-se os resultados em percentagem de gordura. Os ensaios foram realizados em triplicado. Este extrato lipídico foi armazenado a -20°C para análise posterior do teor em tocoferóis (vitamina E).[41]

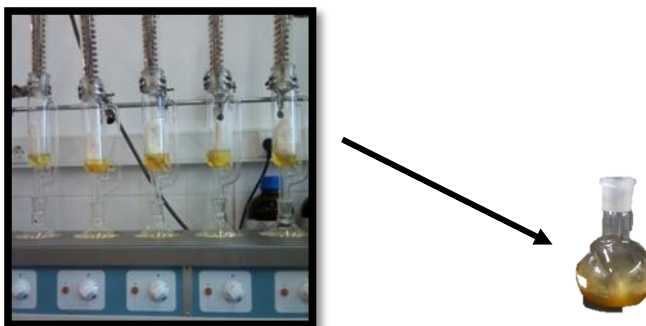


Figura 8 - Extração de gorduras pelo método de Soxhlet.

2.8. Açúcares

2.8.1. Preparação das amostras

A quantificação de açúcares livres foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI). Previamente foi necessário proceder-se a uma diluição, pesando-se 2 g de “pão de abelha” e adicionando-se 30 mL de água desionizada, sob agitação durante 30 minutos. Em seguida, filtrou-se a mistura com papel de filtro para um balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se 12,5 mL de metanol e aferindo-se o volume final com água desionizada. Posteriormente filtra-se com filtros millipore para vials de 2 mL. O volume injetado foi de 20 μ L.[44]

2.8.2. Condições cromatográficas

A determinação dos açúcares foi realizada num cromatógrafo integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30°C (forno Grace 7971 R). Como fase móvel utilizou-se uma mistura de acetonitrilo/água 80:20 (v/v), com um caudal de 1,5 mL/min. A identificação dos açúcares foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões, nomeadamente, arabinose ($y=28,077x-21,823$; $R^2=0,989$), frutose ($y=89,964x-109,73$; $R^2= 0,991$), glucose ($y=100,87x-136,02$; $R^2=0,995$), sacarose ($y=69,035x-0,0126$; $R^2=0,97$), turanose ($y=62,963x-2,5296$; $R^2=0,97$), maltose ($y=35,532x-17,473$; $R^2=0,95$) e trealose ($y=71,685x-43,125$; $R^2=0,98$). Os resultados foram expressos em g /100 g de massa seca. A reta de calibração foi estimada pelo método de padrões externos, utilizando-se numa gama de concentrações de 0,375 a 40 mg/mL. A análise foi realizada em triplicado.

2.9. Tocoferóis

2.9.1. Preparação das amostras

Para a quantificação de α , β , γ , δ -tocoferol, foram preparadas soluções das amostras dissolvendo-se uma quantidade de extrato numa solução contendo 0,2 mL de H_2SO_4 , 0,1 mol dm^{-3} em etanol, 3 mL de electrólito de suporte (perclorato de tetrabutílamónio) 0,25 mol dm^{-3} em etanol e completando o volume (25 mL) com hexano, obtendo-se uma proporção de hexano/etanol de 4:6 (v:v). A concentração final dos extratos foi de 2 mg/mL. Estas soluções foram avaliadas por voltametria de impulso diferencial num intervalo de potencial de 0 e 1 V, com uma velocidade de 0,03 Vs^{-1} e uma amplitude de impulso de 0,06 V. A quantificação foi efetuada através da análise da intensidade dos processos de oxidação observados nos voltamogramas e comparando com as retas de calibração de α -tocoferol ($y=0,0474x+0,1282$; $R^2=0,997$), β , γ -tocoferol ($y=0,0482x+0,365$; $R^2=0,98$) e δ -tocoferol ($0,0209x+0,0091$; $R^2=0,999$) obtidas para os padrões comerciais, num intervalo de concentração de 1-20 $\mu\text{g/mL}$.

2.9.2. Condições eletroquímicas

A composição em vitamina E (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol) foi analisada no extrato lipofílico de “pão de abelha”, aplicando-se a voltametria de impulso diferencial (DPV), uma técnica sensível a estes compostos e utilizada anteriormente noutros extratos naturais.[45] As medições voltamétricas foram efetuadas num potencióstato/galvanostato Autolab® PGSTAT 302 controlado por um computador com software GPES (General Purpose for Electrochemical Systems) da Autolab®.

Os estudos foram realizados numa célula eletroquímica com uma configuração de três elétrodos, Figura 9, constituída por um elétrodo de referência de Ag/AgCl saturado com KCl 3 mol dm^{-3} (Methrom), um elétrodo de trabalho de carbono vítreo, com uma área de $\phi = 0,314 \text{ cm}^2$ (Bioanalytical Systems) e uma folha de platina como contra - elétrodo.



Figura 9 - Célula eletroquímica de três elétrodos.

Antes de cada utilização, o elétrodo de trabalho foi polido numa suspensão aquosa de alumina ($0,3 \mu\text{m}$, Beuhler) sob um disco de lixa fina Master-TEX (Beuhler) e lavado com água desionizada. Posteriormente, aplicou-se um tratamento químico, colocando-se o elétrodo num banho de ultrassons, primeiro imerso numa solução de $\text{HCl } 6 \text{ mol dm}^{-3}$ (1 minuto) e depois em MeOH (1 minuto). Este procedimento de limpeza da superfície eletroativa foi efetuado sempre, antes de cada medição, de modo a remover quaisquer substâncias orgânicas adsorvidas.

2.10. Conteúdo fenólico

2.10.1. Extração

Para efetuar os estudos de quantificação do teor de compostos fenólicos nas amostras de “pão de abelha” foi necessário realizar uma extração prévia desta componente. Para a extração utilizou-se uma amostra homogénea e liofilizada (2 g) diluída numa solução de 80% de etanol (1:10, m:v) sob agitação à temperatura ambiente, durante 6 horas. Após este período a mistura foi filtrada e o resíduo re-extraído nas mesmas condições. Após a segunda extração os dois extratos etanólicos foram combinados, concentrados no evaporador rotativo a 40°C , liofilizados e conservados no exsiccador até análise posterior.

2.10.2. Fenóis totais

A avaliação do conteúdo em fenóis totais nos extratos de “pão de abelha” foi efetuada segundo o método descrito por Singleton.[46] A uma alíquota (0,5 mL) de extrato etanólico (1 mg de extrato seco/mL etanol) foi adicionado 0,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu's. Após 3 minutos adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio e ajustou-se o volume final para 5 mL com água desionizada. A solução foi depois aquecida durante 10 min a 70°C, recolhendo-se posteriormente para o escuro durante 30 minutos. No final mediu-se a absorvância a 760 nm num espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando 0,5 mL de etanol a 80% em detrimento da amostra. Os resultados finais foram expressos em equivalentes de ácido gálico, efetuando-se para isso uma reta de calibração com diferentes concentrações deste padrão, no intervalo de 0,03 a 0,5 mg/mL ($y=9,8463x+0,0718$; $R^2=0,992$). Os ensaios foram feitos em triplicado.

2.10.3. Flavonas e flavonóis

O conteúdo em flavonas e flavonóis foi determinado segundo o método descrito na literatura com algumas modificações.[47] A uma alíquota (2 mL) de extrato etanólico de “pão de abelha” (5 mg/mL) foi adicionada 0,2 mL de uma solução de cloreto de alumínio (2 % de cloreto de alumínio em 5 % de ácido acético glacial em metanol) e 2,8 mL de uma solução de 5% de ácido acético glacial em metanol. A solução final aguardou 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. De seguida mediu-se a absorvância a 415 nm num espectrofotómetro. Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento mas sem a adição de cloreto de alumínio. Como padrão, para o traçado da curva de calibração, foi utilizada uma solução de quercetina, num intervalo de concentrações de 0,0025 a 0,05 mg/mL ($y=33,835x+0,0312$; $R^2=0,994$). Os ensaios foram feitos em triplicado.

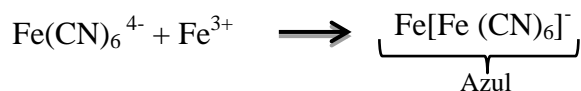
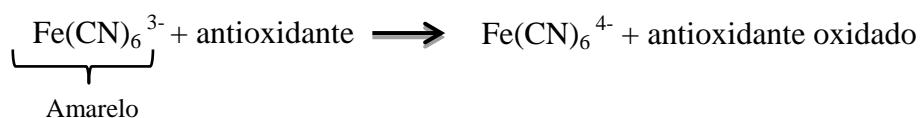
2.10.4. Flavanonas e di-hidroflavonois

As flavanonas e di-hidroflavonois foram determinadas segundo o método descrito por Cvec *et al.* com modificações.[54] A uma alíquota (0,5 mL) de extrato etanólico (0,5 mg/mL) foi adicionado 1 mL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0,5 g de DNP em 1 mL de ácido sulfúrico a 96 %, perfazendo com metanol para um volume final de 50 mL) e 1 mL de metanol. Esta solução foi depois aquecida num banho termostatizado a 50 °C durante 50 minutos, com agitação. Após este tempo colocou-se a solução no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 min e adicionou-se posteriormente 3,5 mL de uma solução de hidróxido de potássio (10% em 70% de metanol). De seguida retirou-se 0,5 mL da solução para um novo tubo onde se adicionou 24,5 mL de metanol, para perfazer um volume final de 25 mL. A avaliação da intensidade do complexo formado foi medida a 486 nm no espectrofotómetro. Para preparação do branco preparou-se uma solução segundo os mesmos procedimentos, excluindo a adição da amostra. Os resultados foram expressos em equivalentes de pinocembrina, efetuando-se uma curva de calibração com este padrão num intervalo de concentrações de 0,18 a 6 mg/mL ($y=0,1742x-0,0038$; $R^2=0,998$). Os ensaios foram feitos em triplicado.

2.11. Atividade antioxidante

2.11.1. Poder redutor

A presença de agentes redutores provoca a redução do complexo Fe^{3+} /ferrocianeto à sua forma ferrosa (Fe^{2+}). Em consequência, a formação de uma coloração azul avaliada a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a formação de iões Fe^{2+} . Esta reação é utilizada como metodologia de caracterização da capacidade antioxidante de extratos naturais (poder redutor), analisando-se o aumento de absorvância para determinadas concentrações de amostras. A cor amarela da solução em ensaio pode alterar para vários tons de verde e azul, dependendo do poder redutor de cada extrato. A química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pelas seguintes equações:[66]



Neste trabalho, a metodologia a aplicar para avaliar o poder redutor seguiu o procedimento descrito por Oyaizu, com algumas modificações.[48] Assim, misturou-se 1 mL do extrato da amostra (com diferentes concentrações) com 1,25 mL de uma solução de tampão fosfato de sódio com pH 6.6 e com 1,25 mL de ferrocianeto de potássio (0,2 mol⁻³). Após a adição, a mistura foi agitada vigorosamente e posteriormente incubada a 50 °C durante 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 1,25 mL de ácido tricloroacético a 10% seguindo-se um processo de centrifugação. No final retirou-se 1,25 mL do sobrenadante, e adicionou-se 1,25 mL de água destilada e 0,25 mL de cloreto férrico a 0,1%, medindo-se de seguida a absorvância a 700 nm num espectrofotómetro. Como padrão foi utilizada uma solução de ácido gálico num intervalo de concentrações de 0,0064 a 0,048 mg/mL ($y=34,207x-0,0443$; $R^2=0,9996$). Os ensaios foram feitos em triplicado.

2.11.2. Efeito bloqueador de radicais livres

O uso do ensaio do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) é um método usado regularmente para avaliar a capacidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres. O DPPH é um radical livre estável, capaz de aceitar um eletrão ou um átomo de hidrogénio, tornando-se num não radical dificilmente oxidável, Figura 10.[65] Devido a este eletrão desemparelhado, o DPPH apresenta uma forte absorvância a 517 nm. Se o eletrão emparelhar, essa absorvância diminui à medida que a reação entre as moléculas antioxidantes e os radicais de DPPH ocorre. Assim, quanto mais decresce a absorvância, maior será a atividade antioxidante do extrato sob estudo.[45]

A capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH foi aplicada de acordo com o descrito na literatura, com algumas modificações.[63] Para tal, numa placa de 96 poços, misturou-se 30 μL de extrato etanólico de cada amostra, com diferentes concentrações (0,03 – 1,67 mg/mL) com 0,15 mL de uma solução metanólica contendo os radicais de DPPH ($0,060 \text{ mmoldm}^{-3}$), onde repousou durante 45 minutos no escuro, à temperatura ambiente. A redução da concentração do radical de DPPH foi medida pela monitorização do decréscimo da absorvância a 515 nm num leitor de microplacas (ELX800 Microplate Reader Bio-Tek Instruments, Inc.). O efeito bloqueador do DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_A) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

em que A_A corresponde à absorvância da solução com extrato da amostra e A_{DPPH} à absorvância da solução de DPPH. Os resultados foram expressos através do valor EC50, correspondendo à concentração de extrato que bloqueia de 50% dos radicais de DPPH presentes na solução inicial. Para comparação foi usada uma solução padrão de ácido gálico.

