

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E  
ESPECTROSCÓPICA DO PÓLEN COLETADO POR  
ABELHAS SEM FERRÃO AMAZÔNICAS**

KEMILLA SARMENTO REBELO

MANAUS  
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E  
ESPECTROSCÓPICA DO PÓLEN COLETADO POR  
ABELHAS SEM FERRÃO AMAZÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse  
Co-orientador: Dr. Antonio Gilberto Ferreira

MANAUS  
2011

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Rebelo, Kemilla Sarmento

R291c      Caracterização química, físico-química e espectroscópica do pólen coletado por abelhas sem ferrão amazônicas / Kemilla Sarmento Rebelo. - Manaus: UFAM, 2010.  
67 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse

1. Meliponínios 2. *Apis mellifera* 3. alimentos funcionais I. Carvalho-Zilse, Gislene Almeida II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 638.124(043.3)

KEMILLA SARMENTO REBELO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E  
ESPECTROSCÓPICA DO PÓLEN COLETADO POR  
ABELHAS SEM FERRÃO AMAZÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

Dra Gislene Almeida Carvalho-Zilse, Presidente  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra Lídia Medina Araújo, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

Dra Maria Lúcia Belém, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

Aos meus amados pais Rosivaldo e Durvalina pelo empenho ilimitado em meu sucesso pessoal e profissional, sempre incentivando minhas escolhas.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra Gislene Almeida Carvalho-Zilse pelos ensinamentos, orientação, e confiança depositada em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira pela co-orientação e oportunidade de conhecer novas e modernas técnicas de análises de alimentos.

À Universidade Federal do Amazonas, em especial ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, onde obtive os conhecimentos necessários para continuar na carreira acadêmica.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, mais precisamente ao Grupo de Pesquisas em Abelhas, pelo aprendizado em pesquisa e utilização de suas colônias de abelhas sem ferrão neste estudo.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

À Prof. Dra Lídia Medina Araújo por ceder as instalações e equipamentos da Central Analítica para a realização das análises físico-químicas, bem como pelos valiosos ensinamentos em análises de alimentos.

À Prof. Dra Cecília Verônica Nunez pela oportunidade concedida ao ceder as instalações e infra-estrutura do laboratório de Bioprospecção para a execução das análises de atividade antioxidante e cromatografia de camada delgada. À Cláudia Comandolli e Francis pela ajuda indispensável nas análises realizadas neste laboratório.

Ao Prof. Dr. Antonio José Inhamuns pela autorização da utilização das instalações do laboratório de tecnologia do pescado, em especial aos técnicos deste Laboratório, Fábio Lopes e Ricardo.

A todos os queridos companheiros do laboratório de RMN da UFSCar Luciana Vizzoto, Katyuscia Leão, Elisangela Boffo, Claudimar Junker, Francisco Gambarra, Clayton, Lyege, Darlene, Eduardo Sanches, e em especial ao casal Lorena e Elenilson Godoy pelas dicas, esclarecimentos e auxílio na obtenção dos espectros de RMN e análises quimiométricas.

Aos amigos do GPA, Klilton Barbosa, Hélio Vilas Boas, Aline Brasil e Diego pelo companheirismo e ajuda na coleta das amostras.

Aos colegas e amigos da pós-graduação pelo companheirismo durante as disciplinas.

A todos os professores do PPGBIOTEC pela aquisição dos conhecimentos indispensáveis para a minha formação profissional.

Ao Frank Okamura pela compreensão, paciência, amor, apoio e companheirismo durante o decorrer do mestrado.

À minha amada tia Vera Lúcia Imbiriba e a amiga Enedina Nogueira de Assunção pelo incentivo em ingressar na pós-graduação e seguir carreira como docente.

Aos meus pais e irmãos pela base que me deram para que eu pudesse desenvolver minhas atividades com respeito às pessoas, dedicação e responsabilidade.

A todos os meus amigos, desde os da escola, que renovam e alegam minha vida a cada ano, até os mais novos do ISB/UFAM/COARI, que compreenderam a necessidade que tive de as vezes me ausentar para me dedicar ao mestrado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

A nossa história não ficará sem final feliz;  
Temos e ainda teremos muitas histórias bonitas para contar;  
Vamos viver, pois ainda temos muito por fazer;  
O mundo começa agora;  
Apenas começamos.

*Legião Urbana*

## RESUMO

O pólen apícola é produzido pelas abelhas, mediante a aglutinação do pólen das flores misturado ao néctar e às suas substâncias salivares. Há tempos este produto vem sendo utilizado como complemento alimentar na nutrição humana, pois representa uma importante fonte de nutrientes e substâncias antioxidantes, que ajudam a prevenir diversas doenças degenerativas e cardiovasculares. O pólen mais estudado em todo o mundo é o coletado pela abelha *Apis mellifera*, e pouco se conhece sobre a constituição química do pólen coletado por abelhas sem ferrão. Além dos métodos convencionais de análise da composição de alimentos, um método que pode ser empregado na análise de pólen é a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que aliada a métodos quimiométricos permite determinar similaridades ou diferenças na composição química das amostras. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química, as características físico-químicas e o potencial antioxidante do pólen coletado pelas abelhas sem ferrão amazônicas *Melipona seminigra* e *M. interrupta*, provenientes do Meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em Manaus – AM. Os resultados das análises químicas e físico-químicas do pólen coletado por *M. seminigra* e *M. interrupta* foram respectivamente, 53,39% e 37,12% de umidade no pólen fresco; 12,55% e 8,85% de umidade no pólen liofilizado; 11,34% e 6,86% de proteínas; 10,8% e 6,47% de lipídios; 4,03% e 2,74% de cinzas; 9,3% e 13,65% de fibras; 51,94% e 61,4% de carboidratos; valor calórico de 311,3kcal% e 310,7kcal%; sólidos totais de 46,60% e 62,87%; pH de 3,70 e 3,34; e atividade de água de 0,91 e 0,85. Apenas o pH do pólen coletado pelas duas espécies de abelhas e o percentual de proteína do pólen coletado por *M. interrupta* estava em desacordo com o Regulamento Técnico Brasileiro de Fixação de Identidade e Qualidade de pólen apícola. Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa foi possível observar manchas características de substâncias fenólicas, principalmente no pólen de *M. seminigra*, o qual apresentou atividade antioxidante. Por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível identificar sinais característicos das substâncias  $\alpha$  e  $\beta$ -glicose, alanina, etanol e ácido acético, indicando que o pólen pode passar por fermentação do tipo acética. As análises dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  por quimiometria permitiram constatar que as abelhas sem ferrão amazônicas estão coletando pólen de diferentes origens florais e, portanto, com diferentes composições químicas, tanto na mesma estação climática, quanto em estações climáticas diferentes. O pólen coletado pelas abelhas amazônicas parece ser um complemento alimentar muito valioso do ponto de vista nutricional, pois além de conter diversos nutrientes importantes para a manutenção da saúde, apresenta também atividade antioxidante, que pode ajudar na prevenção de diversas doenças.



## ABSTRACT

Bee pollen is produced by bees through the assemblage of pollen mixed with nectar from flowers and their salivary substances. There are times has been used as a food supplement in human nutrition, and represent an important source of nutrients and antioxidants that help prevent many degenerative and cardiovascular diseases. Pollen most studied worldwide is collected by honeybee *Apis mellifera*, and little is known about the chemical makeup of pollen collected by stingless bees. Besides the conventional methods of analysis of food composition, a method that can be used in the analysis of pollen is the Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), with chemometric methods to determine similarities or differences in chemical composition of samples. Therefore, the objective was to determine the chemical composition, physical-chemical and antioxidant potential of pollen collected by Amazon stingless bees *Melipona seminigra* and *M. interrupta*, from Meliponary Bee Research Group of National Institute of Amazonian Research in Manaus - AM. The results of chemical analysis and physical-chemical properties of pollen collected by *M. seminigra* and *M. interrupta* were respectively 53.39% and 37.12% moisture content in fresh pollen, 12.55% and 8.85% moisture in lyophilized pollen, 11.34% and 6.86% protein, 10.8% and 6.47 % Fat, 4.03% and 2.74% ash, 9.3% and 13.65% fiber, 51.94% and 61.4% carbohydrate, caloric value of 311.3kcal% and 310.7kcal%, total solids of 46.60% and 62.87%, pH 3.70 and 3.34 and water activity of 0.91 and 0.85. Only the pH of the pollen collected by the two bee species and the protein percentage of pollen collected by *M. interrupta* was at odds with the Technical Regulations Brazilian Fixing the Identity and Quality of pollen. In the analysis by comparative thin layer chromatography was possible to observe characteristic spots of phenolic substances, mainly in the pollen of *M. seminigra*, which showed antioxidant activity. By  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy was possible to identify characteristic signals of substances  $\alpha$  and  $\beta$ -glucose, alanine, ethanol and acetic acid, indicating that pollen is the kind acetic fermentation. The analysis of  $^1\text{H}$  NMR data by chemometric revealed that Amazonian stingless bees are collecting pollen from different botanical sources and therefore with different chemical compositions, in both the season, as in seasons same. The pollen collected by bees from Amazon, seems to be a very valuable food supplement nutritional standpoint, as well as contain several important nutrients for maintaining health, also has antioxidant activity, which can help prevent several diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AlCl<sub>3</sub> – Cloreto de Alumínio
- AQ - tempo de aquisição
- ASCII - *American Standard Code for Information Interchange*
- CCD – Cromatografia de camada delgada
- gCOSY – *gradient CORrelated SpectroscopY*
- d* - duplete
- d1 - tempo de espera entre cada aquisição
- DCM - diclorometano
- dd* - duplo duplete
- DPPH - 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila
- EPE – extrato etanólico de pólen
- EtOH – Etanol
- FeCl<sub>3</sub> – Cloreto Férrico
- GPA – Grupo de Pesquisas em Abelhas
- HCA – *Hierarchical cluster analysis*; Análise hierárquica de agrupamentos
- HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
- Hz - Hertz
- J* - constante de acoplamento entre *spins* nucleares
- MeOD - metanol deuterado
- NS - *Number of Scans*; número de varreduras espectrais
- PC - *Principal Component*
- PS – Pólen coletado por *M. seminigra*
- PI - Pólen coletado por *M. interrupta*
- PCA - *Principal Component Analysis*
- RMN de <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H
- SWH - *Spectral Width in Hz*
- t* - tripleto
- TD - *Time Domain*; número de pontos utilizados na aquisição
- TMS - tetrametilsilano
- Zgcppr - *Composite Pulse Presaturation*
- δ - Simbologia para deslocamento químico

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Potes com pólen. A - Pólen armazenado em colônia de *Melipona seminigra*; B – Pote aberto com pólen em detalhe..... 21
- Figura 2 – Abelha *Melipona seminigra*. A - Entrada característica do ninho; B – Colônia em caixa de criação padronizada..... 23
- Figura 3 - Abelha *Melipona interrupta*. A – Entrada do ninho; B – Colônia em caixa padronizada..... 24
- Figura 4 – Gráfico de chuva acumulada nos meses de janeiro a dezembro de 2010 em Manaus – AM..... 34
- Figura 5 - Extratos etanólicos brutos do pólen (eluição em acetona/DCM 1:1) coletado pelas abelhas sem ferrão *Melipona seminigra* (S) e *M. interrupta* (I) por CCD. A – Cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>); B – Cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>); C – DPPH•; D – Anisaldeído. .... 56
- Figura 6 – Espectros de RMN de <sup>1</sup>H de extratos metanólicos de amostras de pólen coletado pelas abelhas sem ferrão *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b) em Manaus-AM, destacando as pequenas variações entre as amostras..... 62
- Figura 7 – Ampliação da região espectroscópica de RMN de <sup>1</sup>H dos carboidratos presentes nas amostras de pólen coletado por *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b), revelando a alta sobreposição dos sinais. .... 64
- Figura 8 – Ampliação da região do espectro de RMN de <sup>1</sup>H que apresenta sinais dos carbonos anoméricos da α - glicose e β - glicose no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b). .... 65
- Figura 9 – Correlações <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C observadas no experimento de gHSQC referente aos sinais dos carbonos anoméricos da α-glicose e β-glicose do pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b). .... 66
- Figura 10 – Ampliação da região do espectro de RMN de <sup>1</sup>H destacando o duplete em δ 1,50 e 1,49 no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b), respectivamente. .... 67
- Figura 11 – Correlações <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C observadas no experimento de gHSQC referente aos sinais do carbono 3 da alanina no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b). .... 68
- Figura 12 – Ampliação dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H com sinais do etanol em δ 1,19 e 1,18 no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b), respectivamente. .... 69
- Figura 13 – Correlações <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H do etanol obtidas através do experimento de gCOSY no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b). .... 70

Figura 14 – Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , obtidas através do experimento de gHSQC do etanol encontrado no pólen de <i>Melipona seminigra</i> (a) e <i>Melipona interrupta</i> (b). .....	71
Figura 15 – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ evidenciando os simpletos característicos do ácido acético em pólen de <i>Melipona seminigra</i> (a) e <i>Melipona interrupta</i> (b). .....	72
Figura 16 – Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , obtidas através do experimento de gHSQC do ácido acético encontrado no pólen de <i>Melipona seminigra</i> (a) e <i>Melipona interrupta</i> (b). .....	73
Figura 17 – Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de pólen com indicação das regiões que foram excluídas. ....	75
Figura 18 – Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de pólen após as exclusões necessárias. ....	75
Figura 19 – Gráfico de <i>scores</i> de PCA dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de pólen coletadas de colônias das abelhas sem ferrão <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> , em duas diferentes estações climáticas na cidade de Manaus – AM. ....	76
Figura 20 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> de Manaus – AM. ....	79
Figura 21 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos hidrogênios anoméricos da $\alpha$ -glicose em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> coletadas em Manaus – AM. ....	79
Figura 22 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos hidrogênios anoméricos da $\beta$ -glicose em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> coletadas em Manaus – AM. ....	80
Figura 23 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região de aminoácidos e de carboidratos em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> coletadas em Manaus – AM. ....	81
Figura 24 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região dos ácidos orgânicos, alcoóis e aminoácidos, responsáveis por diferenciar as amostras de pólen coletado por <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> de Manaus – AM. ....	82
Figura 25 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região dos compostos aromáticos em amostras de pólen <i>Melipona interrupta</i> coletadas em Manaus – AM. ....	85