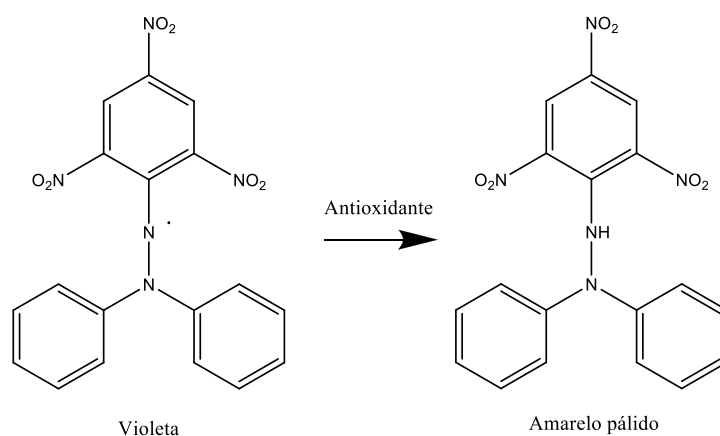


Figura 10 - Redução do DPPH.



Capítulo 3

Resultados e discussão

- 3.1. Análise polínica
- 3.2. Humidade
- 3.3. Cinzas
- 3.4. Proteínas
- 3.5. Gorduras
- 3.6. Açúcares
- 3.7. Tocoferóis
- 3.8. Compostos fenólicos
- 3.9. Atividade antioxidante

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização das amostras de “pão de abelha” e pólen do nordeste transmontano, nomeadamente quanto á sua caracterização palinológica, aos parâmetros nutricionais tais como, humidade, cinzas, proteínas, gorduras e açúcares livres, e á análise composicional através da avaliação do conteúdo fenólico e do teor em tocoferóis. A atividade antioxidante das amostras é também aqui apresentada através do poder redutor e do efeito bloqueador de radicais livres (DPPH).

3.1. Análise polínica

A identificação das amostras em estudo requer inevitavelmente a análise do perfil de pólen do “pão de abelha” para determinar a sua origem floral.

Na tabela 1 estão apresentados os diversos tipos de pólen identificados e a sua frequência nas amostras. Pelos resultados verifica-se que as amostras de “pão de abelha” apresentam características típicas de um produto com perfil polínico multifloral identificando-se pólenes provenientes de 13 famílias, Figura 11. É, no entanto, claro que a família Fabaceae, leguminosas, é a mais comum (>45% de grãos de pólen), encontrando-se em mais de metade das amostras como pólen dominante e nas restantes como pólen secundário. Adicionalmente a família Poaceae, gramíneas, e Ranunculaceae, surgem também em percentagens consideráveis em várias amostras. Os restantes pólenes surgem como minoritários (3 e 15%), não deixando com isso de ser menos importante pois, na maioria dos casos, trata-se de plantas que produzem pouco pólen (entomófilas).[50] A amostra do pólen apícola apresenta uma composição bastante específica, com mais de 99% dos pólenes pertencente à família das Cistaceae, *cystus ladanifer*, uma planta bastante comum na região. A amostra de “pão de abelha” comercial é também ela distinta das amostras do nordeste transmontano, possuindo uma maior percentagem na família Mirtaceae, 82%, particularmente do género *eucalyptus*. Pode-se também verificar que algumas amostras pertencentes à mesma região apresentam uma composição muito semelhante, como é o caso das BB4 e BB9.

Tabela 1 - Percentagem das famílias identificadas nas amostras de "pão de abelha".

Amostras	Família												
	Fabaceae	Poaceae	Ranunculaceae	Boraginaceae	Asteraceae	Campanulaceae	Amaranthaceae	Hyacinthaceae	Mirtaceae	Ericaceae	Malvaceae	Lamiaceae	Cistaceae
BB1	49,2	22,4	7,4	2,2	4,0	2,7	2,2	N/D	N/D	2,2	4,0	2,2	N/D
BB2	50,4	6,0	24,3	10,5	2,4	2,1	2,1	N/D	N/D	N/D	N/D	2,1	N/D
BB3	68,7	3,2	8,8	0,6	7,1	0,6	1,9	N/D	N/D	1,5	6,3	1,3	N/D
BB4	59,4	7,2	7,0	0,7	1,8	1,4	18,9	0,2	0,7	1,2	0,7	0,7	N/D
BB5	47,7	10,9	17,5	1,3	1,1	0,9	15,3	N/D	N/D	2,2	1,3	1,8	N/D
BB6	70,4	4,5	13,6	0,9	0,7	0,5	6,8	N/D	N/D	1,1	0,7	0,9	N/D
BB7	53,9	10,4	14,5	1,2	3,1	0,8	7,2	N/D	N/D	3,1	2,1	3,7	N/D
BB8	41,5	6,8	7,7	1,9	3,9	1,2	19,3	N/D	N/D	5,8	6,6	5,4	N/D
BB9	59,9	8,9	10,7	0,9	2,7	4,4	6,2	N/D	N/D	4,1	1,2	0,9	N/D
BB10	40,4	17,6	14,1	4,4	1,8	7,6	3,5	N/D	N/D	3,5	2,6	4,4	N/D
BB11	58,3	23,1	7,7	1,9	1,0	3,3	1,9	N/D	N/D	1,0	1,0	1,0	N/D
BB12	38,4	20,0	5,0	5,0	2,5	3,7	6,2	N/D	N/D	1,7	7,5	10,0	N/D
BB13	49,1	19,5	5,9	9,8	2,9	2,0	1,2	N/D	N/D	1,8	4,9	2,9	N/D
BB14	33,5	26,6	8,6	8,6	12,0	2,4	2,7	N/D	N/D	1,4	2,6	1,5	N/D
BB15	56,9	17,8	6,0	10,0	4,0	1,0	0,8	N/D	N/D	1,8	0,6	1,2	N/D
BB16	43,2	19,6	16,0	7,2	5,4	2,7	1,3	N/D	N/D	1,3	1,6	1,8	N/D
BB17	32,2	24,1	14,1	9,8	8,0	1,8	3,6	N/D	N/D	1,4	0,5	4,5	N/D
BBC	17,6	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	82,4	N/D	N/D	N/D	N/D
AP	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	99,0

N/D- não detetado

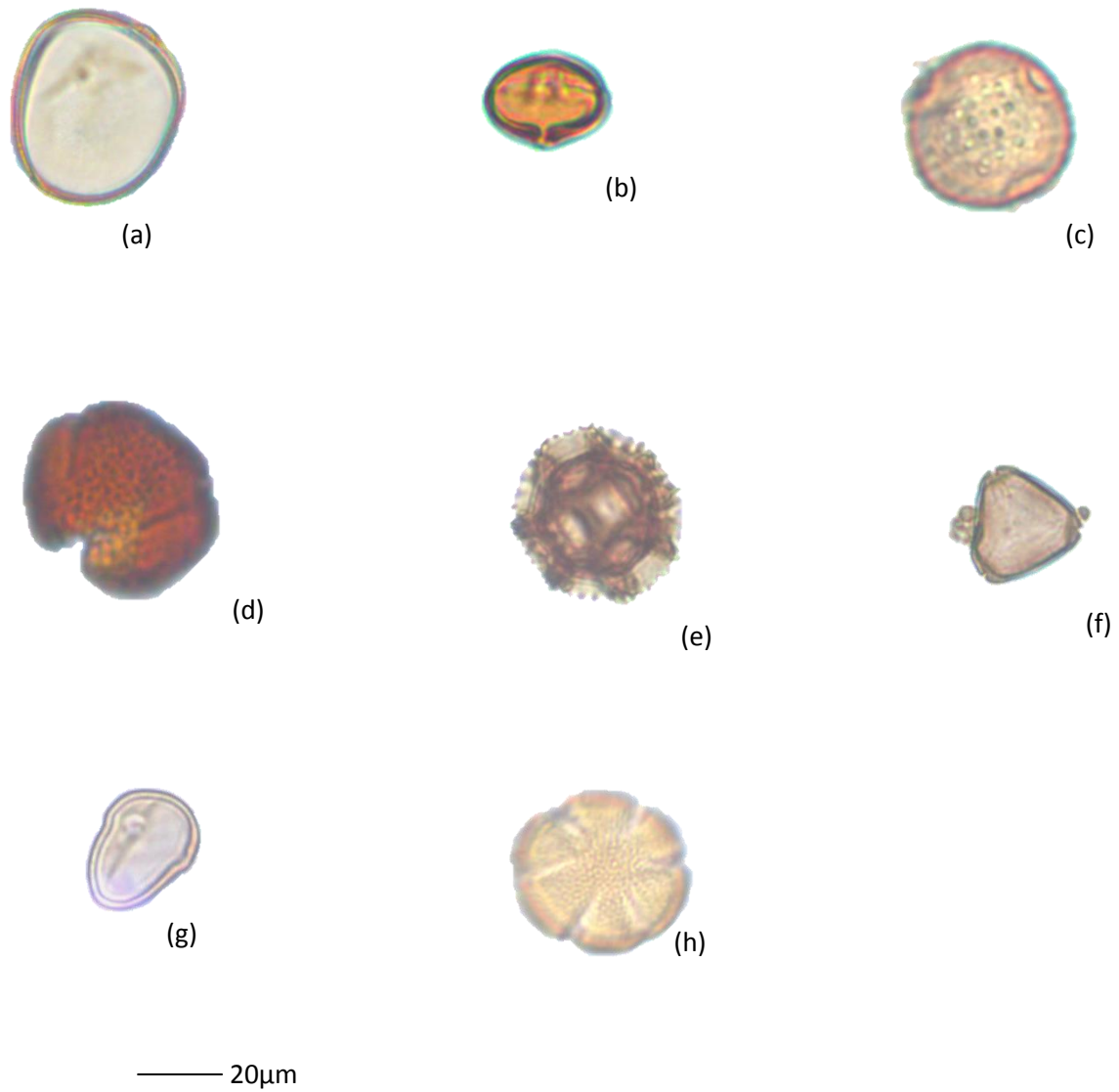


Figura 11 - Fotografias de tipos polínicos das amostras de “pão de abelha”. (a) Poaceae; (b) Fabaceae; (c) Campanulaceae; (d) Ranunculaceae; (e) Asteraceae; (f) Mirtaceae; (g) Boraginaceae; (h) Lamiaceae.

3.2. Humidade

A humidade é um parâmetro importante para a qualidade deste tipo de produtos. Como se pode verificar pela Tabela 2, os valores encontrados para a humidade apresentam alguma variabilidade com níveis compreendidos entre os 9 e 19%. Este valor contrasta com o valor muito reduzido obtido para o “pão de abelha” comercial mas justifica-se pelo facto de as amostras recolhidas não terem sofrido qualquer tratamento, o que provavelmente foi o caso da amostra comercial. A variabilidade encontrada entre as amostras do nordeste transmontano pode ficar a dever-se à variabilidade das condições de colheita das amostras junto aos apicultores. O elevado valor de humidade obtido sugere que, para a comercialização, as amostras devem ser submetidas a um processo prévio de secagem. A redução do teor em humidade é particularmente sensível para a sua conservação, dado que o pólen está sujeito á proliferação de contaminações microbiológicas que podem inviabilizar o seu consumo e comercialização.

Tabela 2 - Parâmetros nutricionais das amostras de “pão de abelha”.

Amostras	Humidade %	Cinzas %	Proteínas %	Gorduras %	Arabinose (mg/g)	Frutose (mg/g)	Glucose (mg/g)	Total de açúcares (mg/g)
BB1	11,7 ± 0,3	4,1 ± 0,0	15,7 ± 0,5	3,6 ± 0,1	N/D	178 ± 5	83 ± 4	261 ± 6
BB2	12,0 ± 0,6	3,9 ± 0,1	20,9 ± 0,3	4,1 ± 0,2	N/D	223 ± 1	102 ± 1	325 ± 1
BB3	8,7 ± 0,5	4,5 ± 0,6	18,5 ± 0,2	6,1 ± 0,0	N/D	206 ± 3	114 ± 5	320 ± 6
BB4	9,7 ± 0,8	4,1 ± 0,3	18,0 ± 0,2	7,0 ± 0,4	N/D	190 ± 4	84 ± 1	273 ± 4
BB5	15,3 ± 0,1	7,4 ± 0,7	24,3 ± 0,2	5,2 ± 0,3	N/D	154 ± 6	93 ± 4	247 ± 7
BB6	16,0 ± 0,9	2,1 ± 0,0	16,3 ± 0,2	9,7 ± 0,3	N/D	170 ± 1	89 ± 1	260 ± 1
BB7	19,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	23,3 ± 0,2	16,8 ± 0,7	N/D	99 ± 8	69 ± 7	168 ± 11
BB8	16,2 ± 0,6	2,6 ± 0,1	19,5 ± 0,0	9,7 ± 0,3	N/D	262 ± 9	143 ± 5	405 ± 10
BB9	15,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1	20,7 ± 0,1	14,9 ± 0,1	N/D	118 ± 1	88 ± 1	206 ± 1
BB10	11,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	22,2 ± 0,2	5,6 ± 0,3	N/D	163 ± 4	83 ± 4	246 ± 6
BB11	15,7 ± 0,1	3,0 ± 0,1	21,7 ± 0,0	9,8 ± 0,3	N/D	133 ± 4	88 ± 6	221 ± 7
BB12	12,9 ± 0,4	2,7 ± 0,1	20,6 ± 0,6	4,8 ± 0,1	45 ± 2	158 ± 4	99 ± 9	301 ± 10
BB13	14,8 ± 0,5	2,5 ± 0,1	20,4 ± 0,5	4,8 ± 0,1	N/D	120 ± 2	67 ± 4	187 ± 5
BB14	14,2 ± 0,4	2,8 ± 0,0	22,4 ± 0,6	14,4 ± 0,1	N/D	128 ± 2	76 ± 3	203 ± 4
BB15	14,4 ± 0,4	3,1 ± 0,0	21,4 ± 0,8	9,9 ± 0,1	30 ± 4	186 ± 5	104 ± 2	320 ± 7
BB16	12,6 ± 0,2	2,3 ± 0,0	19,9 ± 0,9	4,9 ± 0,1	N/D	201 ± 3	103 ± 2	304 ± 4
BB17	12,2 ± 0,8	2,2 ± 0,0	20,6 ± 0,2	5,0 ± 0,0	N/D	272 ± 1	175 ± 3	446 ± 3
BBC	2,5 ± 0,2	7,9 ± 0,3	21,9 ± 0,9	9,9 ± 0,1	N/D	123 ± 1	66 ± 0	189 ± 1
AP	7,5 ± 0,9	5,3 ± 0,2	19,4 ± 0,0	9,8 ± 0,1	N/D	109 ± 8	78 ± 2	187 ± 8

N/D- não detetado.

3.3. Cinzas

Os resultados obtidos para o teor em cinzas das amostras recolhidas nos apiários junto dos apicultores não variam muito significativamente. Pela tabela 2 podemos verificar que em geral os valores rondam os 2 a 4 % com exceção da amostra BB5 que apresenta um valor superior a 7%. Comparativamente, a amostra comercial é a que apresenta o maior teor em cinzas enquanto o valor encontrado para o pólen apícola é semelhante às amostras de “pão de abelha”.

3.4. Proteínas

O teor de proteínas nas amostras de “pão de abelha” varia entre um mínimo de 16 % para amostra BB1 e BB6 e um máximo de 25% para a amostra BB5, incluindo para a amostra comercial. Estas diferenças ao nível do conteúdo proteico poderão estar relacionadas não com as quantidades dos diversos componentes que constituem o “pão de abelha”, mas com as origens florais do pólen recolhido pelas abelhas em redor do apiário de onde provém a amostra. Em todos os casos, os valores aqui apresentados para todas as amostras são superiores aos parâmetros de qualidade exigidos para o pólen apícola, devendo apresentar um valor superior a 13%. [51]

3.5. Gorduras

Na tabela 2 podemos encontrar descritos os valores obtidos para o teor de gorduras nas amostras de “pão de abelha” analisadas. Os valores estão de acordo com os descritos na literatura, que oscilam entre um mínimo de 4% e um máximo de 17%. [42]. Neste estudo, as amostras BB7 e BB9 apresentam uma composição percentual muito próxima dos 15% enquanto o mínimo é encontrado nas amostras BB1 e BB2 com valores próximos dos 4 %. A amostra de pão de abelha comercial apresenta um valor intermédio, muito próximo dos 10% encontrados também para o pólen.

3.6. Açúcares

Na Figura 12 podemos ver o cromatograma obtido por HPLC para uma mistura de padrões de açúcares. O perfil de açúcares das amostras de “pão de abelha” mostrou uma composição em açúcares livres muito semelhante, ou seja, em todas as amostras se verificou a presença dos monossacáridos frutose e glucose, típicos do mel, com exceção de duas amostras, BB12 e BB15, que apresentaram também na sua composição o monossacárido arabinose, Figura 13. A análise quantitativa, tabela 2, indica uma maior quantidade de frutose, com valores que oscilam entre os 99 mg/g para a amostra BB7 e os 260 mg/g da amostra BB8. Grande parte desta diferença entre amostra poderá significar a existência de maior quantidade de mel adicionado na preparação do “pão de abelha”. Na amostra comercial, o conteúdo de açúcares é semelhante ao obtido para o pólen apícola, mas relativamente mais pobre do que a generalidade das amostras recolhidas nos apicultores. A amostra BB8 é sem dúvida a mais rica em açúcares com uma percentagem superior a 40%.

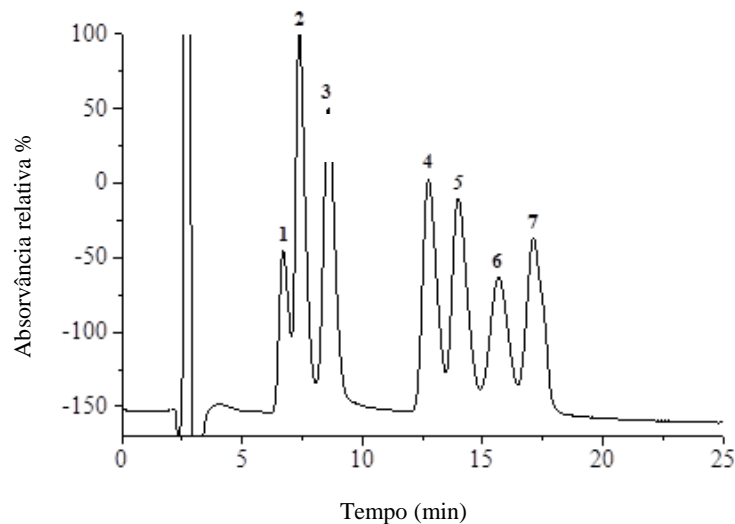


Figura 12 - Cromatograma de padrões de açúcares: 1- arabinose; 2- frutose; 3- glucose; 4- sacarose; 5- turanose; 6- maltose; 7- trealose.

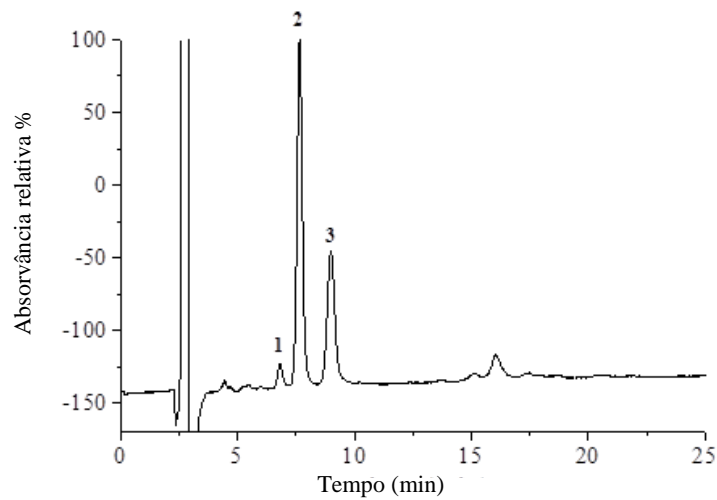


Figura 13 - Perfil de açúcares de uma amostra de “pão de abelha”BB12, : 1- arabinose; 2- frutose; 3-glucose.

3.7. Tocoferóis

O “pão de abelha” possui uma quantidade significativa de vitaminas como os tocoferóis, que, como antioxidantes naturais, são responsáveis por muitas das suas propriedades biológicas.[52;53]

Na Figura 14-(ii) pode-se observar o voltamograma obtido por voltametria de impulso diferencial para uma mistura de padrões de tocoferóis, identificando-se a presença de três processos de oxidação distintos a 0,58 V, 0,67 V e 0,76 V, correspondendo o primeiro à oxidação do α -tocoferol e o último ao δ -tocoferol . Os padrões de β - e γ -tocoferol apresentam um potencial de oxidação semelhante e correspondem ao pico intermédio.

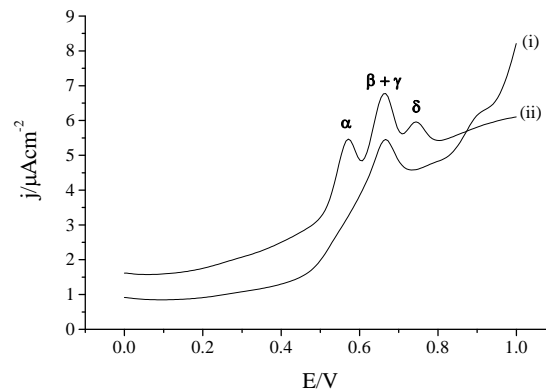


Figura 14 - Voltamograma de impulso diferencial obtido com uma velocidade de $0,03 \text{ V s}^{-1}$ e uma amplitude de modulação de $0,06 \text{ V}$, para soluções de hexano:etanol (40:60) com $\text{H}_2\text{SO}_4(0,002 \text{ mol dm}^{-3})$ /TBAP ($0,03 \text{ mol dm}^{-3}$) de: (i) extrato, 5 mg mL^{-1} ; (ii). padrões de tocoferol.

Os voltamogramas para as amostras de “pão de abelha” Figura 14-(i), apresentam um número de processos de oxidação variável identificando-se a presença de α -tocoferol em algumas das amostras avaliadas ao contrário do β - e γ -tocoferol que surgem em todas as amostras. O isómero δ -tocoferol é o que se encontram mais raramente entre as amostras estudadas.

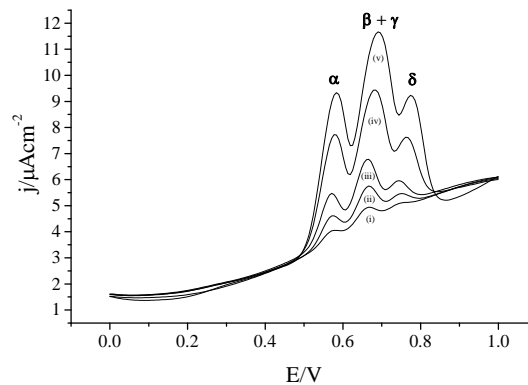


Figura 15 - Voltamogramas de impulso diferencial obtidos com uma velocidade de $0,03 \text{ V s}^{-1}$ e amplitude de modulação de $0,06 \text{ V}$, para soluções de hexano:etanol (40:60) com $\text{H}_2\text{SO}_4(0,002 \text{ mol dm}^{-3})$ /TBAP ($0,03 \text{ mol dm}^{-3}$) e padrões de tocoferóis:(i) $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (ii) $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Para avaliar quantitativamente a presença de vitamina E nas amostras, efetuou-se o estudo do comportamento do processo de oxidação dos padrões numa gama de concentração entre 5 e $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$, Figura 15, inferindo-se a sua linearidade

através da densidade de corrente dos picos e da concentração dos padrões. Através dos valores apresentados na Tabela 3, podemos verificar a variabilidade entre as amostras de “pão de abelha”, identificando-se a presença de vários isômeros nas amostras. A amostra comercial é a única que revela a presença na sua composição todos os tipos de tocoferóis, no entanto, num valor total bem inferior a muitas das amostras de “pão de abelha” do nordeste transmontano. Ao contrário, a amostra de pólen só apresenta α -tocoferol, mas num valor de apenas 1,8 mg por grama de pólen. A maior quantidade deste tocoferol é encontrada na amostra BB12 enquanto a amostra BB9 é a mais rica em β e γ -tocoferol.

Tabela 3 - Conteúdo em tocoferóis nas amostras de “pão de abelha”.