Figura 26 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ referente a região dos compostos aromáticos em amostras de pólen de <i>M. seminigra</i> coletadas no período seco e chuvoso de Manaus – AM.....	86
Figura 27 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região da $\alpha$ -glicose em amostras de pólen coletadas por abelhas sem ferrão no período seco e chuvoso de Manaus - AM.....	88
Figura 28 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen coletadas por abelhas sem ferrão no período seco e chuvoso de Manaus - AM.....	88
Figura 29 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> no período seco e chuvoso de Manaus - AM.....	88
Figura 30 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região dos compostos aromáticos em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> coletadas diferentes estações climáticas (período seco e chuvoso) em Manaus – AM.....	89
Figura 31 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região dos aminoácidos em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> coletadas diferentes estações climáticas (período seco e chuvoso) em Manaus – AM.....	90
Figura 32 – Ampliação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen de <i>Melipona seminigra</i> e <i>Melipona interrupta</i> coletadas diferentes estações climáticas (período seco e chuvoso) em Manaus – AM.....	90
Figura 33 – Dendrograma dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de pólen coletado pelas abelhas <i>Melipona seminigra</i> (PS) e <i>Melipona interrupta</i> (PI) nos períodos seco e chuvoso da cidade de Manaus – AM.....	91

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Análises realizadas com o pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletado em março de 2010 no Meliponário GPA/INPA, Manaus – AM..... 47
- Tabela 2 - Resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos etanólicos de pólen coletado pelas abelhas *Melipona seminigra* (PS) e *M. interrupta* (PI) em Manaus - AM ..... 59
- Tabela 3. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e correlações  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (COSY) e  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (HSQC) dos constituintes químicos do pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona seminigra*. ..... 63
- Tabela 4. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e correlações  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (COSY) e  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (HSQC) constituintes químicos encontrados no pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona interrupta*. ..... 63

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Importância das abelhas sem ferrão.....	20
3.2 Meliponicultura.....	22
3.3 Caracterização das espécies utilizadas no estudo.....	22
3.3.1 <i>Melipona seminigra</i> .....	22
3.3.2 <i>Melipona interrupta</i> .....	24
3.4 Pólen como um alimento funcional.....	25
3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	26
3.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Quimiometria aplicada a dados de RMN.....	28
3.6.1 Análises Exploratórias.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Coleta das amostras.....	32
4.2 Locais de análises.....	34
4.3 Determinação da composição química centesimal e análises físico-químicas.....	35
4.4 Elaboração dos extratos etanólicos de pólen (EPEs) para análise de compostos fenólicos por CCD e atividade antioxidante.....	39
4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	40
4.6 Atividade antioxidante.....	40
4.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
4.8 Análises Quimiométricas.....	45
4.9 Análises estatísticas dos dados da composição química centesimal e características físico-químicas.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1 Composição centesimal das amostras de pólen.....	47
5.1.1 Umidade.....	47

5.1.2 Proteína.....	49
5.1.3 Lipídios.....	50
5.1.4 Cinzas .....	52
5.1.5 Fibra bruta .....	52
5.1.6 Carboidratos metabolizáveis.....	53
5.1.7 Valor energético .....	53
5.2 Características físico-químicas das amostras de pólen.....	54
5.2.1 pH .....	54
5.2.2 Sólidos totais .....	55
5.2.3 Atividade de água (Aw).....	55
5.3 Análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	56
5.4 Atividade antioxidante.....	59
5.5 Elucidações estruturais das substâncias encontradas no pólen coletadas pelas abelhas sem ferrão utilizando Espectroscopia de RMN .....	61
5.5.1 Elucidação dos carboidratos .....	63
5.5.2 Elucidação de aminoácido .....	67
5.5.3 Elucidação de outros compostos presentes no pólen coletado pelas abelhas sem ferrão amazônicas .....	69
5.6 Análises Quimiométricas dos dados de RMN de <sup>1</sup> H do pólen coletado pelas abelhas sem ferrão amazônicas .....	75
5.6.1 Estudo interespecífico do forrageio de abelhas sem ferrão com base na composição química das amostras do pólen coletado pelas diferentes espécies de abelhas <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i> (PC1).....	77
5.6.2 Estudo da influência da sazonalidade sobre o comportamento de coleta de pólen intraespecífico das abelhas <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i> (PC2) .....	82
5.6.3 Análise de agrupamentos hierárquicos - HCA .....	91
6 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS .....	96



## 1 INTRODUÇÃO

O pólen apícola (ou pão de pólen) é produzido pelas abelhas mediante a aglutinação do pólen das flores misturado ao néctar e às substâncias produzidas pelas glândulas salivares das abelhas (BRASIL, 2001), como as enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -glucosidase (SERRA-BONVEHÍ *et al.*, 2001). Estas buscam o pólen, para se alimentar, em um conjunto de plantas que é diferente para cada espécie de abelha (KERR *et al.*, 2001). O pólen, por ser de origem floral, pode ter sua composição nutricional variável (HERBERT & SHIMANUKI, 1978; STANDIFER, 1967) conforme a região ou estação do ano (MODRO *et al.*, 2007).

O pólen, a exemplo do mel, há tempos vem sendo utilizado na nutrição humana (DADANT, 1966), e apresenta em sua composição macronutrientes como proteínas, lipídeos e carboidratos, bem como micronutrientes e substâncias bioativas como as vitaminas, os minerais, carotenoides, flavonoides e fitosteróis (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005; SERRA-BONVEHÍ *et al.*, 2001), que podem apresentar atividade antioxidante (VILLARREAL *et al.*, 2009) e ajudar a prevenir diversas doenças degenerativas e cardiovasculares (CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991).

Há séculos o pólen coletado pelas abelhas é usado na medicina popular para prevenir e/ou aliviar constipação, gripe, úlcera, envelhecimento precoce (HANSSEN, 1979; LYGHEIM & SCAGNETTI, 1979), rinite alérgica (BOYE, 1990), hepatopatias (JUZWIAK, 1993) e teratogenia (ZHAO *et al.*, 1989; ZHAO *et al.*, 1990). Estes representam apenas alguns dos motivos pelos quais o pólen vem sendo utilizado como alimento alternativo e/ou suplemento alimentar (SOMERVILLE *et al.*, 2005; SOMERVILLE *et al.*, 2006).

A abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, é conhecida no Brasil como abelha africanizada, por ser um polihíbrido entre as abelhas exóticas, oriundas da Europa e da África

(GONÇALVES, 1974), e que estocam o pólen em células marginais de qualquer favo de cria. Já as abelhas sem ferrão, conhecidas também como abelhas indígenas ou meliponínios, são nativas de florestas tropicais como a floresta Amazônica e estocam o pólen em potes de cerume no interior da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997).

As abelhas transportam o pólen, até a colmeia, compactado com néctar nas corbículas do seu terceiro par de pernas traseiras (VIT & SANTIAGO, 2008). Após algum tempo de estocagem, as abelhas sem ferrão regurgitam substâncias glandulares dentro do pote com pólen para que este fermente e possa ser consumido por elas (KERR *et al.*, 1996).

Além da nutrição das abelhas, o pólen também é consumido tradicionalmente pelos seres humanos como fortificante ou remédio, adicionado ao mel (alimento conhecido como saburá), puro desidratado (ALMEIDA-MURADIAN, 2006), ou em cápsulas industrializadas, como um complemento alimentar. No entanto, o pólen mais estudado em todo o mundo é o coletado pela espécie de abelha *A. mellifera*, e pouco se sabe sobre a constituição química do pólen coletado por abelhas sem ferrão. Neste sentido, é importante conhecer suas características físico-químicas e composição química, a fim de tipificar o produto obtido de diferentes regiões, climas e espécies de abelhas, para realizar um melhor controle de qualidade e incentivar a criação de abelhas sem ferrão para extração comercial de seus produtos.

Segundo a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que trata do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola, e é baseada em pólen de *A. mellifera*, para que o mesmo seja comercializado, seu perfil deve ter as seguintes características: umidade máxima de 30%; teor de cinzas máximo de 4%; lipídios, mínimo de 1,8%; proteínas, mínimo de 8%; açúcares totais de 14,5 a 55,0%, fibra bruta,

mínimo de 2%, acidez livre máxima de 300 mEq/kg e pH de 4 a 6 (BRASIL, 2001; MARCHINI *et al.*, 2006), resta saber se as características do pólen coletado por abelhas sem ferrão estão de acordo com o exigido por este regulamento.

Tal Regulamento recomenda diferentes métodos convencionais para a análise do pólen apícola quanto as suas características químicas e físico-químicas. No entanto, para facilitar o controle de qualidade deste produto, além dos métodos convencionais de análise de alimentos, um método que pode ser empregado na análise dos diferentes tipos de pólen é a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), uma técnica moderna que permite, em uma única medida, a observação das substâncias passíveis de serem detectadas pela técnica e, presentes na amostra, inclusive em misturas complexas. No entanto, frente a um número muito grande de espectros, a comparação visual para a distinção entre eles torna-se bastante trabalhosa devido ao elevado número de informações neles contidas. Neste contexto, o uso de programas estatísticos nos permite distinguir, com clareza, as sutilezas tanto em relação à variação dos constituintes químicos quanto à sua quantidade (DEFERNEZ & COLQUHOUN, 2003).

Ferramentas como os métodos quimiométricos são muito valiosas na avaliação dos perfis presentes nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , pois permitem analisar similaridades ou diferenças na composição química das amostras e até mesmo, possíveis marcadores químicos de origem geográfica, espécie-específica e/ou sazonal. A análise por componentes principais (PCA) bem como a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA), não só apresentam as relações entre amostras e variáveis, como também transformam dados complexos em dados mais simples e ressaltam as informações mais relevantes, por isso estão sendo muito empregadas na análise de dados de RMN (MASSART *et al.*, 2001).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a composição química e as características físico-químicas do pólen coletado pelas abelhas sem ferrão amazônicas *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta*, visando um melhor conhecimento dos constituintes desse alimento, principalmente os de importância na nutrição e saúde humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, fibra bruta, carboidratos metabolizáveis e valor energético de amostras de pólen coletadas em colônias das espécies de *M. seminigra* e *M. interrupta*.
- Analisar as características físico-químicas quanto ao pH, sólidos totais e atividade de água, das amostras de pólen, coletadas de colônias, das espécies de abelha sem ferrão *M. seminigra* e *M. interrupta*.
- Verificar a presença de compostos fenólicos por cromatografia de camada delgada (CCD) e a atividade antioxidante de extratos etanólicos de pólen, coletado pelas abelhas nativas *M. seminigra* e *M. interrupta*.
- Realizar análise semiquantitativa da composição química de extratos metanólicos brutos de pólen, coletado de colônias das espécies de abelha *M. seminigra* e *M. interrupta*, por meio da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.
- Analisar amostras de pólen coletado pelas abelhas sem ferrão *M. seminigra* e *M. interrupta*, através da análise de dados de RMN de  $^1\text{H}$  por Quimiometria nas duas diferentes estações climáticas (período seco e chuvoso) de Manaus – AM.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Importância das abelhas sem ferrão

As abelhas sem ferrão são conhecidas assim por possuírem seu aparelho de ferrão atrofiado (KERR *et al.*, 2001), sendo esse um dos fatores que facilita o manejo destas espécies, comparado ao da espécie *A. mellifera*, que possui ferrão.

Segundo Kerr (1998) as espécies de meliponíneos são encontradas, em grande parte, nas florestas tropicais (mais de 60%), sendo que a floresta Amazônica, com sua rica biodiversidade, é conhecida como “o berço natural e mundial das abelhas sem ferrão” (VIEIRA *et al.*, 2008).

Há muitas espécies de abelhas sem ferrão ainda desconhecidas pela Ciência. No entanto, são muito conhecidas pelas populações tradicionais que sabem há muito tempo dos benefícios que elas podem oferecer (FRAZÃO & SILVEIRA, 2004).

A importância das abelhas sem ferrão para região Amazônica é incalculável, não apenas pelos produtos por elas produzidos (Figura 1): mel, pólen, cerume e própolis, mas também, pela polinização das plantas (KERR *et al.*, 2001), já que são responsáveis por 40 a 90% da polinização da flora nativa, de acordo com o ecossistema (KERR *et al.*, 1996), além da dispersão de sementes de espécies de importância madeireira (BACELAR-LIMA *et al.*, 2006).

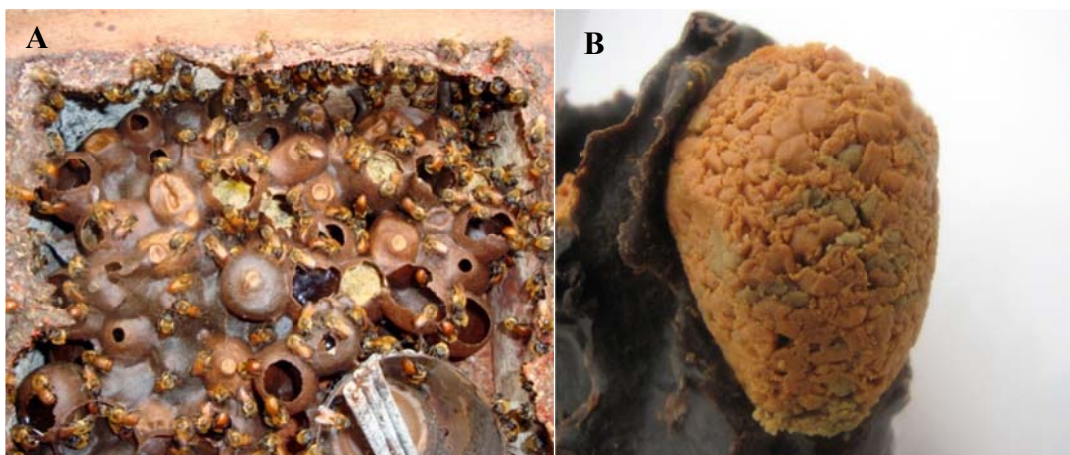


Figura 1 – Potes com pólen. A - Pólen armazenado em colônia de *Melipona seminigra* (Foto de Francini, I. B.); B – Pote aberto com pólen em detalhe (Foto de Alves, R. M. O).

O processo de polinização ocorre quando os grãos de pólen de uma flor (gametas masculinos) passam para o estigma (receptor do aparelho feminino) de outra flor da mesma espécie, o que é propiciado pelas abelhas quando forrageiam de flor em flor e, deste modo, auxiliam na fertilização das plantas resultando na produção de frutos e sementes (IMPERATRIZ-FONSECA, CONTRERA & KLEINERT, 2004).