Amostra	(α) - Tocoferol/mgg ⁻¹	($\beta+\gamma$) - Tocoferol/mgg ⁻¹	(δ) - Tocoferol/mgg ⁻¹	Total em tocoferóis
BB1	N/D	1,2 ± 0,2	N/D	1,2 ± 0,2
BB2	N/D	6,3 ± 0,0	N/D	6,3 ± 0,0
BB3	N/D	0,04 ± 0,01	N/D	0,04 ± 0,00
BB4	N/D	0,04 ± 0,01	N/D	0,04 ± 0,00
BB5	0,7 ± 0,1	N/D	N/D	0,7 ± 0,1
BB6	0,1 ± 0,1	N/D	N/D	0,1 ± 0,1
BB7	8 ± 1	N/D	293 ± 1	302 ± 2
BB8	2,1 ± 0,8	2,1 ± 0,8	N/D	4 ± 1
BB9	12,4 ± 0,3	35,3 ± 0,6	N/D	47,7 ± 0,7
BB10	N/D	33,5 ± 0,9	N/D	33,5 ± 0,9
BB11	37 ± 1	7,2 ± 0,6	N/D	44 ± 1
BB12	37 ± 0,4	N/D	77 ± 1	114 ± 1
BB13	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	N/D	0,4 ± 0,0
BB14	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	N/D	0,5 ± 0,0
BB15	21 ± 0,7	N/D	77 ± 2	98 ± 2
BB16	20 ± 0,7	12 ± 1	N/D	32 ± 2
BB17	N/D	14 ± 0,1	N/D	14 ± 0,1
BBC	5 ± 1	6,1 ± 2	20 ± 2	32 ± 3
AP	2 ± 0,2	N/D	N/D	2 ± 0,2

N/D- não detetado

3.8. Conteúdo fenólico

O processo de extração da componente fenólica das amostras foi realizado com 80% de etanol e deu origem a rendimentos de extração bastante elevados que oscilaram entre os 50 e os 90% como se pode observar pela Tabela 4. Estes valores podem refletir a presença no extrato de outros compostos solúveis no solvente extrator, nomeadamente hidratos de carbono.

Tabela 4 - Composição fenólica

Amostras	Rendimento de extração	Fenóis totais (mg/g)	Flavonas/flavonóis (mg/g)	Flavanonas/di-hidroflavonóis (mg/g)	Total de flavonoides
BB1	51 ± 1	18 ± 2	1.5 ± 0.1	40 ± 1	42±1
BB2	55 ± 1	43 ± 2	0.7 ± 0.0	23 ± 1	24±1
BB3	56 ± 0	15 ± 1	0.8 ± 0.0	38 ± 6	39±6
BB4	62 ± 1	25 ± 3	1.6 ± 0.1	23 ± 1	25±1
BB5	84 ± 0	12 ± 1	0.9 ± 0.0	8 ± 0	9±0
BB6	80 ± 0	13 ± 0	3.2 ± 0.1	31 ± 1	34±1
BB7	86 ± 1	19 ± 2	0.9 ± 0.0	24 ± 1	25±1
BB8	73 ± 1	24 ± 2	2.4 ± 0.0	39 ± 0	41±0
BB9	77 ± 1	20 ± 0	2.3 ± 0.0	32 ± 1	35±1
BB10	62 ± 1	52 ± 1	2.3 ± 0.1	29 ± 0	32±0
BB11	66 ± 1	15 ± 1	0.3 ± 0.0	28 ± 2	29±2
BB12	68 ± 2	12 ± 1	2.1 ± 0.0	28 ± 1	30±1
BB13	70 ± 1	23 ± 1	1.5 ± 0.0	28 ± 0	30±0
BB14	60 ± 0.1	37 ± 1	2.1 ± 0.0	50 ± 3	52±3
BB15	63 ± 1	19 ± 2	1.4 ± 0.0	50 ± 3	51±3
BB16	73 ± 1	15 ± 1	1.6 ± 0.0	56 ± 3	58±3
BB17	79 ± 1	27 ± 3	3.0 ± 0.0	69 ± 2	72±2
BBC	60 ± 0.3	23 ± 2	4.2 ± 0.0	53 ± 6	57±6
AP	56 ± 1	35 ± 1	2.2 ± 0.0	65 ± 2	68±2

3.8.1. Fenóis totais

Os teor de fenóis foi determinado por métodos espectrofotométricos, permitindo a quantificação de compostos por grupos com características estruturais similares, sendo assim possível a procura de correlações com a sua atividade biológica.[54] Observando a Tabela 4 pode-se verificar que o teor fenólico variou entre um máximo de 52 mg/g de “pão de abelha” para a amostra BB10 e um mínimo de 12 mg/g para as amostras BB5 e BB12. A amostra comercial apresenta também valores próximos dos encontrados para as restantes amostras de “pão de abelha”. Estes valores estão de acordo com os resultados apresentados por outros autores, em que se descreve valores para o pólen apícola entre 19 e 49 mg/g de pólen.[55]

3.8.2. Flavonóides

Como podemos verificar pela Tabela 4, o conteúdo em flavonas/flavonóis das amostras de “pão de abelha” é muito inferior ao das flavanonas/di-hidroflavonóis. Para o conteúdo em flavonas/flavonóis os teores variaram entre um mínimo 0,2 mg/g e um máximo de 4,2 mg/g de “pão de abelha” para a amostra comercial. No entanto, para o conteúdo de flavanonas/di- hidroflavonóis, é a amostra BB17 que apresenta um máximo de 69 mg/g e a amostra BB5 que apresenta um mínimo de 8 mg/g de “pão de abelha”. A amostra de pólen também apresenta um valor elevado de 65 mg/g no conteúdo de flavanonas / di- hidroflavonóis, o que está de acordo com os valores da literatura.

3.9. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante consiste em retardar ou inibir a oxidação de lípidos ou de outras moléculas, impedindo o desenvolvimento das reações em cadeia da oxidação.[56;57] O consumo de compostos com potencialidade antioxidantes pode promover a proteção ao nível celular. Estas potencialidades são aqui avaliadas por métodos espectrofotométricos através da capacidade bloqueadora de radicais livres e poder redutor.

3.9.1. Efeito bloqueador de radicais livres

O radical livre DPPH é um cromóforo extremamente estável que absorve a 517 nm e apresenta uma coloração violeta intensa. Consoante se reduz o DPPH à forma de hidrazina por ação de um composto químico antioxidante, o seu eletrão emparelha-se, o que resulta numa diminuição da cor amarelo claro.[58] Na Figura 16 mostram-se os resultados obtidos da reação do DPPH, ao nível do efeito bloqueador, para as amostras de “pão de abelha” em estudo. O valor do EC_{50} indica a concentração de extrato fenólico necessária para reduzir em 50% a quantidade dos radicais livres, o que significa que quanto maior o bloqueio de radicais de DPPH pelo extrato de “pão de abelha” menor será o valor do EC_{50} e maior atividade antioxidante possui o extrato de “pão de abelha”.[60;61;62]

Os resultados permitem verificar que a amostra BB5 é a que apresenta uma atividade antioxidante mais reduzida com valores de EC_{50} próximos de 12,8 mg/mL. Esta fraca atividade poderá ser justificada pelo baixo teor em compostos fenólicos encontrados, quer ao nível dos fenóis totais quer de flavonóides. Em oposição, a amostra BB6 é a que apresenta uma maior atividade antioxidante com um valor de 0,02 mg/mL, seguida da amostra comercial que apresenta um valor de 0,05 mg/mL. Ambas as amostras apresentam um elevado valor na componente fenólica indicativo da importância deste compostos na atividade bloqueadora de radicais livres, e conferindo às amostras maior ou menor bioactividade dependendo da sua concentração.

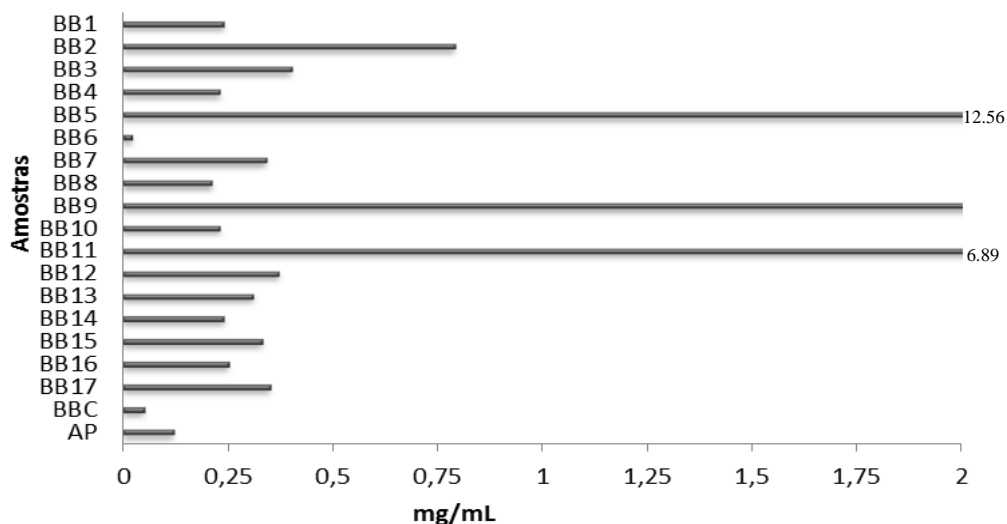


Figura 16 - Atividade bloqueadora de radicais de DPPH para as amostras.

3.9.2. Poder redutor

Na avaliação do poder redutor, a presença de moléculas antioxidantes provoca a redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto a uma forma ferrosa (Fe^{2+}), resultando num complexo azul ciano.[57;59]. A relação entre as concentrações e o sinal de absorvância permite assim avaliar o poder redutor dessas moléculas. Na Figura 17 pode-se verificar o comportamento relativo às amostras em estudo, constatando-se que as amostras BB9 e BB13 apresentam um valor mais elevado, próximo de 21 e 12 mgeq/g de “pão de abelha” respetivamente, enquanto a amostra BB2 é a que apresenta o valor menor pouco mais do que 5 mgeq/g de “pão de abelha”. A amostra comercial e a amostra de pólen apícola apresentam valores não muito elevados mas muito semelhantes, 8 mgeq/g de, estando no entanto de acordo com outros resultados apresentados na literatura.[61] Também para este método, as amostras com maior componente fenólica apresenta um poder redutor mais elevado

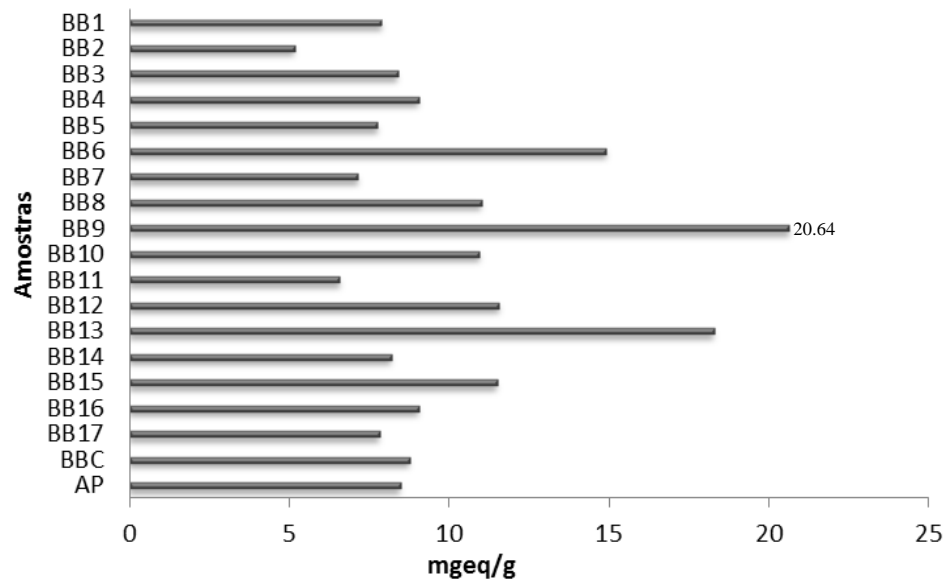


Figura 17 - Poder redutor das amostras.



Capítulo 4

Conclusão

O “pão de abelha” é um produto de origem natural com uma composição rica em proteínas e hidratos de carbono e por isso com elevadas potencialidades nutritivas. Este produto apresenta também um conjunto de propriedades bioativas atribuídas à presença de compostos fenólicos, tornando-se relevante a sua introdução na alimentação humana como um alimento funcional. Este produto apícola carece, no entanto, de uma análise do ponto de vista qualitativo que sirva de suporte à sua produção, e que permita demonstrar também a sua importância na alimentação. A expectável variabilidade em função da origem botânica do pólen, requer a existência de estudos que avaliam o seu valor nutritivo e farmacológico. Este estudo serve assim como uma primeira abordagem à qualidade do “pão de abelha” da região do Nordeste Transmontano

A análise palinológica das diversas amostras permitiu identificar que nos concelhos de Bragança e Vinhais, abrangidos pela amostragem, a família dominante é a Fabaceae, seguindo-se as Poaceae e Ranunculaceae, que surgem frequentemente como pólen secundário (15-45 %). A pequena variabilidade do espetro polínico observado nas amostras reflete a semelhança de floração e proximidade geográfica entre os apiários. No que se refere à amostra de pólen, esta apresenta uma família predominante, Cistaceae, fato que se fica a dever à abundância desta família na região, mas também à preparação da amostragem, uma vez que aquando da recolha do pólen apícola foi efetuada uma separação das cores, resultando numa amostra monofloral. A amostra comercial apresenta na sua composição como pólen dominante da família das Mirtaceae, isto deve-se por ser proveniente de outro país.