No entanto, muitos ninhos de meliponíneos, de diversas espécies, vêm sendo destruídos por ações humanas, como os desmatamentos e queimadas, que destroem a vegetação do entorno, já que a maioria das abelhas sem ferrão nidifica em ocos de árvores de médio porte (CARVALHO, 2001). Os melieiros também destroem os ninhos para a retirada do mel e muitas vezes desperdiçam os outros produtos que poderiam ser aproveitados, podendo até eliminar a colônia (FRAZÃO & SILVEIRA, 2004).

É necessário dar maior atenção às abelhas sem ferrão, pois caso as abelhas sejam destruídas, as plantas que dependem de fecundação por estes insetos, em breve, poderão desaparecer, uma vez que terão sua produção de sementes reduzida. Portanto, o declínio das

populações de abelhas pode acarretar queda na produtividade agrícola (WITTER *et al.*, 2009) de diferentes culturas.

### **3.2 Meliponicultura**

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

A Meliponicultura para fins paisagísticos e econômicos representa uma alternativa de sustentabilidade e conservação (RÊGO *et al.*, 2008), pois visa aliar a criação de abelhas sem ferrão e o manejo de seus produtos, à conservação do meio ambiente (KERR *et al.*, 1996, BUSTAMANTE *et al.*, 2008). Além disso, ajuda a gerar renda aos produtores, a manter a floresta em pé, e seus produtos, como o pólen, podem ser usados na nutrição da humana.

Estes são apenas alguns dos motivos pelos quais é importante conhecer e aprender a manejar as espécies de abelhas sem ferrão corretamente na Meliponicultura.

### **3.3 Caracterização das espécies utilizadas no estudo**

#### **3.3.1 *Melipona seminigra***

No Estado do Amazonas, a abelha *M. seminigra* Cockerell, 1919 pode ser encontrada desde o baixo rio Purus passando pela região de Manaus e, ao norte ao longo do rio Negro

(PERALTA *et al.*, 1999). O número de abelhas presentes na colônia é de, aproximadamente, 1.300 indivíduos adultos que são pouco agressivos (CARVALHO-ZILSE, 2006; PORTUGAL-ARAÚJO, 1978).

A entrada característica do ninho em forma de trombeta raiada e curta torna-a conhecida popularmente como uruçú-boca-de-renda ou jandaíra (PORTUGAL-ARAÚJO, 1978; PERALTA *et al.*, 1999) (Figura 2).



Figura 2 – Abelha *Melipona seminigra*. A - Entrada característica do ninho (Foto: Rebelo, K. S.); B – Colônia em caixa de criação padronizada (Foto: Paolineli, V.).

Estudos apontam a *M. seminigra* como potencial polinizadora de várias espécies vegetais (MARQUES-SOUZA *et al.*, 2002; PORTUGAL-ARAÚJO, 1978).

Por ser uma espécie muito produtiva, é muito procurada por meleiros (extrativistas) e pode ser eliminada rapidamente de nossa floresta. Segundo Kerr (2002), esta espécie é classificada como presumivelmente ameaçada de extinção, merecendo atenção conservacionista, sendo a criação em cativeiro uma boa estratégia para sua preservação.



### 3.3.2 *Melipona interrupta*

A espécie *M. interrupta* se destaca por ter sido uma das primeiras a serem criadas para produção de mel no Brasil. Esta espécie tem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Panamá até o estado do Maranhão (KERR, 1996). Na Amazônia, é conhecida popularmente como jupará ou jandaíra preta da Amazônia, podendo ser encontrada desde Manaus até a Guiana Inglesa (PERALTA *et al.*, 1999) sendo polinizadora de várias espécies vegetais (MARQUES-SOUZA, 1996; MARQUES-SOUZA *et al.*, 2002).

A colônia dessa espécie é constituída, em média, por 5.000 operárias, 250 machos e uma rainha (Figura 3). As operárias medem cerca de 1,3 cm e são pouco defensivas. A entrada do ninho desta espécie é feita de resina misturada com barro endurecido de cor esbranquiçada (KERR, 2002).

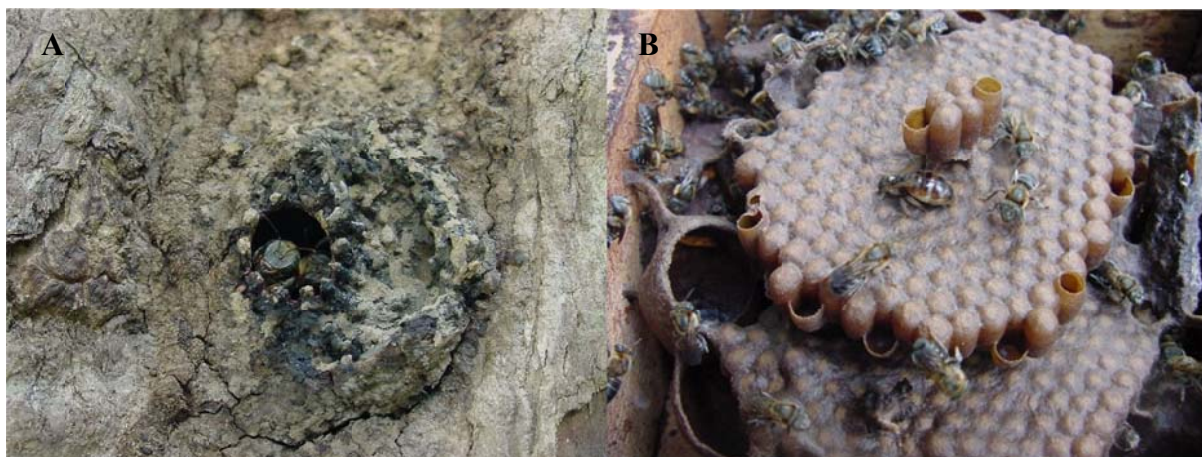


Figura 3 - Abelha *Melipona interrupta*. A – Entrada do ninho. (Foto: Vilas, H. C.); B – Colônia em caixa padronizada. (Foto: Zilse, N.).

### 3.4 Pólen como um alimento funcional

Os alimentos que contêm compostos bioativos, como as substâncias antioxidantes, podem ser chamados de alimentos funcionais (PENNINGTON, 2002). Substâncias como certas vitaminas, minerais, polifenóis, entre outras, apresentam papéis importantes na promoção da saúde, prevenindo doenças associadas à ação dos radicais livres (SOARES *et al.*, 2003), como problemas cardiovasculares, muitas formas de câncer e o processo de envelhecimento (GOH *et al.*, 2003).

O uso de medicamentos, tabagismo, condições nutricionais, consumo de álcool e poluição do ar, influenciam a diminuição dos níveis de agentes antioxidantes nas células (ROE, 1992). Todavia, as defesas antioxidantes do organismo podem ser recuperadas por meio da ingestão de dietas apropriadas ou suplementos vitamínicos (CARAGAY, 1992).

O papel dos alimentos, que contêm substâncias antioxidantes, na prevenção de doenças tem sido cada vez mais reforçado com o aparecimento de evidências que indicam a importância dos radicais livres e outros oxidantes como responsáveis por doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (ATOUI *et al.*, 2005; PEREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2006).

O pólen pode ser considerado um alimento funcional devido ao seu alto valor nutritivo e teor de compostos fenólicos (LEJA *et al.*, 2007; MARGHITAS *et al.*, 2009), que lhe conferem atividades antioxidantes (ALMARAZ-ABARCA *et al.*, 2007; CARPES *et al.*, 2008; LEBLANC *et al.*, 2009; VILLARREAL *et al.*, 2009) e são capazes de reduzir o risco de doenças crônicas (LUTHRIA, 2006).

A composição nutricional do pólen apícola consiste de proteínas, lipídios, fibras, minerais como o potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, ferro, cobre e zinco (MARCHINI *et al.*, 2006), vitaminas como a tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxina, meso-inositol, biotina e ácido fólico (CARPES, 2008), precursores de vitamina A como o betacaroteno (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009), aminoácidos livres como a alanina, arginina, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, entre outros (PARAMAS *et al.*, 2006), carboidratos como os açúcares simples (QIAN *et al.*, 2008) e o amido, além de esteróis (DAY *et al.*, 1990).

A maior parte do pólen apícola estudado e comercializado é proveniente de colônias da abelha *A. mellifera*. Porém, muitas abelhas sociais, como as abelhas sem ferrão também coletam e armazenam pólen (SILVA *et al.*, 2006). Apesar do crescente consumo dos produtos das abelhas brasileiras sem ferrão, e conseqüente aumento da sua produção, pouco se sabe sobre suas propriedades nutracêuticas (SOUZA *et al.*, 2004) e das características dos seus constituintes.

### **3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual. É um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato. A cromatografia se desenvolve com a fase móvel migrando através da fase estacionária por ação da capilaridade, processo denominado corrida (NETO,

2003). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária os componentes da mistura migram de maneiras diferentes (COLLINS, BRAGA & BONATO, 1990).

Os reveladores, também denominados de agentes cromogênicos, são agentes físicos ou químicos que reagem com as substâncias incolores separadas pela CCD, formando colorações perceptíveis a olho nu. Num *screening* fitoquímico é conveniente aplicar-se mais de um revelador para a caracterização das substâncias separadas. Alguns reativos são específicos para a caracterização dos grupos químicos de compostos fenólicos como os flavonoides (DOMÍNGUEZ, 1975).

O método físico que utiliza a luz ultravioleta (UV) como revelador é um dos métodos mais usados para revelação de substâncias separadas por CCD. Por este procedimento, muitos compostos podem ser visualizados por se tornarem fluorescentes. Este fenômeno ocorre devido à existência de grupamentos chamados cromóforos que são responsáveis pelo fenômeno das cores, que ocorre em virtude dos elétrons, ao absorverem a luz ultravioleta, passarem para um nível mais excitado (o elétron passa para um orbital de maior energia - estado instável) e ao retornarem ao seu nível fundamental (estado estável – orbital de menor energia), emitem um fóton, que é visto como fluorescência. As lâmpadas de ultravioleta emitem energia e assim, os compostos orgânicos, quando expostos a luz UV na faixa da luz visível, absorvem energia eletromagnética o que permite detectar relações entre grupos funcionais, como a conjugação entre duas ou mais ligações duplas ou triplas carbono-carbono e carbono-oxigênio; entre ligações duplas e anéis aromáticos; e mesmo a presença de anéis aromáticos (MORRISON & BOYD, 1996).

O anisaldeído sulfúrico quando aplicado à placa de CCD e aquecido a aproximadamente 100 °C, é capaz de revelar monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos,

triterpenos e polifenóis através da observação de manchas arroxeadas, rosadas e avermelhadas. O anisaldeído sulfúrico também é capaz de revelar óleos essenciais na região do visível, pois os compostos dos óleos essenciais demonstram forte coloração azul, verde, vermelho e marrom (COSCIA, 1984).

A solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) a 3% em etanol atua como um agente oxidante, e ajuda a detectar grupos hidroxilas (OH) aromáticos, como os flavonoides e taninos. Os polifenóis são oxidados pelo ( $\text{FeCl}_3$ ) verificando-se o desenvolvimento de coloração escura quase negra para os flavonoides e manchas escuras quase negras, azuladas ou esverdeadas para os taninos. O cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 1% em etanol apresenta fluorescência amarela na luz UV- 365 nm e é capaz de revelar flavonoides e todos os alcaloides (SIMÕES,1999).

### **3.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Quimiometria aplicada a dados de RMN**

Várias técnicas analíticas têm sido aplicadas com sucesso na investigação dos constituintes químicos dos produtos apícolas (KOSHIO & MURADIAN, 2003; PADOVAN *et al.*, 2003; PARK, MASAHARU & ALENCAR, 2000). A RMN tem sido utilizada com este objetivo, pois é uma técnica não destrutiva, que dispensa processos demorados de preparo e purificação de amostras, sendo um procedimento rápido e que ainda apresenta a vantagem de mostrar em um único espectro todas as possíveis classes de substâncias presentes na amostra e que estejam em quantidades detectáveis (GIL *et al.*, 2003; LOLLI *et al.*, 2008).

O princípio da RMN se baseia nas medidas da absorção de ondas de rádio por núcleos imersos em um campo magnético. Com o retorno do núcleo excitado ao estado inicial ocorre

a emissão de energia no domínio temporal (em função do tempo), e que, após a Transformada de Fourier, passamos para o domínio de frequências, obtendo-se assim os espectros de RMN.

Os espectros de RMN, obtidos de material vegetal, geralmente apresentam uma grande quantidade de informações, muitas vezes com sinais sobrepostos e com alto grau de semelhança entre diferentes amostras, o que pode dificultar a interpretação dos dados quando é analisado um grande número de amostras (LEÃO, 2010). No entanto, para auxiliar a análise dos dados de RMN, uma ferramenta muito útil é a Quimiometria, que facilita a avaliação das similaridades e diferenças na composição química das amostras (BELTON *et al.*, 1998). Segundo Lião *et al.* (2010), uma forma de aperfeiçoar as análises quimiométricas é selecionar as variáveis mais importantes para a discriminação entre os grupos ou classes de amostras.

A definição do conceito de quimiometria pode ser entendida como a disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar e selecionar condições ótimas de medidas, a fim de potencializar o entendimento das informações de um conjunto de dados químicos, apresentando-os de forma mais simplificada (BEEBE, 1998).

A RMN aliada à quimiometria tem sido empregada com sucesso na análise de alimentos. Vários trabalhos já foram publicados, dentre eles: a caracterização das variedades de maçãs utilizadas em sucos de frutas (BELTON *et al.*, 1998), o controle de qualidade de cerveja (DUARTE *et al.*, 2002), de óleos de oliva (MANNINA *et al.*, 2003) e outros óleos vegetais (PRESTES *et al.*, 2007), o estudo da origem geográfica de vinhos (BRESCIA *et al.*, 2002; KOSIR *et al.*, 2001), a detecção de adulteração em sucos de laranja (VOGELS *et al.*, 1996), a discriminação entre tomates convencionais e geneticamente modificados (LE GALL *et al.*, 2003) e entre cafés do tipo arábica e robusta (TAVARES *et al.*, 2005).

Consonni e Gatti (2004) aplicaram o método quimiométrico PCA aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de vinagres balsâmicos e verificaram diferenças entre os que passaram por diferentes períodos de envelhecimento, que podem estar relacionadas à concentração de ácido acético, HMF (5-hidróximetil-2-furfural), ácido málico e glicose.

Trabalhos realizados com mel de *A. mellifera* têm mostrado resultados excelentes, onde foi possível discriminar, utilizando as técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e SNIF-NMR em conjunto, amostras de diferentes méis (silvestre, de eucalipto, de laranjeira, de assa-peixe e de cana-de-açúcar) coletadas no estado de São Paulo (BOFFO *et al.*, 2007).