Na análise dos parâmetros nutricionais das amostras de “pão de abelha” verificou-se alguma variabilidade entre elas, sendo a amostra BB7 a que apresenta valores mais elevados em termos de humidade, cinzas e proteínas. O teor em humidade neste produto é relativamente elevado, indicativo que, para fins comerciais, é necessário aplicar um processo de secagem para evitar a contaminação microbiológica do “pão de abelha”. As quantidades significativas de proteínas presentes no “pão de abelha” são um indicador importante que podem justificar o seu uso na alimentação humana, desde que o controlo de qualidade seja garantido.

A composição em hidratos de carbono do “pão de abelha” está muito associada com a presença dos açúcares maioritários comuns no mel, frutose e glucose, o que está

de acordo com o processo de produção deste produto da colmeia. As amostras BB12 e BB15 apresentaram a este nível uma ligeira diferença dada a presença adicional arabinose.

O “pão de abelha” demonstrou ser também um produto alimentar rico em tocoferóis, vitamina E, conferindo-lhe portanto um valor nutritivo adicional. A presença das diversas isoformas mostrou variar de acordo com as amostras e com a sua origem floral, verificando-se na amostra comercial composição presença de todos os tipos de tocoferóis.

A quantidade de compostos fenólicos presentes no “pão de abelha” é também bastante relevante, observando-se uma presença significativa de flavanonas/di-hidroflavonois. Esta composição fenólica reflete-se na atividade antioxidante avaliada quer por técnicas espectrofotométricas. Em geral todas as amostras apresentaram atividade antioxidante excetuando as amostras BB5 e BB11 onde a concentração de amostra necessária para bloquear 50% dos radicais livres foi muito elevada. O mesmo comportamento foi observado através do poder redutor, com as amostras BB6, BB9 e BB13 a apresentarem melhores resultados.

Assim, a composição deste produto apícola, “pão de abelha”, revela todas as potencialidades como um produto nutracêutico e por isso passível de consumo como suplemento alimentar.

Os resultados deste trabalho são no entanto apenas uma primeira abordagem à avaliação da qualidade do “pão de abelha” devendo-se continuar e complementar a informação com outros trabalhos futuros, nomeadamente uma amostragem mais abrangente, incluindo amostras de distintos pontos do país, uma análise polínica mais aprofundada, identificando não só a família como também o género para e poder compreender melhor alguma da variabilidade observada ao nível da composição química, bem como a avaliação do perfil fenólico das amostras por técnicas cromatográficas. Estes estudos requerem ainda uma análise estatística dos valores, para se compreender a correlação entre as amostras e parâmetros e identificar a significância das diferenças encontradas.

Referências bibliográficas

- [1] - Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A.-G. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c, 530–533, 2002.
- [2] – Socorro A., O. Espinar M, M. Carmen. El polén.In:-----. Estudio del pólen com unteres en Apiterapia. Espanã: Granada. Cap.1.4. p.45-53, 1998.
- [3] - Condón M., Carlos. Palinologia y Caracteres Físico- Químicos del Pólen Apicola Producido en España. Propuesta de Parámetros objetivos de calidad.. 281f. Tese (doutoramento em Química analítica, Nutrição y Bramatologia). Universidade de Salamanca, Faculdade de Farmácia; Salamanca; España, 2005.
- [4] –Bogdanov, S; Jurendic, T; Sieber, R; Gallamann, P: Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition* 27: 677-689, 2008.
- [5] - Bogdanov, S; Gallamann, P: Royal jelly and health: na overview. *Apimedical & Apiquality*, 2nd Apimondia International Forum. Rome, June 2008: pp 61, 2008.
- [6] – Leung, R; HO, A; Chan, J; Choy, D; Lai, C K W: Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. *Clinical and Experimental Allergy* 27: 333-336, 1997.
- [7] - Ghisalberti, E. L. Propolis: a review. *Bee world*, 60, 59-84, 1979.
- [8] - Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis.1998.

- [9] - Bankova, V. Chemical diversity of Propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114-117, 2005.
- [10] - Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15, 2000.
- [11] - Tosi, E. A.; Ré, E.; Ortega, M. E.; Cazzoli, A. F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem*, 104, 1025-1029, 2007.
- [12] - Burdock, G A: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36 (4): 347-363, 1998.
- [13] - Fearnley, J: Bee propolis: natural healing from the hive. Souvenir Press London; 172 pp, 2001.
- [14] - Marcucci, M C: Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99, 1995.
- [15] - Münstedt, K; Bargello, M; Hauenschild, A: Royal Jelly Reduces the Serum Glucose Levels in Healthy Subjects. *Journal of Medicinal Food*: in press, 2009.
- [16] - Krilov, V: Bee venom (in Russian). Nizhny Novgorod University Nizhny Novgorod; 221 pp, 1995.
- [17] - Shkenderov, S; Ivanov, T: Pcelni Produkti, The Bee Products (in Bulgarian). Zemizdat (Abstract in Honey bibliography): 1-238, 1983.
- [18] - Feraboli, F: Apitherapy in orthopaedic diseases, Bee Products. Properties, Applications, and Apitherapy: pp 221-225, 1997.
- [19] - Son, D J; Lee, J W; Lee, Y H; Song, H S; Lee, C K; Hong, J T: Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics* 115 (2): 246-270, 2007.

- [20] - Steigerwaldt, F; Mathies, H; Damrau, F; Standardized bee venom (SBV) therapy of arthritis. Controlled study of 50 cases with 84 percent benefit. *Industrial Medicine and Surgery* 35 (12): 1045-1049, 1966.
- [21] - Schmidt, J.O., Buchmann, S.L. Other products of hive. In: Graham, J.M., 468 Amgrose, J.T., Langstroth, L.L., eds. *The Hive and the honey bee: a new book 469 on beekeeping which contines the tradition of “Langstroth on the hive and the 470 honeybee”*. (pp.928-977). Hamilton: Dadant, 1992.
- [22] - Bogdanov, S. *Composition, Health, Medicine: A Review*. *Apiacta*,.2-5, 2001.
- [23] - Dixit, P K; Patel, N G; Insulin like activity in larval foods of the honeybee. *Nature* 202 (4928): 189-190, 1964.
- [24] - Münstedt, K; Franke, F E; Pollen therapy and its scientific evidence. *American Bee Journal* 145: 511-513, 2005.
- [25] - Han, X; Shen, T; Lou, H; Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Science* 8: 950-988, 2007.
- [26] - Trautwein, E; Demonty, I; Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* 14 (5): 259-266 DOI:10.1684/ocl.2007.0145, 2007.
- [27] - Nagai,T, Nagashimi,T, Myode,T, Inoue, R. Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung / Food*,3:226-229. 2004.
- [28] - Standifer, L.N., McCaughey, W.F., Dixon, S.E., Gilliam, M., Loper, G.M. Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, amino acids and enzymes. *Apidologie* 11, 163–171. 1980.
- [29] - LB Almeida-Muradian, LC Pamplona, S Coimbra, Ortrud Monika Barth, 26, 2003.

- [30] - Kahkonen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Heinonen, M., Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47,3954-3962. 1999.
- [31] - TG Diaz, ID Merás, AG Cabanillas, MF Franco, *Anal Chim Acta*, 511, 231-238. 2004.
- [32] - S Bogdanov, *Bee Product Science*,1, 6-7. 2011.
- [33] - L. R. Snyder, J.J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 2009.
- [34] - Snyder LR, Kirkland JJ e Glajch JL, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997.
- [35] - Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VHC, second edition, Weinheim,2000.
- [36] - Kellner, R.; Mermet, J., -M.; Otto, M.; Widmer, H. M. (edited by); *Analytical Chemistry*, Wiley-VHC, Weinheim, 1998.
- [37] – Bryant V.M., Jones G.D. The R- Values of honey: pollen coefficients, *Palynology* 25, 11-28. 2001.
- [38] - Low N., Schaweger C., Soporns P. precaucion in the use of melissopalynology, *J. Apic. Res.* 28, 50-54. 1989.
- [39] - Harbone, B. Flavonoid pigments, in *Herbivores: Their interactives with Secondary Plants Metabolites*. vol. 1. Academic Press. San Diego. CA, 389-429. 1991.
- [40] – AOAC. *Official methods of analysis*. (16th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

- [41] - 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*, 18(1): 105–111, 2005.
- [42] - González Paramás, A.M. “Diferenciación de Mieles Basada en sus Caracteres Cromáticos y Composición Aminoacídica y Mineral.” Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. 2002.
- [43] - Harbone, B. Flavonoid pigments, in *Herbivores: Their interactions with Secondary Plants Metabolites*. vol. 1. Academic Press. San Diego. CA, 389-429. 1991.
- [44] - Teresa Szczesna. Study on the sugar composition of Honeybee-collected Pollen. *Journal of Apicultural Science*. Vol.51 No.1, 2007.
- [45] - Malheiro, R.; Oliveira, I.; Vilas-Boas, M.; Falcão, S.; Bento, A.; Pereira, J. A. Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil,., *Food and chemical toxicology* , 47, 92-97. 2009.
- [46] - Singleton, V.L.; Rossi, J.A.; Jr. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158. 1965.
- [47] – Cvec, J.; Medic- Saric, M; Jasprica, I; Zbucic, S.; Vitali, D.; Mornar, A; Vedrinaro, I.; Tomic, S. Optimization of an extraction procedure and chemical characterization of Croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*, 18, pp 451-459, 2007.
- [48] - Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 1986, 44, pp 307-315. 1986.
- [49] - Chiou, A.; Karathanos, V.T.; Mylona, A.; Salta, F.N.; Preventi, F.; Andrikopoulos, N.K. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolic and antioxidant activity. *Food Chem.*, 102, 516-522, 2007.

- [50] - Barth, O.M., Dutra, V.M.L., Justo, R.L., 1999. Pollen analysis of some samples of propolis from Southern Brazil. *Ciência Rural* 29, 663-667.
- [51] - Harbone, B. Flavonoid pigments, in *Herbivores: Their interactives with Secondary Plants Metabolites*. vol. 1. Academic Press. San Diego. CA, 389-429. 1991.
- [52] - S Bogdanov, *BeeProduct Science*, 1, 6-7, 2011.
- [53] - T.G. Diaz, I.D. Merás, A.G. Cabanillas, M.F. Franco - *Anal. Chim. Acta*, 511 231-238, 2004.
- [54] - Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal*, 15, 235–240, 2004.
- [55] - Kroyer, G.; Hegedus, N.; *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*, 2, 171. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 28:25–30, 2001.
- [56] - Zheng, W., Wang, S.Y., Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49, 5165-5170, 2001.
- [57] - Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Prado, A., Bezerra, R.M.N., Alencar, S.M., Ikegaki, M., Rosalen, P.L., Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* 32, 1523-1527, 2009.
- [58] - Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-198, 2002.
- [59] - Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S.L., Zeoula, L.M., Visentainer, J.V., Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by

Different Methods of Extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22, 929-935, 2011.

[60] Calado, J.C.P., Santos, L.C., Cabral, F.A., Marcucci, M.C. Atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de própolis obtidos através da extração por fluido supercrítico. I jornada de iniciação científica e tecnológica UNIBAN Brasil, 2008.

[61] Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira-Jr, G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H., Fenóis totais e atividade de cinco plantas medicinais. *Química. Nova* 30, 351-355, 2007.

[62] - Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A., Pereira, J.A., Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras”. *Food Science and Technology* 41, 739-745, 2008.

[63] - Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 28:25–30, 1995.

[64] - L. Moreira, L. G. Dias, J. A. Pereira, L. Estevinho – Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3482 – 3485, 2008.

[65] - Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., & Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198, 2002.

[66] - Berker K.I, Güçlü K., Tor I., & Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165, 2007.

Anexos

Em anexo seguem-se alguns resumos atas e pósteres que foram apresentados em alguns congressos.

Identification of phenolic compounds in "Bee bread."

Andreia Tomás^a, Soraia Falcão^b, Miguel Vilas-Boas^a

^aCIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

^bREQUIMTE/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

mvboas@ipb.pt

The pollen collected by bees on their hind legs is mixed inside the hive with honey and salivary secretions and stored in the promoting the initiation of a lactic fermentation which gives in greater power conservation. This mixture, called "bee bread", is the source of nutrients for the bees, rich in protein, minerals, fats and other substances essential for the development and maintenance of the colony productivity. In the interior of the hive is very easy to locate this product by the color appearance, being normally in the first frame after the setting zone, which allows a rapid feeding of larvae. [1 2].