### 3.6.1 Análises Exploratórias

A análise exploratória dos dados é utilizada para agrupar amostras que possuam características comuns a um grupo, e distingui-las daquelas com características diferentes (BOFFO, 2009; LEÃO, 2010). Ela também auxilia na identificação de amostras não usuais ou *outliers*, que não seguem o padrão das demais (FERREIRA *et al.*, 1999). Além disso, as correlações entre as variáveis são analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade maior de informações, muitas vezes impossível de se obter quando as variáveis são analisadas individualmente (BEEBE *et al.*, 1998).

Para a obtenção dessas informações é construída uma matriz de dados, cujas linhas se referem aos espectros de RMN de  $\text{H}^1$  obtidos das amostras, e as variáveis que correspondem aos parâmetros dos experimentos (deslocamentos químicos, intensidades e multiplicidades dos sinais em número de pontos) referem-se às colunas (ALCANTARA, 2007; BOFFO, 2009). Esta matriz é submetida a algumas operações matemáticas prévias, com o objetivo de

remover variações indesejáveis. As operações aplicadas às variáveis são denominadas de pré-processamento, já as aplicadas às amostras são chamadas de transformações (SANTOS, 2009).

Dentre os métodos exploratórios destacam-se a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) (TAVARES, 2007). A PCA consiste na manipulação de uma matriz de dados com o objetivo de projetar dados n-dimensionais em um espaço com menos dimensões. Em uma PCA é possível realizar a verificação do agrupamento das amostras que são semelhantes entre si e a discriminação em classes daquelas diferentes (LEÃO, 2010). Neste método, os dados originais da matriz passam a ser representados por novas variáveis chamadas de PCs, que são ortogonais entre si e construídas de forma que as informações mais relevantes pertençam as primeiras PCs, e as de menor importância, pertençam às últimas (ALCANTARA, 2007; BOFFO, 2009). A primeira PC é a combinação das variáveis que explicam a maior quantidade de variação dos dados. A segunda PC contém o máximo da quantidade de variação não explicada pela primeira e é independente dela (MASSART *et al.*, 2001; WINNING *et al.*, 2008).

Dois tipos de gráficos podem ser gerados na análise por PCA, os gráficos de *scores* e os de *loadings*, cujos eixos são as PCs nas quais os dados são projetados. Em um gráfico de *scores* cada ponto corresponde a uma amostra. Já no gráfico de *loadings* cada ponto corresponde a uma variável, e evidencia as similaridades e as correlações entre as mesmas. Além disto, este gráfico evidencia quais variáveis são responsáveis pelas posições relativas das amostras no gráfico de *scores* (JALALI-HERAVI *et al.*, 2004). Portanto, com auxílio destes gráficos é possível examinar as relações entre as amostras e as variáveis, além de



estimar a influência de cada variável em cada amostra e verificar quais são as informações de maior ou menor importância (BEEBE *et al.*, 1998).

A Análise por Agrupamentos Hierárquicos - HCA é uma ferramenta excelente para a análise preliminar dos dados (BEEBE *et al.*, 1998), sendo útil para determinar a semelhança entre as amostras. Este método revela o agrupamento natural das amostras e o parâmetro usado neste processo é a medida de distância entre as amostras. Estas distâncias, quando visualizadas através de gráficos denominados de dendrogramas indicam as amostras mais semelhantes entre si, ou seja, quanto menor a distância entre os pontos, maior será a semelhança entre as mesmas (BECKONERT *et al.*, 2003; MASSART *et al.*, 2001). Isto é melhor observado através do índice de similaridade, que varia de 0,0 a 1,0, de maneira que 0,0 corresponde às amostras sem similaridades e 1,0 às amostras idênticas (LEÃO, 2010).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta das amostras**

Todas as amostras de pólen foram coletadas do Meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) que se encontra no Campus Sede do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e conta com uma área verde (mata secundária) de 255ha situada na área urbana de Manaus-AM e contígua ao fragmento florestal do Campus da Universidade Federal do Amazonas - UFAM (~750ha) que apresenta áreas de mata primária e secundária. As abelhas utilizam ambas as áreas para forrageio.

Para as análises da composição nutricional, perfil físico-químico, compostos fenólicos e capacidade antioxidante, foram coletados aproximadamente 200 g de pólen de colônias de

cada espécie de abelhas sem ferrão, *M. seminigra* e *M. interrupta*, em março de 2010. Os potes de cerume, contendo pólen em seu interior, foram retirados diretamente da melgueira das caixas de criação racional das espécies selecionadas e transportados até o Laboratório do GPA para que fossem desoperculados. As amostras foram homogeneizadas, liofilizadas por oito horas, em liofilizador Terroni (LS-3000), maceradas e armazenadas em frascos com tampa, mantidos sob refrigeração até o momento das análises.

Para a identificação das substâncias químicas, contidas no pólen, através da técnica de RMN, as amostras de pólen foram coletadas de duas diferentes colônias, de cada espécie de abelha (*M. seminigra* e *M. interrupta*), nos meses de março/2010 e outubro/2010 formando, portanto, oito amostras coletadas em dois diferentes períodos do ano. Estas amostras foram misturadas, formando duas amostras, uma com o pólen de *M. seminigra* (mistura do pólen coletado em dois diferentes períodos do ano) e outra com o pólen de *M. interrupta* (mistura do pólen também coletado em dois diferentes períodos do ano), com o intuito de utilizar amostras mais representativas.

O período em que ocorrem chuvas na cidade de Manaus - AM costumar ser de dezembro a maio, com o pico nos meses de fevereiro, março e abril. O período de junho a novembro é considerado seco, quando a precipitação é escassa. No ano de 2010 ocorreu a maior seca já registrada no estado do Amazonas. No entanto, apesar da redução das chuvas no referido ano, as amostras utilizadas nas análises de RMN e quimiometria foram coletadas no início do mês subsequente ao mais chuvoso (2/2010) e ao menos chuvoso (9/2010), que correspondem aos meses de março e outubro/2010, respectivamente, conforme dados do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) (Figura 4).

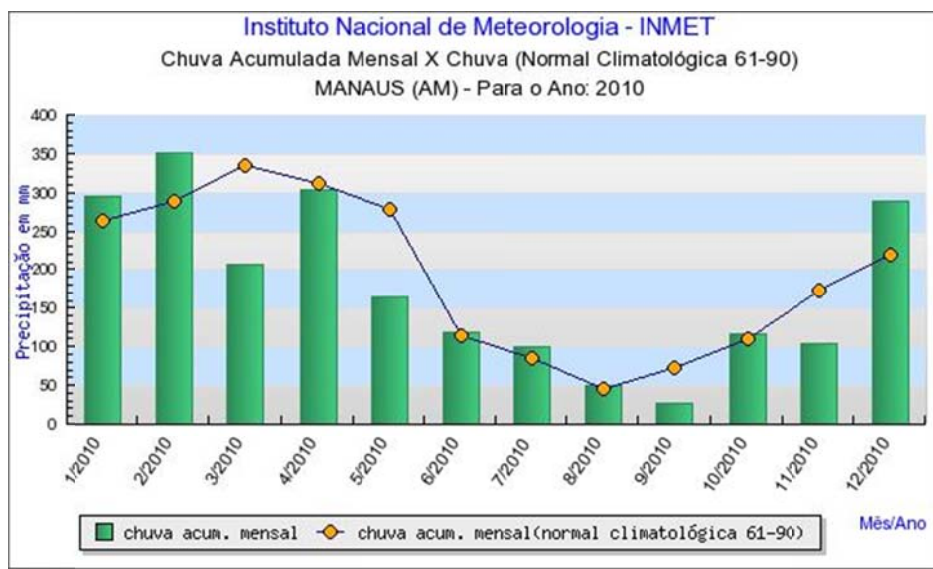


Figura 4 – Gráfico de chuva acumulada nos meses de janeiro a dezembro de 2010 em Manaus – AM.

FONTE: Retirado de <[http://www.inmet.gov.br/sim/gera\\_graficos.php](http://www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php)> Acesso em: 08 fev 2011.

Para a análise quimiométrica em dados de RMN, foram coletadas 16 amostras de pólen (aproximadamente 2 g cada), sendo quatro amostras provenientes de quatro diferentes colônias de *M. seminigra* no período chuvoso (início do mês de março), e mais quatro amostras no período seco (início do mês de outubro), destas mesmas quatro colônias. De modo semelhante, foram coletadas as amostras de pólen das colônias de *M. interrupta*.

#### 4.2 Locais de análises

As análises do teor de umidade, fibra bruta, cinzas e a liofilização das amostras foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do Pescado I e II/UFAM. As análises do teor de proteínas, lipídios, do pH e da atividade de água foram realizadas no Laboratório da Central Analítica/UFAM. A análise do perfil químico por CCD e da atividade antioxidante de extratos

etanólicos de pólen foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção/INPA. Já as análises de RMN e de Quimiometria foram realizadas no Laboratório de RMN da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), SP.

#### **4.3 Determinação da composição química centesimal e análises físico-químicas**

Para a determinação da composição centesimal e características físico-químicas, todas as análises foram realizadas em triplicata. Amostras de pólen fresco foram utilizadas nas análises de atividade de água, pH, sólidos totais e umidade, sendo que as outras análises foram realizadas em base seca.

O teor de umidade foi avaliado (logo após a coleta das amostras e novamente após a desidratação das mesmas) através de dessecação em estufa com circulação de ar, a 70°C, até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para isso, foram pesados, em balança analítica, dois gramas de pólen, em cadinhos de alumínio previamente tarados. A cada três horas os cadinhos foram retirados da estufa, resfriados em dessecador, com sílica gel, e pesados em balança analítica. A fórmula utilizada para o cálculo foi a seguinte:

$$U = \frac{(AU - AS) \times 100}{AU}$$

Onde:

AU= amostra úmida

AS= amostra seca

O percentual de proteína foi analisado pelo método Micro Kjeldhal (AOAC, 1995), aonde se determina o conteúdo de nitrogênio orgânico total da amostra, que nos alimentos representa a maior parte do nitrogênio das proteínas. Foi realizada a digestão de 0,1g de cada amostra com ácido sulfúrico até que o carbono e o hidrogênio fossem oxidados, restando o nitrogênio da proteína. As amostras foram diluídas com água destilada, transferindo-as para um balão de 100 mL e completando o volume do balão. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 10mL da amostra diluída e adicionou-se 10 mL de NaOH a 50% para a liberação do nitrogênio (na forma de amônia) que por destilação foi recolhido em uma solução de ácido bórico. Através de titulação com ácido clorídrico (HCl) 0,02N padronizado, determinou-se a quantidade de nitrogênio presente na amostra. Como catalisador, foi utilizada uma mistura catalítica (1g) a base de sulfato de sódio, selenito de sódio e sulfato de cobre. O fator 5,6 foi usado para a conversão do teor de nitrogênio em proteínas. Para os cálculos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$N\% = \frac{(VA - VB) \times 0,02 \times FC \times 0,014 \times 100}{PAS}$$

$$P\% = N \times 5,6$$

Onde:

VA = volume da amostra

PAS = peso da amostra seca

VB = volume do branco

P = proteínas

FC = fator de correção do HCl

N = nitrogênio

Amostra diluída = PAS ÷ 10

A determinação de lipídios foi realizada através do método de Bligh-Dyer (BLIGH & DYER, 1959), que consiste na extração dos lipídios com uma mistura de solventes (clorofórmio, metanol e água), a frio. As amostras foram misturadas com clorofórmio, metanol e água, numa proporção que formou uma só fase com a amostra (1:2:0,8). Em seguida, foram adicionados mais clorofórmio (10 mL) e sulfato de sódio 1,5% (10 mL) de maneira a formar duas fases distintas: uma de clorofórmio, contendo os lipídios, e outra de metanol mais água, contendo as substâncias não lipídicas. A fase contendo o clorofórmio e os lipídios foi isolada através de filtragem dos sólidos (amostra) e descarte da fase metanólica e, após a evaporação do clorofórmio em estufa a 100°C, foi obtida a quantidade de gordura por pesagem. A quantificação foi realizada com as seguintes fórmulas:

$$\%LT = \frac{PL \times 4 \times 100}{PA}$$

Onde:

LT = lipídios totais

PL = peso dos lipídios

PA = peso da amostra

O conteúdo de cinzas foi determinado por meio de incineração em mufla a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Foram pesados cinco gramas das amostras em cápsulas de porcelana previamente taradas. As amostras foram carbonizadas para eliminar os gases e dessa maneira evitar que incendiassem no interior do forno mufla, impedindo que houvesse perdas desta maneira. Quando as amostras tornaram-se brancas, foram retiradas do forno mufla, esfriadas em dessecador e pesadas. O cálculo do percentual de cinzas foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula.

$$C\% = \frac{PC \times 100}{PA}$$

Onde:

C = cinzas

PC = peso das cinzas

PA = peso da amostra

Para a determinação do percentual de fibra bruta, foram pesados dois gramas de cada amostra (secada e desengordurada) para a realização de uma digestão ácida, com solução de ácido sulfúrico 1,25% por 30 minutos. Em seguida foi realizada a filtragem do ácido e lavagem da amostra com água para a realização de uma digestão alcalina, com hidróxido de sódio 1,25%, por mais 30 minutos. Após a secagem das amostras em estufa, com posterior pesagem, as mesmas foram incineradas em mufla a 550 °C, seguida de esfriamento e pesagem dos cadinhos para a quantificação (AOAC, 1997).

$$F\% = \frac{RA \times 100}{PA}$$

Onde:

F = fibra

RA = massa (g) do resíduo da amostra no papel (dessecado)

PA = massa em grama da amostra inicial

O teor de carboidratos metabolizáveis foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteína, lipídios, fibras e cinzas (AOAC, 1997).

O valor energético foi calculado a partir dos teores de proteínas, carboidratos metabolizáveis e lipídeos, de acordo com os fatores de Atwater (4-4-9 kcal/g), aonde 1g de

proteínas e carboidratos fornece 4 calorias, enquanto 1g de lipídios fornece 9 calorias (MERRILL & WATT, 1973).

Para a determinação do pH por potenciometria, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), foram misturados dez gramas da amostra triturada em 100 mililitros de água destilada. O pH foi determinado utilizando-se um pHmetro digital, previamente calibrado, modelo pHs-3B da Labmeter<sup>®</sup>, com eletrodo combinado.

A quantificação de sólidos totais foi determinada por gravimetria, através da diferença entre o peso total da amostra fresca e o seu conteúdo de umidade (CECCHI, 2003).