The chemical composition of "bee bread" is very variable and complex depending on the vegetation around the hives, as well as the geographical and climatic conditions on site.

This study aimed to evaluate the chemical composition of phenolic compounds

"Bee bread" is the pollen stored in the combs inside the hive. It is usually mixed with honey, propolis and perhaps with some presents early fermentation. It is very easy to identify by color aspect. In certain circumstances when the "bee bread" is not being used, is covered with a layer of honey and also wax operculado. Phenolic compounds are a majority of its constituents. The chemical composition of "bee bread" is very variable and complex depending on the vegetation around the hives, as well as the geographical and climatic conditions on site. In this study quantified the presence of phenols, flavones, flavanones and di-hidroflavanonas in four samples, collected in Nordeste Transmontano.

These samples were treated, subjected to a hydro-alcoholic extraction (80% Ethanol / Water) of 12h. Were quantified spectrophotometrically at different wavelengths, with different patterns. For phenols, samples were prepared at a concentration of 10mg/mL in 80% ethanol, and used as standard gallic acid at a concentration of 0.5 mg / mL. In flavone concentration of the samples was 5mg/mL in 80% ethanol, and used as standard quercetin at a concentration of 0.05 mg / mL. In dihidroflavanonas flavanones and the samples were prepared at a concentration of 4mg/ml in ethanol to 80% and naringenin is used as standard at a concentration of 1mg/mL.

Sommeijer, M J; Rooijackers, E F; Jacobusse, C; Kerkvliet, J D (2009) Larval food composition and food plants of the solitary bee *Colletes halophilus* (Hymenoptera: Colletidae). *Journal of Apicultural*

Research 48(3): 149-155.

Quantificação voltamétrica de tocoferóis em diferentes amostras de “Bee Bread”

Andreia Tomás^{a,b}, Soraia Falcão^a, Miguel Vilas-Boas^b, tamanho 10, *sublinhar autor que apresenta o trabalho*

^aCIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

^bmvboas@ipb.pt

“Bee bread” é o polén armazenado nos favos, no interior da colmeia. Normalmente está misturado com mel, talvez com algum propólis e apresenta inícios de fermentação. É muito fácil de identificar, pelo aspecto colorido. Segundo Morse e Hooper (1986) “Enciclopédia ilustrada de Apicultura” em determinadas circunstâncias, quando o “Bee bread” não está a ser usado, é coberto com uma camada de mel e também operculado com uma “tampinha” de cera. Possui um elevado valor nutritivo.^[1]

As vitaminas são um dos seus constituintes nutricionais, como os tocoferóis, nome comum da vitamina E^[2]. Neste trabalho quantificou-se a presença do α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e do δ -tocoferol em quatro amostras, colhidas no Nordeste Transmontano, em diferentes freguesias (Formal, Quirás, Sanceriz).

Pela elevada sensibilidade, selectividade, exactidão e por não necessitarem de técnicas preparatórias morosas, optou-se pelos métodos electroanalíticos. Além do mais, os mecanismos electroquímicos são muitas vezes comparáveis aos que ocorrem nos processos metabólicos dos organismos vivos.^[3]

O comportamento voltamétrico do α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e do δ -tocoferol presente nas gorduras (extração feita com éter etílico durante 4 h) das amostras de “Bee bread” foi estudado com base na oxidação electroquímica do α -tocoferol, em meio de hexano-etanol.

[1] – Stefan Bogdanov, BeeProduct Science, 2011, 1, 6-7.

[2] - T.G. Diaz, I.D. Merás, A.G. Cabanillas, M.F. Franco - Anal. Chim. Acta, 511 (2004) 231-238.

[3] - S.-G. Li, W.-T. Xue, H. Zhang, H. - Electroanalysis, 18, (2006) 2337-2342.

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO “PÃO DE ABELHA”

Andreia Tomás¹, Soraia Falcão^{1,2}, Miguel Vilas-Boas¹

¹CIMO - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal;

²REQUIMTE - Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências do Porto, Rua do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal.

O pão de abelha é um produto da colmeia derivado do pólen, transportado pelas abelhas para a colmeia, ao qual foi adicionado mel e enzimas digestivas e posteriormente armazenado nos favos, dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação. Esta mistura, denominada “pão de abelha”, é a fonte de nutrientes para as abelhas, rica em proteínas, minerais, gorduras e outras substâncias fundamentais para o desenvolvimento da colónia e manutenção da sua produtividade (Nagai, T. *et al*, 2004). As abelhas utilizam este produto na alimentação das larvas, pelo que o armazenamento é efectuado preferencialmente no primeiro quadro após a zona de criação, o que permite uma rápida alimentação das larvas. A sua identificação na colmeia é simples dado o aspeto colorido deste produto. Devido ao seu elevado valor nutricional o pão de abelha é considerado como um bom complemento numa alimentação saudável.

Este trabalho teve por objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos como o teor de humidade, cinzas e o teor em proteínas em quatro amostras de “pão da abelha” do Nordeste Transmontano. Para o cálculo do teor em humidade e do teor em cinzas foram utilizados métodos gravimétricos até à obtenção de peso constante. O teor de proteínas foi calculado pelo método micro-Kjeldahl utilizando o fator de 6,25 para a conversão em proteína (amostra de 2g). As amostras estudadas apresentam um teor em humidade entre os 10 e os 12%, enquanto o valor em cinzas variou entre 3.8 e os 4.5%. O valor de proteínas totais variou entre 16 e 21%, estando este valores próximos dos descritos anteriormente na literatura (Nagai, T. *et al*, 2004).

Soraia I. Falcão thanks FCT for the PhD grant SFRH/BD/44855/2008.
Thanks also to FCT for financial support provided to CIMO (PEst-OE/AGR/UI0690/2011).

Nagai, T, Nagashimi, T, Myode, T, Inoue, R, 2004, Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung/Food*, 3: 226-229.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF “BEE BREAD”

Andreia Tomás¹, Soraia Falcão^{1,2}, Miguel Vilas-Boas¹

¹CIMO - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal;

²REQUIMTE - Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências do Porto, Rua do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal.

Bee bread is a product of the hive originated in pollen collected by bees into the hive, to which was added honey and digestive enzymes and subsequently stored in the combs, starting lactic fermentation which gives it greater power conservation. Within the beehive is easy to locate this product aspect the colored lying generally in the first table after creation zone, which allows rapid feeding of the larvae. The bee stored pollen is the main source of nutrients for the bees, rich in proteins, lipids, vitamins and microelements. Its composition differs from fresh bee-collected pollen due to the fermentation stage, which is responsible for higher stability of the product and lead to chemical changes that increase digestibility and nutritive value for the bee (Herbert, 1978). Due to its high nutritional value of bee bread is considered to be a good addition to a healthy diet once in their composition also are present compuestos phenolics which reduce the risk of diseases degenerativas, reduces oxidative stress and inhibits the oxidation of macromolecules (Silva,2004, Pulido,2000). The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of samples of bee bread Northeast Portuguese. To this ethanolic extract was prepared a sample, where the test was conducted blocking effect of free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), and reducing the complex Fe^{3+} / ferricyanide a ferrous form, were determined by UV-Vis spectrometry in accordance with earlier studies. Results obtained for DPPH varied in the range of 0.02 - 15.79 mg / g "bee bread", and as the reducing power results ranged from 5 to 21mg / g "bee bread". The antioxidant activity of “bee bread” pollen is lower than as shown in the literature, however has other quality parameters for the exploration of new studies on this product bee.

Herbert, E; Shimanuki, H (1978) Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel and seed) and jam: antioxidant activity.

Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay.

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO “PÃO DE ABELHA”

Andreia Tomás¹, Soraia Falcão^{1,2}, Miguel Vilas-Boas¹

¹CIMO - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal;

²REQUIMTE - Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências do Porto, Rua do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal.

Palavras chave: Pão de abelha; humidade; cinzas; teor em proteínas.

RESUMO

As abelhas, além do néctar que armazenam nos favos e que dará origem ao mel, transportam também para o interior da colmeia o pólen das flores, que após misturado com mel e secreções salivares é armazenado nos favos e sujeito a um conjunto transformações químicas. O produto final, ao qual se dá o nome de “pão de abelha” é uma fonte de nutrientes para as abelhas, rica em proteínas, minerais, gorduras e outras substâncias fundamentais para o desenvolvimento da colónia. Este trabalho teve por objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos como o teor de humidade, cinzas e o teor em proteínas em quatro amostras de “pão da abelha” do Nordeste Transmontano. Os valores observados para a humidade e teor em cinzas são semelhantes para as amostras estudadas, verificando-se uma maior variabilidade no teor em proteínas que poderá reflectir a diferença nas origens florais do pólen.

1. INTRODUÇÃO

O pão de abelha é um produto da colmeia com origem no pólen transportado pelas abelhas para o interior da colmeia, ao qual foi adicionado mel e enzimas digestivas e posteriormente armazenado nos favos, dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação. No interior da colmeia é fácil localizar este produto pelo aspeto colorido, encontrando-se normalmente no primeiro quadro após a zona de criação, o que permite uma rápida alimentação das larvas. Uma das contribuições para o seu elevado valor nutritivo deve-se à presença de uma quantidade significativa de proteínas pelo que se torna num alimento indispensável como fonte proteica das larvas e consequentemente fundamental no desenvolvimento da colónia (Nagai, T. *et al*, 2004). Estas características nutritivas podem ser aproveitadas inclusivamente na dieta humana, uma vez que apresenta vários aminoácidos essenciais à saúde humana. Este trabalho teve por objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos como o teor de humidade, cinzas e o teor em proteínas em quatro amostras de “pão da abelha” do Nordeste Transmontano, o que contribuirá para a identificação do valor nutricional deste produto da colmeia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem

As amostras de “pão de abelha” foram recolhidas do interior de colmeias efetuando-se um corte de uma área de favos, junto à criação. As quatro amostras em análise provêm da região do nordeste transmontano: uma do concelho de Vinhais e as restantes três do concelho de Bragança. As amostras referem-se a pólen proveniente da floração de 2011. Após a recolha dos favos, o “pão de abelha” foi removido do seu interior manualmente, limpo de quaisquer impurezas, homogeneizado, triturado, liofilizado e conservado a -20°C para análise posterior, com exceção da avaliação do teor de humidade o qual foi realizado sobre a amostra fresca.

2.2 . Análise dos parâmetros físico químicos

O teor de humidade das amostras foi avaliado pelo método gravimétrico até peso constante. Para tal pesou-se inicialmente 2g de amostra, que foi colocada numa estufa a 60°C, durante 2 horas.

Para a determinação do teor de Cinzas aplicou-se o método gravimétrico, avaliando-se a massa da amostra após incineração num forno a 600°C, durante 3h.

O teor em proteínas foi calculado pelo método micro-Kjeldahl numa amostra de 2g de “pão de abelha” liofilizado, aplicando-se o fator de 6,25 para a conversão em proteína.

3. RESULTADOS e DISCUSÃO

TabelaA1- Resultados percentuais dos métodos físico-químicos nas amostras de "pão de abelha" do nordeste transmontano.

Amostras	Origem geográfica	% Humidade	% Cinzas	% Proteínas
1	Vinhais	12%	4.0%	21%
2	Bragança	11%	4.1%	16%
3	Bragança	12%	4.5%	18%
4	Bragança	10%	4.0%	18%

O teor em humidade apresenta um valor médio de 11% enquanto o teor em cinzas varia entre 4 e 4,5%, não se observando grande variabilidade entre as amostras, o que revela a semelhança entre o tipo de amostras. Para o teor em proteínas a variabilidade encontrada entre as amostras é mais significativa, variando entre um máximo de 21% para a amostra de Vinhais e um mínimo de 16% para uma das amostras de Bragança. Estas diferenças ao nível do conteúdo proteico poderão estar relacionadas não com as quantidades dos diversos componentes que constituem o “pão de abelha”, mas com as origens florais do pólen recolhido pelas abelhas em redor do apiário de onde provém a amostra. Esta diferença poderá significar um valor nutricional mais elevado em função da origem floral da amostra. Em todos os casos, os valores aqui apresentados para todas as amostras estão de acordo

com os parâmetros de qualidade descritos para outras amostras de “pão de abelha” e em consonância com os valores encontrados para o pólen apícola (Almeida-Muradian et al., 2005)

4. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados ao nível das características composicionais destas quatro amostras de “pão de abelha” do Nordeste Transmontano estão de acordo com os resultados encontrados para este tipo de amostras com outras origens geográficas e são uma base para a clarificação do valor nutritivo deste produto apícola Português. A importância do estudo das características químicas é um passo importante para a padronização e valorização do “pão de abelha” e requer uma avaliação de outros parâmetros para além dos equacionados neste estudo preliminar.