A atividade de água, que consiste no teor de água disponível para o crescimento de microrganismos, e pode ser descrita como a relação entre a pressão de vapor da solução e a pressão de vapor do solvente puro (CORREIA-OLIVEIRA *et al.*, 2008), foi analisada de amostras de pólen frescas, em aparelho determinador específico de atividade de água, Pawkit (Decagon<sup>®</sup>), à temperatura média de 25,2°C.

#### **4.4 Elaboração dos extratos etanólicos de pólen (EPEs) para análise de compostos fenólicos por CCD e atividade antioxidante**

Os extratos etanólicos de pólen (EPEs) foram preparados com 2 g de amostras previamente liofilizadas, homogeneizadas e trituradas, diluindo-as em 15 mL de etanol (70%), em banho-maria a 50 °C, sob agitação por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas, em papel de filtro Watman nº 5, e armazenadas em tubos de ensaio com tampa de rosca a 5 °C (ALENCAR, 2002; CARPES *et al.*, 2008; KROYER & HEGEDUS, 2001; NEVES *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 1998).



#### 4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a realização das análises do perfil químico por CCD, os EPEs foram concentrados em banho maria por 10 minutos. Foram realizados testes com diversos solventes como fase móvel (AcOET 100%, acetona 100%, acetona e AcOET 1:1), sendo que o sistema acetona: diclorometano (1:1, v/v) apresentou a maior eficiência para separação dos constituintes químicos. Foram usadas cromatofolhas de alumínio com sílica gel como fase estacionária.

Os EPEs foram aplicados no ponto de origem acerca de um centímetro da base da placa, e após a evaporação do solvente, a placa foi colocada em contato com a fase móvel contida em uma cuba cromatográfica. Em seguida as cromatoplacas foram secadas e reveladas com diversos agentes físicos e químicos.

As cromatoplacas foram visualizadas sob a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Os reveladores químicos colorimétricos utilizados para a visualização das substâncias separadas pela CCD foram o sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$ ) e anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento, cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) com visualização a 365 nm, cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) e DPPH•. Estas soluções reveladoras foram borrifadas sobre as placas cromatográficas, para tornarem visíveis as substâncias incolores, presentes na amostra e, separadas pela CCD.

#### 4.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de pólen foi determinada por meio de métodos que utilizam o DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET, 1995) e o  $\text{Fe}^{3+}$  como agentes oxidantes.

O DPPH• é um radical livre que aceita um elétron, ou um radical de hidrogênio, para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma é reduzido na presença de um antioxidante, perdendo sua coloração púrpura. Na forma de radical, o DPPH• possui uma absorção característica a 517 nm, que desaparece após a redução pelo hidrogênio retirado de um composto antioxidante (NEVES *et al.*, 2009).

Para a realização do teste de atividade antioxidante com o DPPH• foi preparada uma solução de ácido ascórbico em água deionizada (44mg:50mL), resultando nas seguintes concentrações de ácido ascórbico: 0, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. Uma curva foi construída adicionando-se 990 µL de uma solução de DPPH• (2,8mg de DPPH• : 1 mL de DCM e avolumado até 100 mL de MeOH) em seis micro-tubos e completou-se com 10 µL das soluções de ácido ascórbico diluídas. Após 30 minutos realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Após estes procedimentos, uma alíquota de 10 µL das soluções dos EPEs foi transferida para um microtubo. Em seguida, adicionou-se 990 µL da solução de DPPH• e após 30 minutos mediu-se a absorbância em um espectrofotômetro UV-VIS (AquaMate) no comprimento de onda de 517 nm. O controle foi preparado de modo semelhante, substituindo a amostra por água deionizada.

No método que utiliza o  $\text{Fe}^{3+}$  como agente oxidante é quantificada a formação do  $\text{Fe}^{2+}$  pela existência de substâncias redutoras presentes nos extratos e que permitem a redução do  $\text{Fe}^{3+}$ . Para isso 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL de uma solução de  $\text{Fe}^{3+}$  1000µg/mL (8,6341 g de sulfato férrico amoniacal em 1L HCl 1%) foi misturada a 160 µL de hidroxilamina a 10% (1g de cloreto de hidroxilamônio em 10mL de água deionizada), e 800 µL de fenantrolina a 0,25%

(0,25 g de 1,10-fenantrolina : solução tampão de acetato de sódio até completar o volume de 1000mL)

Uma curva foi construída adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  das soluções diluídas de ferro III, seguido de 980  $\mu\text{L}$  da solução de fenantrolina e completou-se com 10  $\mu\text{L}$  da solução de ácido ascórbico. Após 60 minutos realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de 515 nm.

Para averiguação da atividade antioxidante dos EPEs, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão de  $\text{Fe}^{3+}$  com concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi transferida para um microtubo, adicionando-se, em seguida, 10  $\mu\text{L}$  dos EPEs. Adicionou-se ainda 980  $\mu\text{L}$  de uma solução de 1,10-fenantrolina 0,25% e homogeneizou-se a mistura. O branco foi preparado de modo semelhante, substituindo-se a amostra por água deionizada. Após 1 hora, mediu-se a absorvância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 515 nm (NOVAES, 2007).

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e as soluções contendo DPPH• e  $\text{Fe}^{3+}$  foram protegidas da exposição direta à luz. Os resultados foram expressos em equivalência média e desvio-padrão. As equivalências dos extratos foram comparadas com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante. O valor da equivalência representa quantos gramas da amostra equivale à mesma atividade de 1 g de ácido ascórbico. Deste modo, quanto mais próximo o valor da equivalência for de 1, maior é a atividade antioxidante da amostra.

#### 4.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises consistiram nas medidas de RMN de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e experimentos bidimensionais (2 D) de correlação homonuclear (H/H) *g*COSY (*Correlated Spectroscopy*) e correlação heteronuclear (C/H) *g*HSQC (*gradient Hetero Single Quantum Coherence*) a curta distância. Para isso, foi utilizado um espectrômetro de RMN da marca Bruker, modelo DRX400 de 9.4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio), equipado com uma sonda de 5 mm com detecção inversa (BBI) à temperatura de 298 K, que está localizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – SP.

Para a obtenção dos espectros de  $^1\text{H}$  e 2 D, foram dissolvidos 2 mg de cada amostra de pólen em 1 mL de metanol- $d_4$  (metanol deuterado), em um microtubo de 2 mL. Em seguida, as amostras foram agitadas em aparelho tipo vórtex (Biomixer, QL 901) até que estivessem aparentemente homogeneizadas. Após estes procedimentos, a amostra foi colocada em banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner Unique, 1400A) por 30 minutos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 12000 RPM. Uma alíquota de 0,6 mL da solução com a amostra foi transferida para um tubo de RMN de 5 mm, e adicionou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

Para obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizadas 32 acumulações (NS) com tempo de espera (d1) de 2 s antes de cada aquisição, largura espectral (SWH) de 5.241 Hz e tempo de aquisição (AQ) de 6 s. Foi utilizada a sequência de pulsos *zgcppr* (nomenclatura Bruker) e ondas contínuas (wc) para a supressão dos sinais dos hidrogênios da água e aplicou-se 64 K de pontos (TD) no domínio temporal para o processamento antes da transformada de Fourier.

Na realização dos experimentos de RMN bidimensionais, os parâmetros utilizados na aquisição e processamento dos espectros foram diferentes. Na técnica de correlação homonuclear gCOSY foram realizadas 16 acumulações (NS) com tempo de espera (d1) de 1 s antes de cada aquisição, janela espectral de 5.241 Hz e tempo para a aquisição (AQ) de 0,39 s. Foi usada a sequência de pulsos *cosygpprpf* (nomenclatura Bruker) e ondas contínuas (wc) para a supressão dos sinais dos hidrogênios da água, além de 4 K de pontos (TD) no domínio temporal (antes da transformada de Fourier).

Para a obtenção dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear, pela técnica de gHSQC, foram realizadas 128 acumulações (NS) com tempo de espera (d1) de 1 s antes de cada aquisição, janela espectral de 4.789 Hz (SWH) e tempo de aquisição de 0,42 s (AQ). A sequência de pulsos utilizada foi a *hsqcetgp* (nomenclatura Bruker) para a supressão dos sinais dos hidrogênios da água, com 4 K de pontos no domínio temporal (antes da transformada de Fourier).

A elucidação das estruturas das substâncias químicas presentes no pólen foi realizada com base em dados de estruturas previamente elucidadas, em trabalhos publicados anteriormente e bancos de dados disponíveis. Para isso, foi realizado um levantamento de dados sobre as substâncias já identificadas em pólen apícola, bem como dados sobre o deslocamento químico, multiplicidade e constantes de acoplamentos dessas substâncias, além do tipo de solvente utilizado nas análises.

Para a análise dos espectros de RMN foi utilizado o programa Topspin® (v. 3.0, Bruker, BioSpin, 2010).

#### 4.8 Análises Quimiométricas

Os dados de RMN foram analisados através dos métodos exploratórios PCA e HCA. As amostras foram preparadas de modo semelhante ao descrito anteriormente, e os espectros de RMN das 16 amostras foram obtidos, em triplicata, no mesmo espectrômetro de RMN descrito no item 4.7.

Os espectros de RMN foram previamente tratados (correção de fase e linha de base e calibração da escala de acordo com o deslocamento químico do TMS) sendo que o número de pontos utilizados para a transformada de Fourier foi de 64 K. Estes procedimentos foram realizados com o auxílio do programa Topspin® (versão 2.1, Bruker), em seguida, os arquivos foram convertidos para a extensão “.dx”, salvos no formato ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) e importados para o programa Origin® (versão 6.0, Microcal), onde formaram uma matriz de dados que foi calibrada utilizando-se como referência o sinal do TMS. Após a exclusão das linhas de comentários, das colunas e linhas em branco, obteve-se uma matriz quadrada.

Em seguida, esta matriz de dados foi inserida no programa de análise quimiométrica Pirouette® (versão 3.11, Infometrix) para que fossem feitas as transformações e o pré-processamento dos dados. Algumas regiões espectrais foram excluídas para que não interferissem nas análises exploratórias. Estas regiões referem-se à região espectral do resíduo do sinal da água, aos sinais referentes ao solvente metanol-d<sub>4</sub>, ao TMS, e a todas as regiões que não apresentavam sinais. A matriz de dados foi composta por 6.195 variáveis e 48 espectros (dispostos nas linhas).

Para realizar as análises exploratórias dos dados por PCA e HCA, o pré-processamento utilizado foi o autoescalamento, que é útil quando os constituintes minoritários são de interesse, pois permite que os sinais menos intensos, e quem têm conseqüentemente baixa intensidade, tenham a mesma importância que os mais intensos (LEÃO, 2010). Em seguida, os dados de RMN foram transformados aplicando-se os algoritmos de normalização e correção de linha de base, resultando na minimização dos efeitos da diferença de concentração das amostras e ruídos (SILVA, 2010). A distância métrica utilizada no HCA foi a Euclidiana e o método de conexão foi o incremental, o qual utiliza a média ponderada no cálculo da distância entre os grupos (LEÃO, 2010).

O gráfico de *scores* foi comparado com o gráfico de *loadings*, e as variáveis dos extremos superior, inferior e lateral esquerda e direita da nuvem de dados do gráfico de *loadings* foram identificadas no gráfico de linhas, com o auxílio do programa Pirouette®, que indicou as regiões correspondentes aos deslocamentos químicos dos sinais encontrados, no programa Topspin®, para que fossem identificadas substâncias, ou classes de substâncias, relacionadas com a discriminação das amostras.

#### **4.9 Análises estatísticas dos dados da composição química centesimal e características físico-químicas**

Os resultados das análises da composição química centesimal e características físico-químicas das amostras de pólen das diferentes espécies de abelha foram avaliados estatisticamente através da determinação da média de três repetições, desvios padrões e análise de variância (ANOVA) no programa estatístico livre Smith's Statistical Package (SSP) sendo que  $p < 0,05$  indicou diferença significativa.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A composição centesimal e características físico-químicas do pólen foram estatisticamente variáveis entre as espécies (Tabela 1).

Tabela 1 - Análises realizadas com o pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletado em março de 2010 no Meliponário GPA/INPA, Manaus – AM

Análises	<i>M. seminigra</i> (Média)	D.P.	<i>M. interrupta</i> (Média)	D.P.
Umidade da amostra fresca%	53,39 <sup>a</sup>	±0,50	37,12 <sup>b</sup>	±0,60
Umidade da amostra liofilizada%	12,55 <sup>a</sup>	±0,08	8,85 <sup>b</sup>	±0,11
Proteínas%	11,34 <sup>a</sup>	±0,56	6,86 <sup>b</sup>	±0,00
Lípídeos%	10,80 <sup>a</sup>	±0,92	6,47 <sup>b</sup>	±0,15
Cinzas%	4,03 <sup>a</sup>	±0,45	2,74 <sup>b</sup>	±0,02
Fibras%	9,30 <sup>a</sup>	±0,37	13,65 <sup>b</sup>	±1,57
Carboidratos%	51,94 <sup>a</sup>	±2,21	61,4 <sup>b</sup>	±1,56
Valor energético kcal %	311,34 <sup>a</sup>	±5,30	310,73 <sup>a</sup>	±5,75
Sólidos totais%	46,60 <sup>a</sup>	±0,50	62,87 <sup>b</sup>	±0,60
pH	3,70 <sup>a</sup>	±0,01	3,34 <sup>b</sup>	±0,02
Atividade de água	0,91 <sup>a</sup>	±0,01	0,85 <sup>b</sup>	±0,00

As diferentes letras no sentido horizontal diferem em nível de 95% (P = 0,05) de probabilidade pelo teste ANOVA

### 5.1 Composição centesimal das amostras de pólen

#### 5.1.1 Umidade

O percentual médio de umidade encontrado nas amostras de pólen fresco, coletadas de colônias de abelhas *M. seminigra* (PS) (53,39%±0,50) e na amostra de pólen de *M. interrupta* (PI) (37,12%±0,60) não está de acordo com o recomendado no Regulamento Técnico Brasileiro vigente (BRASIL, 2001), que estabelece um limite máximo de 30% para pólen apícola. Percebeu-se também visivelmente, que o PS continha mais água que o PI, chegando a formar uma pasta viscosa. No entanto, o conteúdo de umidade das amostras utilizadas para as análises dos nutrientes, em base seca, após a liofilização foi de 12,55% e 8,85% no pólen em PS e PI respectivamente.