Agradecimentos:

Soraia I. Falcão agradece à FCT pela bolsa de doutoramento (SFRH/BD/44855/2008).

Referências:

Nagai, T, Nagashimi, T, Myode, T, Inoue, R, 2004, Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung/Food*, 3: 226-229.

Almeida-Muradian, LB, Pamplona, LC, Coimbra S., Barth, OM, 2005, Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 105-111.

Quantificação voltamétrica de tocoferóis em “pão de abelha”

Andreia Tomás^a, Soraia Falcão^{ab}, Miguel Vilas-Boas^a

^aCIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal ^bREQUIMTE/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal
* mvboas@ipb.pt

Palavras chave: Pão de abelha, tocoferóis, voltametria.

RESUMO

As abelhas, além do néctar que armazenam nos favos e que dará origem ao mel, transportam também para o interior da colmeia o pólen das flores, que após misturado com mel e secreções salivares é armazenado nos favos e sujeito a um conjunto transformações químicas. O produto final, ao qual se dá o nome de “pão de abelha” é uma fonte de nutrientes para as abelhas, fundamental ao seu desenvolvimento e à sustentabilidade da colónia. Uma das contribuições para o seu elevado valor nutritivo deve-se à presença de uma quantidade significativa de vitaminas como os tocoferóis, que, como antioxidantes naturais, são responsáveis por muitas das suas propriedades biológicas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a composição em vitamina E: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol, presente no extrato lipofílico de “pão de abelha” em quatro amostras provenientes do nordeste transmontano. A análise foi efectuada por técnicas electroquímicas e permitiu identificar e quantificar a presença de β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas transportam nas patas posteriores o polén, que é misturado no interior da colmeia com mel e secreções salivares e armazenado nos favos, dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação. A esta mistura, dá-se o nome de “pão de abelha”, e é a fonte de nutrientes para as abelhas, rica em proteínas, minerais, gorduras e outras substâncias fundamentais para o desenvolvimento da colónia e manutenção da sua produtividade. No interior da colmeia é fácil localizar este produto pelo aspecto colorido, encontrando-se normalmente no primeiro quadro após a zona de criação, o que permite uma rápida alimentação das larvas. Uma das contribuições para o seu elevado valor nutritivo deve-se à presença de uma quantidade significativa de vitaminas como os tocoferóis, que, como antioxidantes naturais, são responsáveis por muitas das suas propriedades biológicas [1,2]. Os tocoferóis, nome comum da vitamina E, pertencem a um grupo de compostos estruturalmente relacionados designados como tocóis. A sua estrutura contém uma parte cíclica e uma cadeia

lateral isoprénica sem ligações duplas. São substâncias com capacidade de neutralizar os radicais de forma eficaz, protegendo o organismo, e mais especificamente os ácidos gordos poli-insaturados do ataque pelos radicais livres. São também importantes a nível intracelular, uma vez que a sua presença aumenta a resistência das membranas e impede que estas sejam danificadas, uma vez mais através da neutralização de radicais livres [2].

O “pão de abelha” possui uma quantidade significativa de vitaminas como os tocoferóis, que, como antioxidantes naturais, são responsáveis por muitas das suas propriedades biológicas.

A avaliação da composição de tocoferóis em amostras biológicas é frequentemente efectuada por técnicas cromatográficas, no entanto, foram recentemente publicados alguns estudos com recursos a outras técnicas alternativas como as electroquímicas. A actividade electroquímica da vitamina E está associada com o grupo hidroxilo fenólico, que é prontamente oxidado [3].

Este trabalho teve por objectivo avaliar a composição em vitamina E, α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol, presente no extracto lipofílico, de “pão de abelha” proveniente do nordeste transmontano, aplicando a voltametria diferencial de impulso (DPV).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem

As amostras de “pão de abelha” foram recolhidas do interior de colmeias efectuando-se um corte de uma área de favos, junto à criação. As quatro amostras em análise provêm da região do nordeste transmontano, uma do concelho de Vinhais e as restantes três do concelho de Bragança. As amostras referem-se a pólen proveniente da floração de 2011. Após a recolha dos favos, o “pão de abelha” foi removido do seu interior, triturado, homogeneizado e liofilizado, armazenando-se a -20°C até posterior análise.

2.2. Extracção da fração lipídica

As extracções da componente lipídica das amostras de “pão de abelha” foram realizadas por extracção sólido-líquido com éter etílico durante 4 horas, utilizando um sistema de Soxhlet [4]. O extracto resultante foi levado à secura e armazenado a -20°C até posterior análise.

2.3. Análise voltamétrica

Os estudos de electroquímica foram realizados num potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 302 utilizando uma célula de três eléctrodos. Como eléctrodo de trabalho utilizou-se um eléctrodo de carbono vítreo e como eléctrodo auxiliar um eléctrodo de platina. Os potenciais foram medidos em relação a um eléctrodo de referência de Ag/AgCl (3M) KCl. O potencial aplicado para a obtenção dos voltamogramas de impulso diferencial variou entre 0 e 1 V a uma velocidade de $0,03 \text{ Vs}^{-1}$ e uma amplitude de pulso de 0,06 V. Para avaliar a presença de α , β , γ e δ -tocoferol, dissolveram-se os extractos numa solução contendo 0,002M de ácido sulfúrico e 0,03M de perclorato de tetrabutylamónio (TBAP) em

hexano/etanol 40:60. A concentração dos extractos foi de 0.036, 0.025, 0.061 e 0.071 gmL^{-1} . Para traçar a recta de calibração usaram-se os padrões mencionados, efectuando-se o procedimento descrito num intervalo de concentrações de 5 a 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

Todas as soluções foram analisadas após preparação e as respostas electroquímicas obtidas logo após a imersão do eléctrodo de trabalho, de forma a minimizar a adsorção de espécies à superfície do eléctrodo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1-(i) pode-se observar o voltamograma obtido para a mistura de padrões de tocoferóis, identificando-se a presença de três processos de oxidação distintos a 0,58 V, 0,67 V e 0,76 V, correspondendo o primeiro ao α -tocoferol e o último δ -tocoferol. Os padrões de β - e γ -tocoferol apresentam um potencial de oxidação semelhante e correspondem ao pico intermédio.

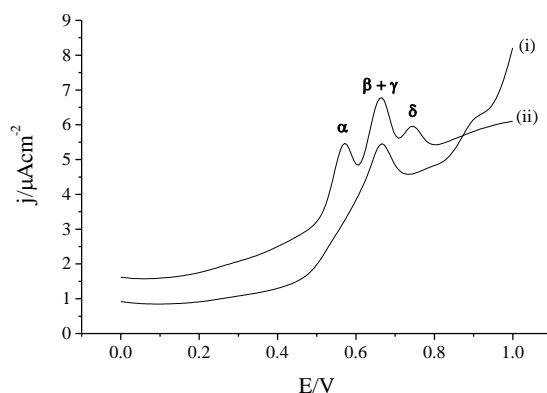


Figura 1. Voltamograma de impulso diferencial obtido com uma velocidade de $0,03 \text{ V s}^{-1}$ e amplitude de modulação de $0,06 \text{ V}$, para soluções de hexano:etanol (40:60) com $\text{H}_2\text{SO}_4(0,002 \text{ M})/\text{TBAP}(0,03 \text{ M})$ e: (i) – padrões de tocoferol, $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$; (ii) extrato, 5 mg mL^{-1} .

Os voltamogramas para as amostras de “pão de abelha” apresentam um número de processos electroquímicos variável, figura 1-(ii), não se identificando a presença de α -tocoferol em nenhuma das amostras avaliadas, ao contrário do β - e γ -tocoferol que surgem em todas as amostras. A amostra 4, apresenta um processo electroquímico a $0,82 \text{ V}$, o que poderá ficar-se a dever à presença de δ -tocoferol, no entanto, o ligeiro desvio para potenciais mais elevados não permite concluir inequivocamente a sua existência.

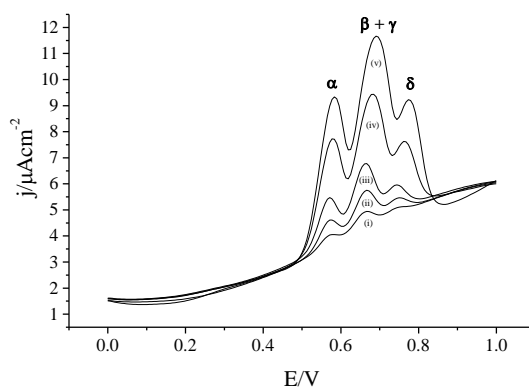


Figura 2. Voltamogramas de impulso diferencial obtidos com uma velocidade de $0,03 \text{ V s}^{-1}$ e amplitude de modulação de $0,06 \text{ V}$, para soluções de hexano:etanol (40:60) com H_2SO_4 ($0,002 \text{ M}$)/TBAP ($0,03 \text{ M}$) e padrões de tocoferóis: (i) $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (ii) $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (iii) $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (iv) $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ e (v) $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Para avaliar quantitativamente a presença de vitamina E nas amostras, efectuou-se o estudo dos padrões numa gama de concentrações entre 5 e $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$, figura 2, avaliando-se a linearidade entre a densidade de corrente dos picos e a concentração dos padrões. Os resultados observados revelam que a amostra do concelho de Vinhais apresenta um valor de β - e γ -tocoferol de $6,3 \text{ mg}$ por grama de “pão de abelha”, significativamente superior às restantes amostras que apresentam valores de $1,1$ e $0,04 \text{ mg/g}$.

4. CONCLUSÕES

A aplicação da voltametria de pulso diferencial permitiu caracterizar o teor de vitamina E em amostras de “pão de abelha” do distrito de Bragança. Este produto apícola revelou possuir teores significativos de β - e γ -tocoferol e potencialmente δ -tocoferol, mas em quantidades muito inferiores. A origem das amostras, e consequentemente a sua origem floral, revelou ser um factor com influência nos teores de vitamina E.

Agradecimentos

Soraia I. Falcão agradece à FCT pela bolsa de doutoramento (SFRH/BD/44855/2008).

Referências

- [1] – S Bogdanov, Bee Product Science, 2011, 1, 6-7.
- [2] - TG Diaz, ID Merás, AG Cabanillas, MF Franco, Anal Chim Acta, 2004, 511, 231-238.
- [3] - MF Marcus, MD Hawley, Biochim Biophys Acta, 1970, 201, 1.
- [4] – LB Almeida-Muradian, LC Pamplona, S Coimbra, Ortrud Monika Barth, 2003.



Introduction

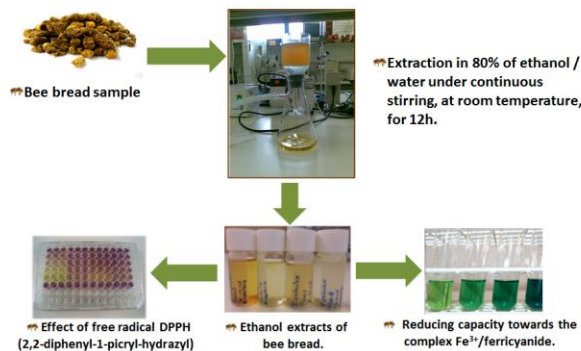
Bee bread is one of the bee products made with the pollen that bees collect in the apiary surrounding flora, to which they add honey and digestive enzymes and subsequently stored in the combs, promoting a lactic fermentation which gives it greater conservation power.



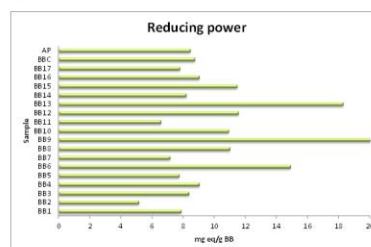
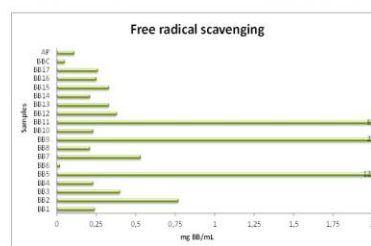
Within the beehive is easy to locate this product by the color, lying generally in the first frame following the brood, which allows a rapid feeding of the larvae.

Methods

Seventeen samples of bee bread (BB), collected in the northeast of Portugal from local beehives, were analyzed together with a sample of commercial bee bread (BBC) and a sample of local bee pollen (AP).



Results and discussion



The observed results showed that the radical scavenging effect for 50% inhibition ranged between 0.05 and 13 mg extract/mL, and the reducing power from 5 to 21 mg eq/g extract. BB6 reveal the highest scavenging activity while...