Souza *et al.* (2004) encontraram média de umidade semelhante ao encontrado no pólen coletado por *M. interrupta* no presente trabalho (36,9%), com variação de 22,3 a 49,2%, em amostras de pólen de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*, também no estado do Amazonas, coletadas entre os meses de novembro e dezembro/2002. Vit e Santiago (2008), estudando a composição de pólen fresco coletado nos Andes Venezuelanos constaram umidade média variando de 13,24 a 17,93% em amostras com diferentes tonalidades. Já Bastos *et al.* (2003) analisando a composição e a qualidade do pólen apícola, comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais, verificaram o percentual de 19,3% de umidade através do método de Karl Fischer. Modro *et al.* (2007) estudando pólen apícola no estado de Minas Gerais encontraram valores de umidade variando entre 25,57 e 40,44%. Marchini *et al.* (2006) investigaram o pólen coletado por abelhas *A. mellifera*, na região de Piracicaba-SP, e constataram média de 33,2%, em janeiro/2000, período em que ocorreu mais chuvas na região do estudo. Estes autores afirmam que o pólen é um material extremamente higroscópico, podendo ser afetado pelas condições ambientais. É provável que por esse motivo, as amostras usadas no presente trabalho apresentaram alto conteúdo de umidade, já que foram coletadas num período onde a precipitação atmosférica é intensa.

Campos *et al.* (2008), discutem em seu trabalho sobre a composição do pólen e a padronização dos métodos analíticos para determinação das características físico-químicas deste produto. Estes autores afirmam que a determinação do conteúdo de água do pólen tem sido realizada através de secagem até peso constante em estufa (método utilizado neste e na maioria dos trabalhos referenciados) ou pelo método de Karl Fischer, utilizado no estudo de Modro *et al.* (2007) . No entanto, Campos *et al.* (2008) não chegam a recomendar qual destes métodos deve ser utilizado.

### 5.1.2 Proteína

O pólen normalmente apresenta alta concentração de proteínas (MODRO *et al.*, 2007). No entanto, neste trabalho, o pólen coletado de colônias da espécie de abelha *M. interrupta* apresentou um percentual de proteínas abaixo do exigido pelo Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001) aplicado a pólen apícola, que recomenda o mínimo de 8%.

Em um estudo sobre a composição e a qualidade da proteína do pólen apícola foi comprovado que o mesmo, apesar de geralmente apresentar um alto teor deste nutriente, apresenta baixa digestibilidade, quando comparado à proteína caseína, devido a sua resistente parede celular que é constituída por celulose (Bell *et al.*, 1983).

Um aspecto a ser considerado em relação às análises de proteínas de pólen pelo método de Micro Kjeldahl, é a falta de padronização dos fatores utilizados para conversão do conteúdo de nitrogênio em proteína, que não é definido pelo Regulamento atual (BRASIL, 2001). Autores como Souza *et al.* (2004), Modro *et al.* (2009), Vit e Santiago (2008) utilizaram o fator 6,25 e obtiveram respectivamente o percentual médio de 19,5%, 26,2% e 24,17 a 52,56% de proteínas em amostras de pólen coletado por abelhas. Por outro lado, autores como Bell *et al.* (1983) sugerem que o fator 6,25 pode superestimar o conteúdo de proteína, e recomendam a utilização do fator 5,6 para o cálculo do percentual proteico, devido estes autores terem constatado que cerca de 30% do nitrogênio determinado em pólen pode ser de origem não proteica, sendo grande parte proveniente de aminoácidos livres. No entanto, em estudos realizados por McCaughey *et al.* (1980) e Loper & Cohen (1987) foi destacado que a qualidade nutricional de polens ricos em proteínas é reduzida caso existam baixas quantidades de aminoácidos essenciais, necessários para o crescimento. Esses estudos

sugerem que o valor nutricional do pólen pode ser definido com mais precisão pela composição de aminoácidos do que através do teor de proteína.

Bastos *et al.* (2003) utilizando o fator 5,6 encontraram valores entre 16 e 27,5% de proteínas em amostras de pólen apícola comercializadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. No presente trabalho, quando utilizado o fator 6,25, obtiveram-se médias de 12,34 e 7,66% para PS e PI, respectivamente. Já quando utilizado o fator 5,6, obtiveram-se as médias apresentadas na tabela 1, que não são muito diferentes das médias encontradas quando utilizado o fator 6,25.

### 5.1.3 Lipídios

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

Os valores aqui encontrados diferiram significativamente entre o pólen coletado de colônias da espécie de abelha *M. seminigra* (10,8%) e *M. interrupta* (6,47%). Estes valores são relativamente altos, quando comparados com os resultados de Souza *et al.* (2004), que analisaram o conteúdo de lipídios do pólen coletado por estas mesmas abelhas, obtendo média de 4,0%, e de Marchini *et al.* (2006) que analisaram o pólen de abelhas do gênero *Apis* (3,6%), ambos os autores utilizaram o método Soxhlet. Já Bastos *et al.* (2003) utilizando método de Bligh-Dyer, mesmo método utilizado neste trabalho, encontraram teores de lipídios

variando de 6,1 a 14,0% em pólen apícola, valores estes mais próximos aos encontrados na presente pesquisa.

Segundo Kates (1972) o método de Soxhlet favorece as reações de peroxidação e de hidrólise, sendo o método de Bligh & Dyer um dos procedimentos de extração mais versáteis e efetivos, que supera as dificuldades encontradas no método de Soxhlet (BLIGH & DYER, 1959). Diversos estudos mostraram que a escolha do método de extração influencia significativamente no resultado final (KATES, 1972; SMEDES, 1999). Brum *et al.* (2009) afirmam que o bom rendimento de lipídios totais, obtido em análises pelo método de Bligh e Dyer pode ser explicado pela ampla faixa de polaridade apresentada pela mistura de solventes utilizada (clorofórmio, metanol e água), que são mais polares que os utilizados normalmente no método de Soxhlet, e que dessa forma há uma extração eficiente de lipídios polares e apolares.

Campos *et al.* (2008) citam que resultados de análises por cromatografia gasosa revelaram que os lipídios extraídos de pólen consistiam basicamente de ácidos graxos, como o linolênico, palmítico, linoleico e ácido oleico, sendo que ácidos graxos insaturados constituem cerca de 70% do total de lipídios do pólen (SERRA-BONVEHI & ESCOLA-JORDA, 1997; SZCSZENA & RYBAK-CHMIELEWSKA, 1998). Além disso, quando se observa alguns grãos de pólen em um microscópio, é possível observar gotas oleosas que recobrem a exina (SAWYER, 1988; BARTH, 1989).

Há também uma teoria que as abelhas coletam pólen com elevados níveis de ácidos graxos insaturados porque são os mais adequados para seu metabolismo (SERRA-BONVEHI & ESCOLA-JORDA, 1997).

#### 5.1.4 Cinzas

O Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001) preconiza o máximo de 4% de cinzas, para pólen apícola, portanto o pólen analisado neste trabalho atende a esta legislação, e possui um teor de cinzas significativamente diferente quando são comparadas as amostras coletadas por *M. seminigra* (4,03%) e *M. interrupta* (2,74%). Souza *et al.* (2004) encontraram a média de 2,1% em pólen de meliponínios no Amazonas. Carpes *et al.* (2009) encontraram um percentual médio de 2,9% em pólen de *A. mellifera* na região sul do Brasil. Já Modro *et al.* (2009), encontraram o percentual de 2,1% de cinzas, no pólen coletado também por *A. mellifera* em uma região de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais.

#### 5.1.5 Fibra bruta

O percentual de fibra bruta do pólen coletado tanto por *M. seminigra* (9,30%) quanto por *M. interrupta* (13,65%) foi relativamente alto e significativamente diferentes quando comparados. Estes valores estão de acordo com o atual Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001), que estabelece o mínimo de 2% para pólen apícola, mas não estabelece limite máximo.

Bell *et al.* (1983) encontraram médias de 6,9 a 15,6% de fibra bruta em pólen apícola, enquanto que Carpes *et al.* (2009) encontraram valores variando de 2,2 a 4,9%, com média de 3,4% em pólen de *A. mellifera* da região sul do Brasil.

É importante destacar que atualmente o conceito de fibra sofreu uma reformulação. A fibra de importância na nutrição humana passou a ser chamada de fibra alimentar, e engloba polissacarídeos e ligninas resistentes à ação enzimática de mamíferos. No entanto, a

Legislação para pólen apícola ainda determina utilizar a análise de fibra bruta que consiste basicamente na determinação de celulose com pequenas quantidades de lignina e hemicelulose, e que atualmente é mais utilizado para análise de rações animais. Este método pode ser justificado pelo fato da origem da fibra encontrada no pólen ser proveniente principalmente da celulose, que forma a parede celular (exina) dos grãos de pólen, e protege o mesmo contra estresses ambientais.

#### **5.1.6 Carboidratos metabolizáveis**

O teor de carboidratos metabolizáveis foi maior no pólen de *M. interrupta* (61,4%) do que de *M. seminigra* (51,94%), sendo o macronutriente encontrado em maior quantidade nas amostras. Souza *et al.* (2004) encontraram percentual médio de 37,5% de carboidratos em pólen de meliponíneos. O Regulamento Técnico Brasileiro (BRASIL, 2001) estabelece apenas o conteúdo de açúcares totais, que deve ser de no máximo 55%.

#### **5.1.7 Valor energético**

O cálculo simplificado do valor energético de um alimento depende do percentual de macronutrientes que este apresenta. Os carboidratos e as proteínas fornecem quatro calorias/grama, enquanto os lipídios fornecem nove calorias/grama. O valor calórico médio encontrado nas amostras de pólen coletado por *M. seminigra* (311,3 kcal) e *M. interrupta* (310,7 kcal) não foi significativamente diferente. Souza *et al.* (2004) encontraram valores diferentes em amostras de pólen coletado por abelhas sem ferrão do mesmo gênero das

abelhas aqui estudadas, também no estado do Amazonas, que apresentaram média de 264,4 kcal por 100 g de pólen.

Alimentos como o leite condensado, maionese e o mel de abelhas são equivalentes em termos calóricos ao pólen estudado. No entanto, o pólen além de calorias também contém outros nutrientes importantes para a manutenção da saúde que alimentos como o leite condensado e a maionese não contém. Além disso, as pessoas costumam consumir três colheres de chá de pólen por dia, sendo que cada colher apresenta em torno de 8 g de pólen, totalizando 24 g por dia, o que equivale a 74 calorias.

## **5.2 Características físico-químicas das amostras de pólen**

### **5.2.1 pH**

Os valores de pH do pólen, coletado das colônias das abelhas em estudo, foram inferiores (3,7 e 3,34 para PS e PI, respectivamente) ao estabelecido pelo Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola, que é baseado no pólen da espécie *A. mellifera* e estabelece que o pH do pólen deva variar de 4 a 6. Marchini *et al.* (2006) estudando pólen de *A. mellifera* obtiveram média de 5,1, com valor mínimo de 4,8 e máximo de 5,3, entre os meses de março/99 a março/00. Já Bastos *et al.* (2003) constataram valores de pH mais próximos ao encontrado no presente trabalho, variando entre 3,7 e 5,5. Os baixos valores de pH podem também ser um fator positivo, pois ajudam a conservar este alimento dificultando o desenvolvimento de certos microrganismos.

### 5.2.2 Sólidos totais

O percentual de sólidos totais encontrado no pólen de *M. seminigra* (46,60%) foi menor do que o encontrado no pólen de *M. interrupta* (62,87%), uma vez que a umidade de PS foi maior. Costa *et al.* (2000), Marchini *et al.* (2006) e Modro *et al.* (2007) encontraram 72,5%, 76,3% e 72% respectivamente, em pólen de *Apis mellifera*.

### 5.2.3 Atividade de água (Aw)

A maioria dos microrganismos que causam deterioração em alimentos, como leveduras e fungos, possui dificuldade de se desenvolver em produtos com Aw inferiores a 0,90 (CORREIA-OLIVEIRA *et al.*, 2008). A atividade de água determinada nas amostras de pólen analisadas neste trabalho apresentaram valores altos e foram significativamente diferentes devido também a diferença do conteúdo de umidade. Ainda assim, a atividade de água encontrada no pólen de *M. interrupta* (0,85) está abaixo de 0,90, o que pode representar maior dificuldade para o desenvolvimento de microrganismos do que no pólen de *M. seminigra*.

Portanto, é importante enfatizar a necessidade da desidratação do pólen com vistas à comercialização deste produto, uma vez que alimentos com baixa atividade de água são melhores conservados.

O maior valor de atividade de água encontrado por Bastos *et al.* (2003) foi 0,6 em pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais.



### 5.3 Análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na revelação da placa cromatográfica do EPE de *M. seminigra* com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (Figura 5 – A) a 1% em etanol observou-se a intensificação de manchas amarelas fluorescentes na luz UV- 365 nm, que são características de flavonoides. No entanto, estas manchas não foram observadas no EPE de *M. interrupta*.

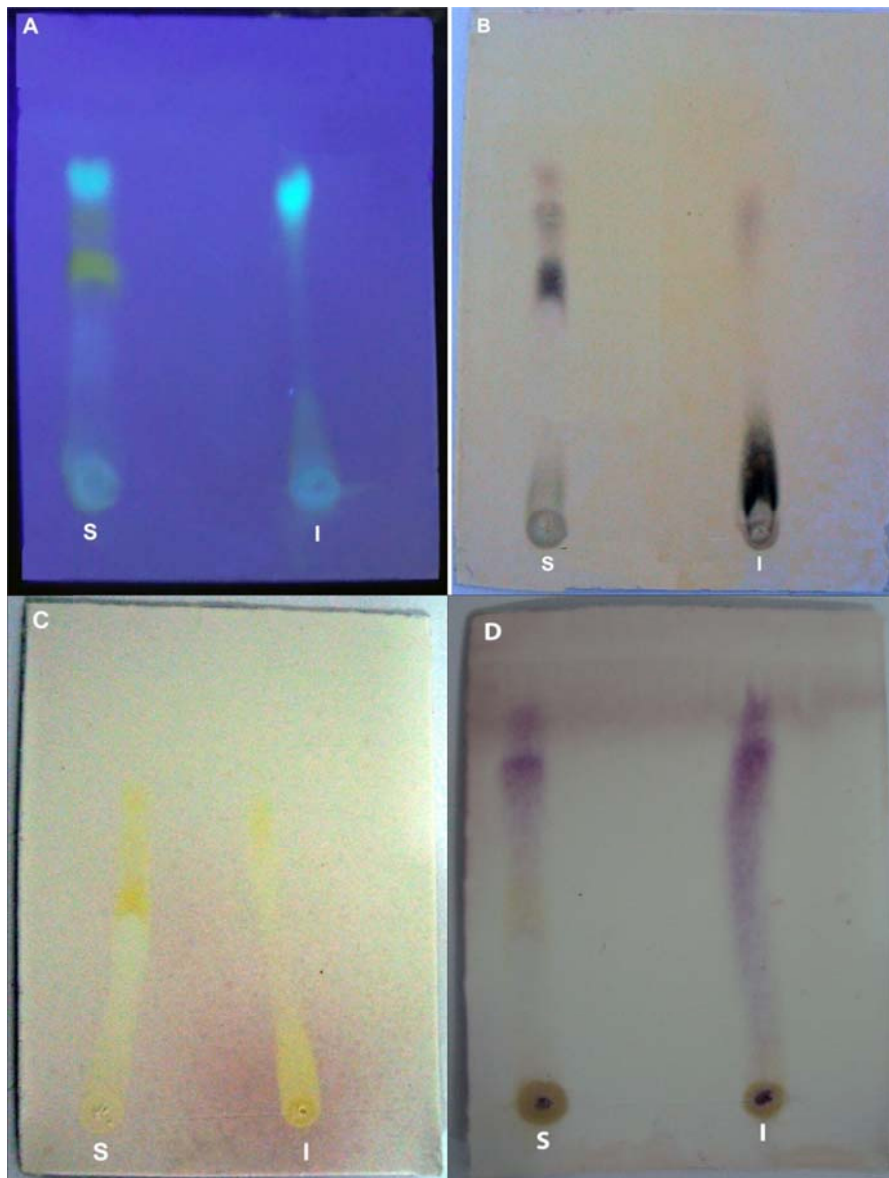


Figura 5 - Extratos etanólicos brutos do pólen (eluição em acetona/DCM 1:1) coletado pelas abelhas sem ferrão *Melipona seminigra* (S) e *M. interrupta* (I) por CCD. A – Cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ); B – Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ); C – DPPH•; D – Anisaldeído.

Pela revelação química com cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) percebe-se que o EPE de *M. seminigra* parece possuir mais metabólitos do grupo dos fenólicos, pois este apresentou manchas cromatográficas de coloração escura, características deste grupo (Figura 5 – B). Já o EPE de *M. interrupta* parece possuir uma baixa quantidade desse grupo de metabólitos, pois se constatou a ausência da separação de manchas cromatográficas características. Outra explicação plausível é a possibilidade dos metabólitos do EPE de *M. interrupta* terem ficado retidos na origem, por serem glicosilados. No estudo de Campos *et al.*, (2003), as amostras de pólen analisadas continham flavonoides glicosilados, como kaempferol, quercetina, herbacetin e derivados de isoramnetina.

O potencial antioxidante qualitativo foi detectado através da revelação das placas cromatográficas com o DPPH• (Figura 5 – C) nos dois EPEs analisados, pois foi observada a presença de manchas amareladas. Esta atividade pode ser proveniente da presença dos compostos fenólicos como os flavonoides, que foram detectados na CCD com os demais reveladores.

Também foi notada diferença entre os extratos do pólen de *M. seminigra* e *M. interrupta* nas placas que foram reveladas com o anisaldeído (Figura 5 – D), que é um revelador universal capaz de revelar vários tipos de substâncias.

Gomez-Caravaca *et al.*, (2006) analisaram dados de estudos que envolveram o perfil de fenólicos em produtos apícolas e constataram que estudos analisando este perfil em pólen apícola eram praticamente inexistentes. No entanto, atualmente o interesse pelo perfil de compostos fenólicos é crescente na comunidade científica, uma vez que, além de possuírem atividade biológica de interesse para saúde humana, estes achados podem facilitar a identificação da origem geográfica e específica do pólen, devido a estas substâncias poder ser

utilizadas como marcadores químicos. Campos *et al.*, (2003), apontam que os perfis de flavonoides/fenólicos, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, parecem ser espécie-específicos.

Compostos fenólicos também foram encontrados por Campos *et al.*, (2003), em amostras de pólen coletadas em Durango no México, como derivados de apigenina, luteolina, quercetina, genisteína, isorametina, calcona e derivados de ácido cinâmico. Já no estudo de Silva *et al.*, (2009), que analisaram o pólen da abelha sem ferrão *Melipona rufiventris*, foram isolados os compostos fenólicos: ácido p-hidroxicinâmico, dihidroquercetina, isoramnetina, 3-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-coumaroil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-isoramnetina, luteolina e quercetina. Estes autores sugerem que o comportamento de forrageamento exibido por esta abelha é bastante específico, mesmo em um ambiente rico em diversidade vegetal como o nordeste do Brasil, local estudado.

Também foram encontrados os fenólicos: narigerina, 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavonona, 2,6-dihidroxi-6-metilbenzaldeído, 2-formiloxi1-fenilatonona, carnegina e éster metílico de ácido linoleico no estudo de LeBlanc *et al.* (2009), que analisaram pólen apícola do deserto dos Estados Unidos, e enfatizam que a narigerina possui capacidade de inibir a replicação do vírus da hepatite C, *in vitro*, e o antioxidante 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavonona tem mostrado atividade contra células de câncer de mama humano.

No pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona subnitida* no nordeste brasileiro, o perfil de flavonoides encontrado compreendeu selagin, naringenina, tricetina, isorhametina e 8-methoxiherbacetin (SILVA *et al.*, 2006).

Análises de perfis químicos de pólen por HPLC, realizadas com amostras da Nova Zelândia e Portugal revelou que o perfil de fenólicos é específico da espécie vegetal utilizada pelas abelhas. Este perfil inclui flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos e podem ser utilizados com confiança para determinar a fonte floral quando comparado com as fontes de pólen de plantas conhecidas. Portanto, a origem floral pode ser facilmente determinada se uma biblioteca de perfis químicos de pólen for montada (CAMPOS *et al.*, 1997).

#### 5.4 Atividade antioxidante

Na tabela 2 são apresentados os resultados das médias das absorvâncias e das equivalências referentes à atividade antioxidante pelos métodos que utilizam DPPH• e Fe<sup>3+</sup> como agentes oxidantes.

Tabela 2 - Resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos etanólicos de pólen coletado pelas abelhas *Melipona seminigra* (PS) e *M. interrupta* (PI) em Manaus - AM

Extrato testado	DPPH•				Fe <sup>3+</sup>			
	[AA]eq	Média±DP	Equiv.	Média±DP	[AA]eq	Média±DP	Equiv.	Média±DP
PS1	1,96		2,6		1,98		2,5	
PS2	1,93	2,026±0,141	2,6	2,5±0,166	1,97	2,034±0,104	2,5	2,5±0,123
PS3	2,19		2,3		2,15		2,3	
PI1	0,76		6,6		1,03		4,9	
PI2	1,93	0,696±0,059	2,6	7,2±0,590	1,97	1,037±0,021	2,5	4,8±0,098
PI3	2,19		2,3		2,15		2,3	

Constatou-se que tanto no método que utiliza DPPH• quanto no método que utiliza Fe<sup>3+</sup>, o extrato etanólico da amostra de pólen coletado pela abelha *M. seminigra* apresentou

potencial antioxidante, enquanto que na amostra coletada pela abelha *M. interrupta* não foi observado este potencial.

A maior atividade do extrato de pólen coletado por *M. seminigra* pode ser justificada pela maior concentração de substâncias fenólicas nos extratos etanólicos, já que as análises em CCD reveladas com  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{FeCl}_3$  indicaram a presença desse grupo de substâncias (Figura 5 - A e B).

Vários estudos analisaram a atividade antioxidante proveniente de polens coletados por diversas espécies de abelhas em diferentes locais do planeta. Num estudo preliminar com amostras de pólen coletado por *M. seminigra*, em Manaus-AM (uma das espécies de abelhas estudadas neste trabalho), pelo método de DPPH•, Villareal, Nunomura e Carvalho-Zilse (2009) constataram que este demonstrou atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante de extratos de pólen monoflorais coletados por abelhas melíferas no estado de Durango, México, foram estudados por Almaraz-Abarca *et al.* (2006) que constataram, através de testes em camundongos *in vivo* e *in vitro*, que o extrato de pólen pode ser considerado como fonte de antioxidantes naturais devido ao seu alto teor de flavonoides.

Leja *et al.* (2007) analisaram o pólen coletado pela abelha *Apis mellifera* na Polônia e correlacionaram a atividade antioxidante com a presença de substâncias fenólicas como fenilpropanoides, flavonoides e antocianinas em amostras provenientes de várias origens botânicas. A atividade antioxidante frente aos radicais livres apresentou diferenças consideráveis entre as amostras estudadas, o que pode estar relacionado ao conteúdo de

substâncias fenólicas, que também diferiu bastante entre o pólen das diferentes origens botânicas.

Carpes *et al.* (2007, 2008, 2009); Kroyer e Hegedus (2001); Marghitas *et al.* (2009); Neves *et al.* (2009); Oliveira *et al.* (2009); Silva *et al.* (2006, 2009) também constataram consideráveis capacidades antioxidantes em pólen apícola coletados nos estados do Paraná e Alagoas, Região sul do Brasil; Áustria; Romênia; Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Alagoas; São Paulo, Paraíba e Ceará, respectivamente.

### **5.5 Elucidações estruturais das substâncias encontradas no pólen coletadas pelas abelhas sem ferrão utilizando Espectroscopia de RMN**

A análise visual dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do pólen coletado pelas abelhas sem ferrão *M. seminigra* (PS) e *M. interrupta* (PI) (Figura 6), permitiu constatar que a composição química dos dois tipos de pólen é muito semelhante, apresentando variações apenas na região de  $\delta$  2,1 a 2,2 e na região de  $\delta$  6,5 a 6,7. Além disso, foram observadas variações também na intensidade dos sinais, aonde o espectro de PI apresentou sinais menos intensos que o espectro de PS, corroborando com os resultados encontrados na análise quantitativa da composição química, pelos métodos tradicionais, aonde se percebe que PI apresenta menores quantidades dos nutrientes analisados do que PS, com exceção dos carboidratos. Grande parte dos sinais estava nas regiões características dos aminoácidos, açúcares e compostos fenólicos, entre as regiões de  $\delta$  0,70 a 9,22.

A atribuição dos deslocamentos químicos das substâncias identificadas foi possível a partir dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , gHSQC, e gCOSY (quando possível) e com o auxílio

da literatura. Muitos sinais não foram identificados devido à alta sobreposição dos mesmos, fato que impossibilitou analisar as correlações nos experimentos bidimensionais.

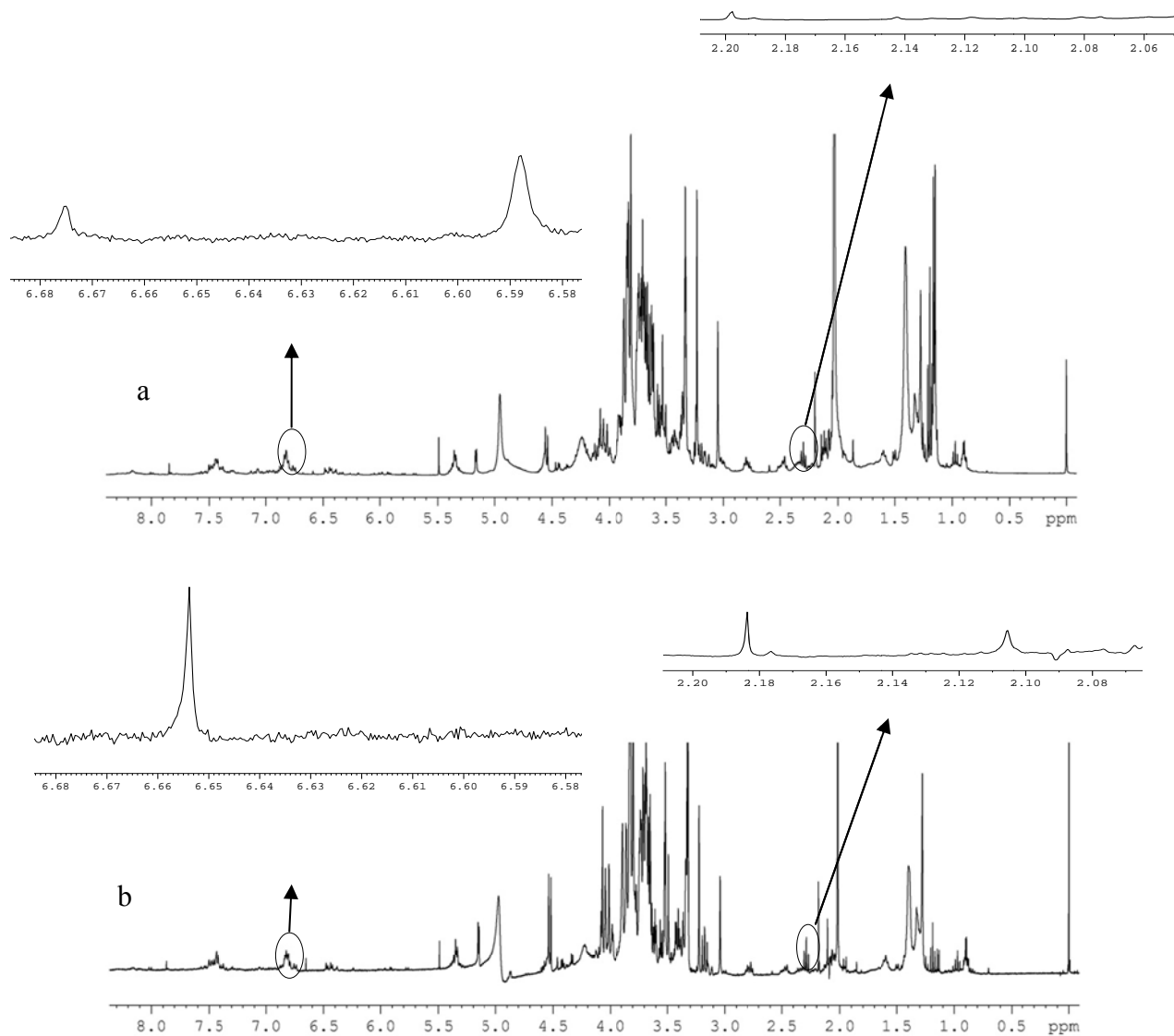


Figura 6 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de extratos metanólicos de amostras de pólen coletado pelas abelhas sem ferrão *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b) em Manaus-AM, destacando as pequenas variações entre as amostras.

Nas tabelas 3 e 4 são mostradas as atribuições dos deslocamentos químicos das substâncias encontradas no pólen coletado por *M. seminigra* e *M. interrupta*, respectivamente.