Conclusion

In general, all samples show an antioxidant activity however samples BB5, BB9, and BB11, revealed the best performance in radical scavenging whereas the samples BB6, BBC and AP have lower values. For the reducing power, most of the samples revealed a similar behavior with exceptions in samples BB6, BB9 and BB13. These differences must be linked with the botanic origin of each sample.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Foundation for Science and Technology (FCT) to CIMO. Thanks to the Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho for bee bread collection.



AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO “PÃO DE ABELHA”

Andreia Tomás(1), Soraia I. Falcão (1,2), Miguel Vilas-Boas(1)*

1: CIMO/ESA - Instituto Politécnico de Bragança, Portugal;
2: REQUIMTE/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.
*mvboas@ipb.pt



Centro de Investigação de Montanha

ipb INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA Escola Superior Agrária

U. PORTO FACULDADE DE CIÊNCIAS UNIVERSIDADE DO PORTO

requimte

Introdução

O pão de abelha é um produto da colmeia derivado do pólen, ao qual foi adicionado mel e enzimas digestivas e posteriormente armazenado nos favos, dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação. Esta mistura, denominada “pão de abelha”, é a fonte de nutrientes para as abelhas, rica em proteínas, minerais, gorduras e outras substâncias fundamentais para o desenvolvimento da colónia (Nagai, T. *et al*, 2004). Devido ao seu elevado valor nutricional é considerado um bom complemento numa alimentação saudável.

Métodos

Origem da amostra: As amostras provêm da região do nordeste transmontano, uma do concelho de Vinhais e as restantes três do concelho de Bragança. As amostras referem-se a pólen da floração de 2011.

Humidade: O teor de humidade das amostras foi avaliado pelo método gravimétrico até peso constante. Para tal pesou-se inicialmente 2g de amostra, que foi colocada numa estufa a 60°C, durante 2 horas.

Cinzas: Para a determinação do Teor de Cinzas avaliou-se a massa da amostra após incineração num forno a 600°C, durante 3h.

Proteína: o teor em proteínas foi calculado pelo método micro-Kjeldahl numa amostra de 2g de “pão de abelha” liofilizado, aplicando-se o fator de 6,25 para a conversão em proteína.

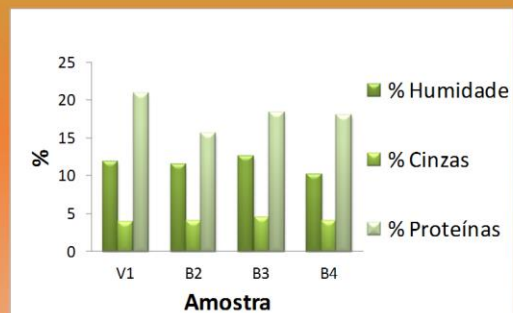
Resultados e discussão

O teor em humidade apresenta um valor médio de 11% enquanto o teor em cinzas varia entre 4 e 4,5%. Para o teor em proteínas a variabilidade encontrada entre as amostras é mais significativa, variando entre um máximo de 21% para a amostra de Vinhais e um mínimo de 16% para uma amostra de Bragança. Estas diferenças ao nível do conteúdo proteico poderão estar relacionadas com as origens florais do pólen recolhido pelas abelhas em redor do apiário. Esta diferença poderá significar um valor nutricional mais elevado em função da origem floral da amostra. Em todos os casos, os valores aqui apresentados para todas as amostras estão de acordo com os parâmetros de qualidade descritos para outras amostras de “pão de abelha” e em consonância com os valores encontrados para o pólen apícola (Almeida-Muradian *et al.*, 2005)



Figura 1. “Pão de abelha”.

Figura 2. Nordeste de Portugal origem das amostras de “pão de abelha”.



Conclusão

Os resultados aqui apresentados ao nível das características composicionais destas quatro amostras de “pão de abelha” do Nordeste Transmontano estão de acordo com os resultados encontrados para este tipo de amostras com outras origens geográficas e são uma base para a identificação do valor nutritivo deste produto apícola Português. A importância do estudo das características químicas é um passo importante para a padronização e valorização do “pão de abelha” e requer uma avaliação de outros parâmetros para além dos equacionados neste estudo preliminar.

Referências:

Nagai, T, Nagashimi, T, Myode, T, Inoue, R, 2004, Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung/Food*, 3: 226-229.

Almeida-Muradian, LB, Pamplona, LC, Coimbra S., Barth, OM, 2005, Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 105-111.

AGRADECIMENTOS

À FCT pela bolsa de Doutoramento de Soraia I. Falcão (SFRH/BD/44855/2008) financiada pelo POPH-QREN e FSE, e Osuporte financeiro dado ao CIMO (PEST-OE/AGR/UI0690/2011).

À Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho pelas amostras de “pão de abelha”.



Quantificação voltamétrica de tocoferóis em “pão de abelha”

Andreia Tomás^a, Soraia I. Falcão^{a, b}, Miguel Vilas-Boas^{a*}

^aCIMO/IPB-Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

^bRequimte/FCUP - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

mvboas@ipb.pt



Centro de Investigação de Montanha



Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária



Requimte - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Universidade do Porto



Introdução

As abelhas transportam nas patas posteriores o pólen, que é misturado no interior da colmeia com mel e secreções salivares e armazenado nos favos, dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação. A esta mistura, dá-se o nome de “pão de abelha” e é a fonte de nutrientes para as abelhas, rica em proteínas, minerais, gorduras e outras substâncias fundamentais para o desenvolvimento da colónia e manutenção da sua produtividade. No interior da colmeia é fácil localizar este produto pelo aspeto colorido, encontrando-se normalmente no primeiro quadro após a zona de criação, o que permite uma rápida alimentação das larvas. Uma das contribuições para o seu elevado valor nutritivo deve-se à presença de uma quantidade significativa de vitaminas como os tocoferóis, que, como antioxidantes naturais, são responsáveis por muitas das suas propriedades biológicas [1,2].

Métodos

Origem da amostra: As quatro amostras em análise provêm da região do nordeste transmontano, uma do concelho de Vinhais e as restantes três do concelho de Bragança, Figura 1. As amostras referem-se a pólen proveniente da floração de 2011.

Extração da componente lipídica: extração sólido-líquido com éter etílico durante 4 horas, utilizando um sistema de Soxhlet.



Figura 1. Nordeste de Portugal e origem das amostras do “pão de abelha”



Figura 2. “Pão de abelha” nos favos.



Figura 3. Amostras de extracto de “pão de abelha” para a análise voltamétrica.

Análise voltamétrica: Os estudos de electroquímica foram realizados por voltametria de impulso diferencial num potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 302 (Figura 4) com uma célula de três eléctrodos, utilizando-se um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo e um eléctrodo auxiliar de platina. Os potenciais foram medidos em relação ao eléctrodo de referência de Ag/AgCl (3M) KCl. O potencial aplicado variou entre 0 e 1 V, a uma velocidade de 0,03 Vs⁻¹ e uma amplitude de pulso de 0,06 V.



Figura 4. Montagem experimental

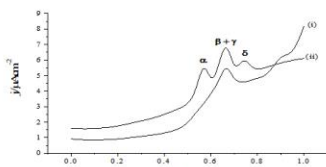


Figura 5. Voltamograma nas condições padrão, para soluções de hexano:etanol (40:60) com H₂SO₄ (2mM)/TBAP (0,03 M) e: (i) extrato, 5 mgmL⁻¹; (ii) – padrões de tocoferol, 20 µM;

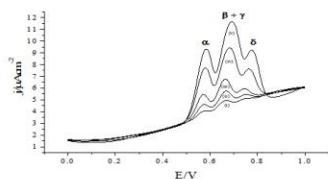


Figura 6. Voltamogramas nas condições padrão, para soluções de hexano:etanol (40:60) com H₂SO₄ (2mM)/TBAP (0,03 M) e padrões de tocoferóis: (i) 5 mM (ii) 10 mM (iii) 20 mM (iv) 50 mM e (v) 100 mM.

Resultados e discussão

Os resultados observados revelam a presença de β e γ -tocoferol em todas as amostra de “pão de abelha” enquanto o δ -tocoferol apenas é identificado numa das amostras de Bragança. Em termos quantitativos é possível verificar que a amostra do concelho de Vinhais apresenta um valor de β - e γ -tocoferol de 6,3 mg por grama de “pão de abelha”, significativamente superior às restantes amostras que apresentam valores de 1,1 e 0,04 mg/g.

Tabela 1- Quantificação de tocoferóis para os extractos lipofílicos de “pão de abelha” obtidos através de voltametria de impulso diferencial

Amostra	Origem geográfica	(β + γ)-Tocoferol/mg.g ⁻¹	δ -Tocoferol/mg.g ⁻¹
1	Bragança	1.2 ± 0.24	-
2	Vinhais	6.31 ± 0.01	-
3	Bragança	0.04 ± 0.02	-
4	Bragança	0.04 ± 0.02	0.4 ± 0.04

Conclusão

- A aplicação da voltametria de impulso diferencial permitiu caracterizar o teor de vitamina E em amostras de “pão de abelha” do distrito de Bragança.

-Este produto apícola revelou possuir teores significativos de β - e γ -tocoferol e potencialmente δ -tocoferol, mas em quantidades muito inferiores.

- A origem das amostras, e consequentemente a sua origem floral, revelou ser um fator com influência nos teores de vitamina E.



[1] – S Bogdanov, Bee Product Science, 2011, 1, 6-7; [2] – TG Diaz, ID Merás, AG Cabanillas, MF Franco, Anal Chim Acta, 2004, 511, 231-238.

AGRADECIMENTOS

A FCT pela bolsa de Doutoramento de Soraia I. Falcão (SFRH/BD/44855/2008) financiada pelo POPH-QREN e FSE, e Osuporte financeiro dado ao CIMO (PEst-OE/AGR/UI0690/2011).

A Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho pelas amostras de “pão de abelha”.



Phenolic content of bee bread from Northeast of Portugal

Andreia Tomás (1), Soraia I. Falcão (1,2), Miguel Vilas-Boas (1)

1: CIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Portugal;
 2: REQUIMTE/FCUP - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.
 *mvboas@ipb.pt

Introduction

Bee bread is the name given to the collected bee pollen which has been mixed with digestive enzymes, transported to the hive in small pellets and stored in the combs with a tiny bit of honey and bee wax. Pollen stored in this way undergoes lactic acid fermentation due to the action of different enzymes, micro-organisms, moisture and temperature. The bee stored pollen is the main source of nutrients for the bees, rich in proteins, lipids, vitamins and microelements. Its composition differs from fresh bee-collected pollen due to the fermentation stage, which is responsible for higher stability of the product and lead to chemical changes that increase digestibility and nutritive value for the bee (Herbert, 1978). Due to its high nutritional value, bee bread is considered to be a good complement in a healthy diet.

Methods

Samples

Four samples of bee bread, one from Vinhais (V1) and the other three from Bragança (B2, B3, B4) areas. The samples refer to the pollen of the 2011 flowering.

Extraction

80% of ethanol/water, under stirring at room temperature for 12h.

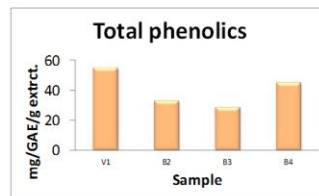
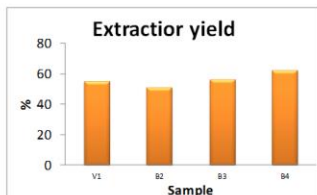
Spectrophotometric phenolic analysis

- Total phenolics – Modified Folin-Ciocalteu assay (expressed as gallic acid equivalents)
- Flavone/flavonol– AlCl₃ assay (expressed as quercetin equivalents)
- Flavanone/dihydroflavonol – 2,4–dinitrophenylhydrazin assay (expressed as pinocembrin equivalents)

Bee bread sampling sites.

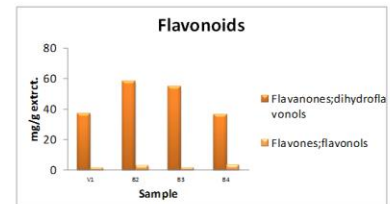
Results and discussion

• Bee bread contains more than 40% of ethanolic extract



• Total phenolics in bee bread ranged from 29 to 55mg GAE/g extract.

• Flavones/flavonols from 1.6 - 3.5mg/g and flavanones/dihydroflavonols from 36 - 59mg/g of bee bread.



Conclusions

The phenolic content of bee bread is richer than those described in pollen of the same region which is a good quality parameter to explore for further studies of this bee product.

References:
 Herbert, E; Shimanuki, H (1978) Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9: 33-40.

Acknowledgments:
 The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Foundation for Science and Technology (FCT) to CIMO. Soraia I. Falcão thanks FCT for a PhD grant (SFRH/BD/44855/2008), financially supported by POPH-QREN and FSE. Thanks to the Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho for bee bread collection.