Tabela 3. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e correlações  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (COSY) e  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (HSQC) dos constituintes químicos do pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona seminigra*.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	$\delta$ C	COSY	HSQC
$\alpha$ -glicose				
1	5,16 (d, 3,64)	93,7	-	C1
$\beta$ -glicose				
1	4,54 (d, 7,72)	97,9	-	C1
Alanina				
3	1,5 (d, 7,07)	17,3	-	C3
Etanol				
1	3,68 - m	64,8	H2	C1
2	1,19 (t, 7,03)	18,3	H1	C2
Ácido acético				
2	2,03 (s)	21,2	#	C2

- não determinado; # não detectado.

Tabela 4. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e correlações  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (COSY) e  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (HSQC) constituintes químicos encontrados no pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona interrupta*.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	$\delta$ C	COSY	HSQC
$\alpha$ -glicose				
1	5,15 (d, 3,40)	93,9	-	C1
$\beta$ -glicose				
1	4,52 (d, 7,49)	98,2	-	C1
Alanina				
3	1,49 (d, 7,01)	17,4	-	C3
Etanol				
1	3,65 - m	64,75	H2	C1
2	1,18 (t, 7,07)	*	H1	C2
Ácido acético				
2	2,02 (s)	21,1	#	C2

\*Sobreposto pelos sinais de outras substâncias; - não determinado; # não detectado.

### 5.5.1 Elucidação dos carboidratos

Os sinais da região dos carboidratos apresentaram uma grande sobreposição na região de interesse (4,00 – 3,00 ppm) (Figura 7). Em consequência disto não foi possível visualizar todas as correlações e identificaram-se apenas a presença de sinais característicos dos hidrogênios anoméricos dos açúcares simples, como a  $\alpha$ -glicose que apresentou um duplete em  $\delta$  5,16 e da  $\beta$ -glicose que apresentou um duplete em  $\delta$  4,54 na amostra de pólen coletado por *M. seminigra*. O sinal do hidrogênio anomérico da  $\alpha$ -glicose identificada nesta amostra



apresentou  $J = 3,64$  Hz, enquanto que o da  $\beta$ -glicose apresentou  $J = 7,72$  Hz. Já na amostra de *M. interrupta*, foram encontrados dupletos com  $\delta$  5,15 e 4,52 e  $J = 3,40$  e 7,49 Hz para  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose, respectivamente (Figura 8).

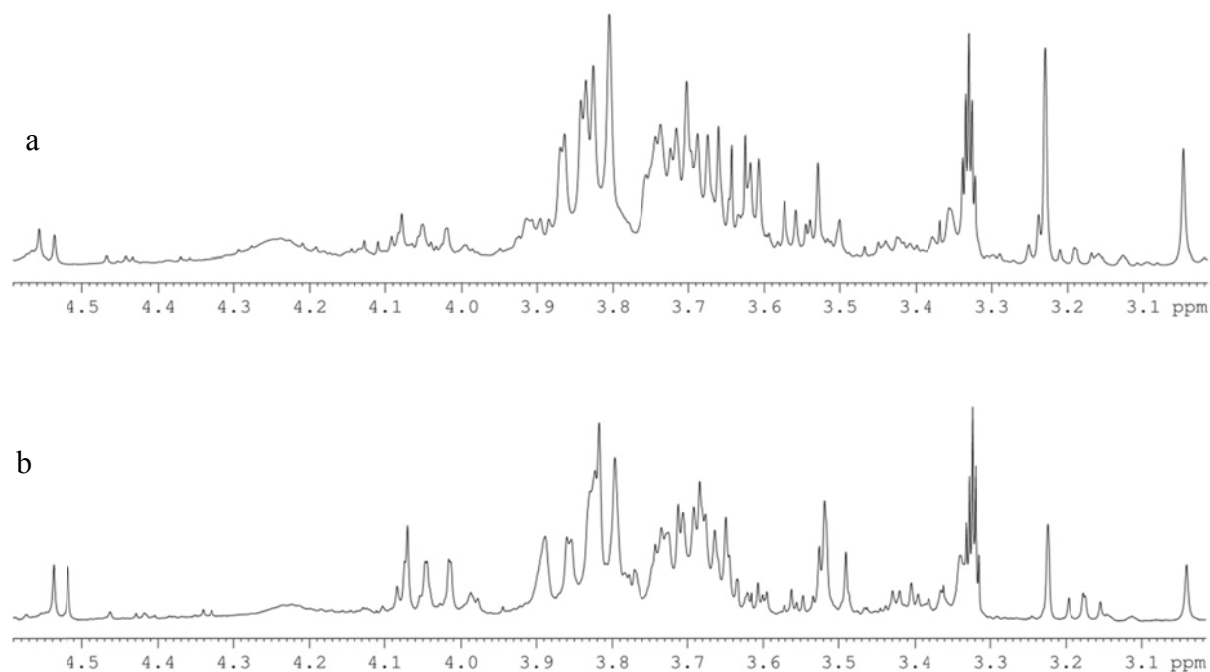


Figura 7 – Ampliação da região espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  dos carboidratos presentes nas amostras de pólen coletado por *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b), revelando a alta sobreposição dos sinais.

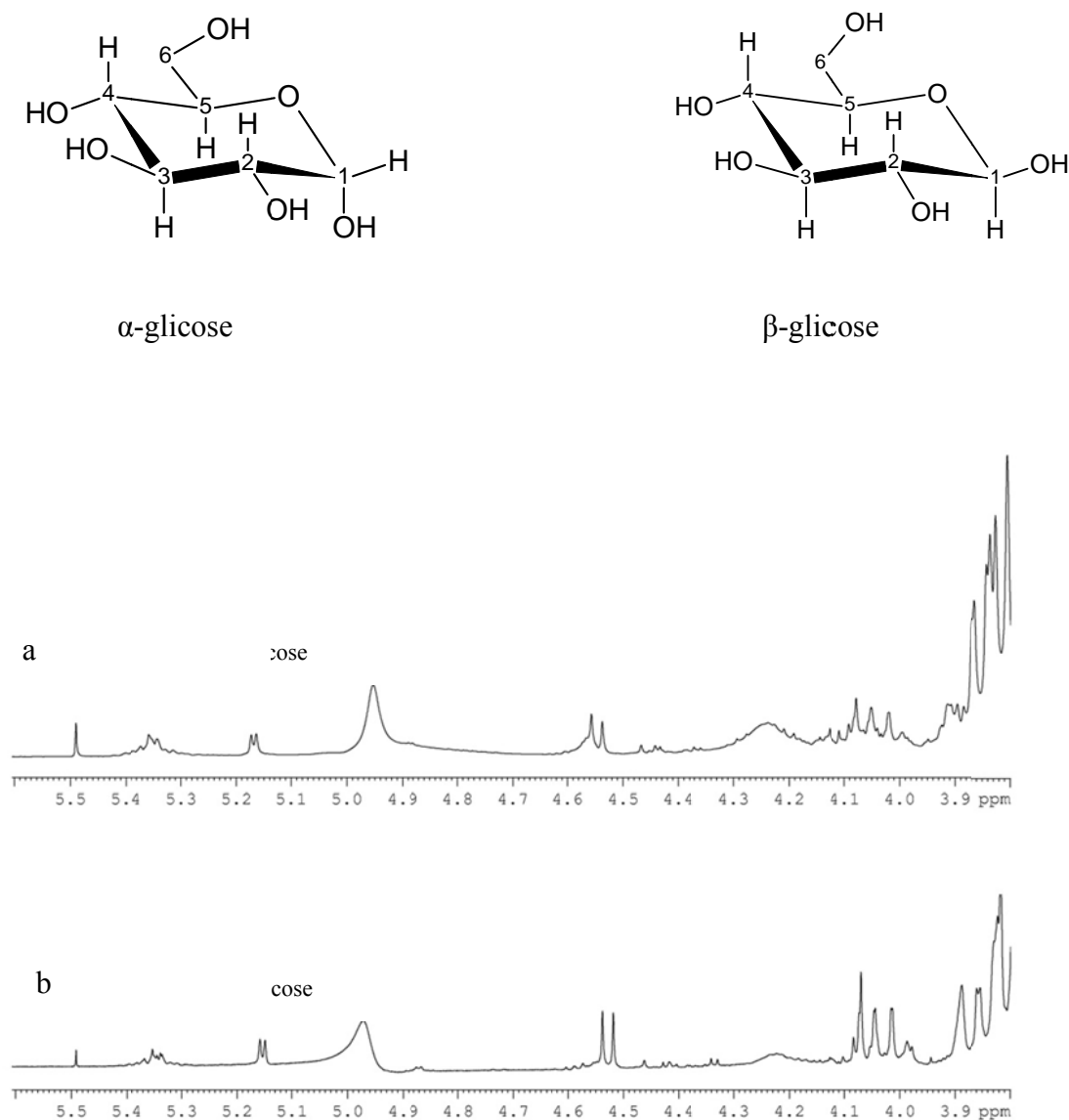


Figura 8 – Ampliação da região do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que apresenta sinais dos carbonos anoméricos da  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b).

Nos experimentos de gHSQC (Figura 9) puderam ser observadas as correlações para os hidrogênios e carbonos anoméricos da  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose. Os sinais em  $\delta$  5,16 e 4,54 estavam correlacionados respectivamente com os carbonos em  $\delta$  93,7 e 97,9 destes açúcares no PS. Já no PI, os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  5,15 e 4,52 estavam correlacionados com os carbonos em  $\delta$  93,9 e  $\delta$  98,2.

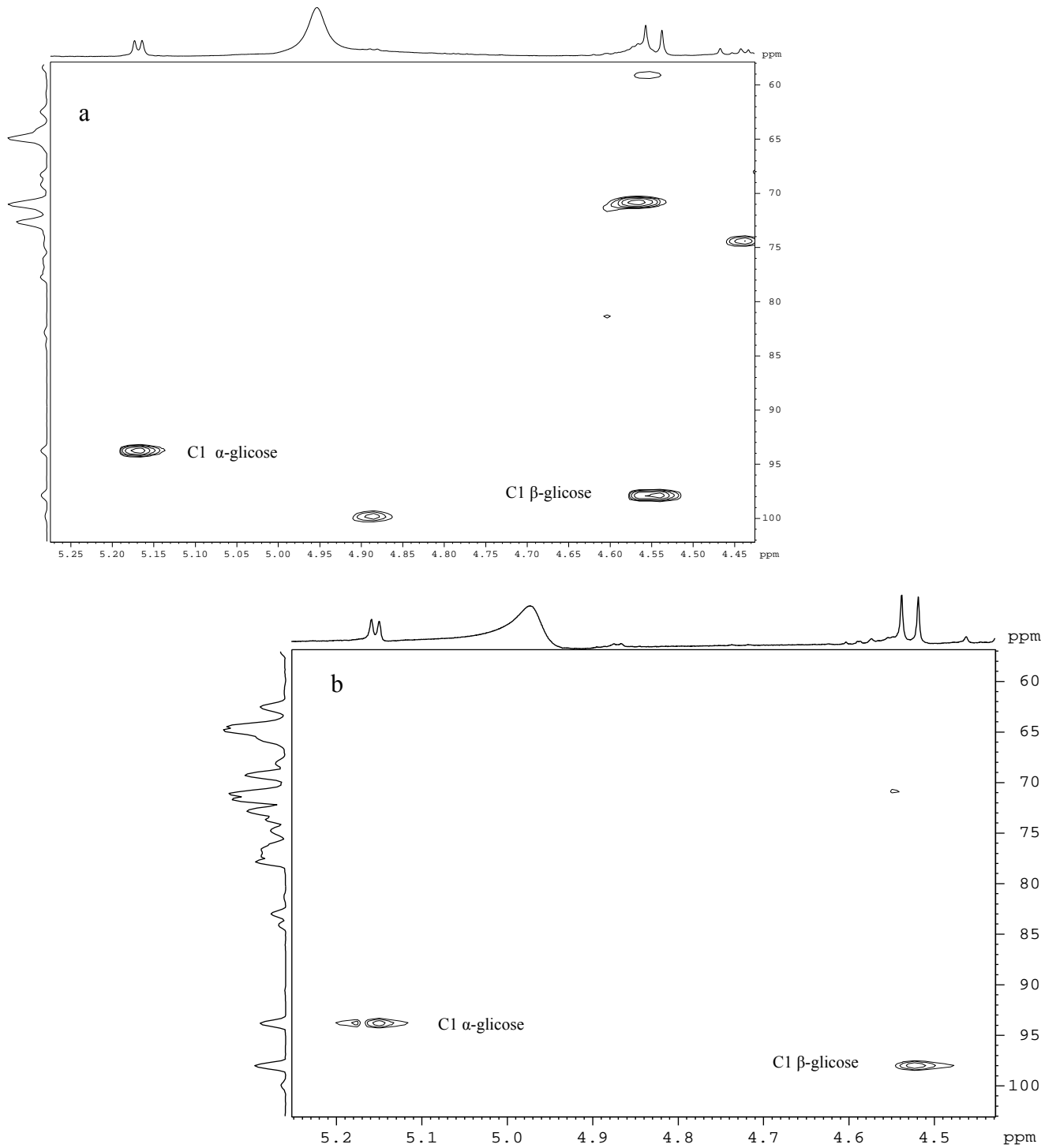
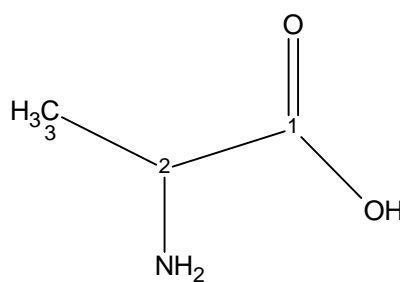


Figura 9 – Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  observadas no experimento de gHSQC referente aos sinais dos carbonos anoméricos da  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose do pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b).

### 5.5.2 Elucidação de aminoácido

Foram encontrados diversos sinais característicos de aminoácidos no pólen coletado pelas abelhas estudadas. No entanto, só foi possível identificar a alanina (Figura 10), que no pólen de *M. seminigra*, apresentou um duplete em  $\delta$  1,5 com  $J = 7,07$  Hz referente provavelmente aos hidrogênios da metila (C – 3,  $\delta$  17,3) deste aminoácido, que acoplam com os hidrogênios metínicos do C 3 em  $\delta$  3,8. Este mesmo aminoácido também foi encontrado no pólen de *M. interrupta*, que apresentou um duplete em  $\delta$  1,49 e  $J = 7,01$  Hz, acoplado com o carbono 3 em  $\delta$  17,4 (Figura 11).



Alanina

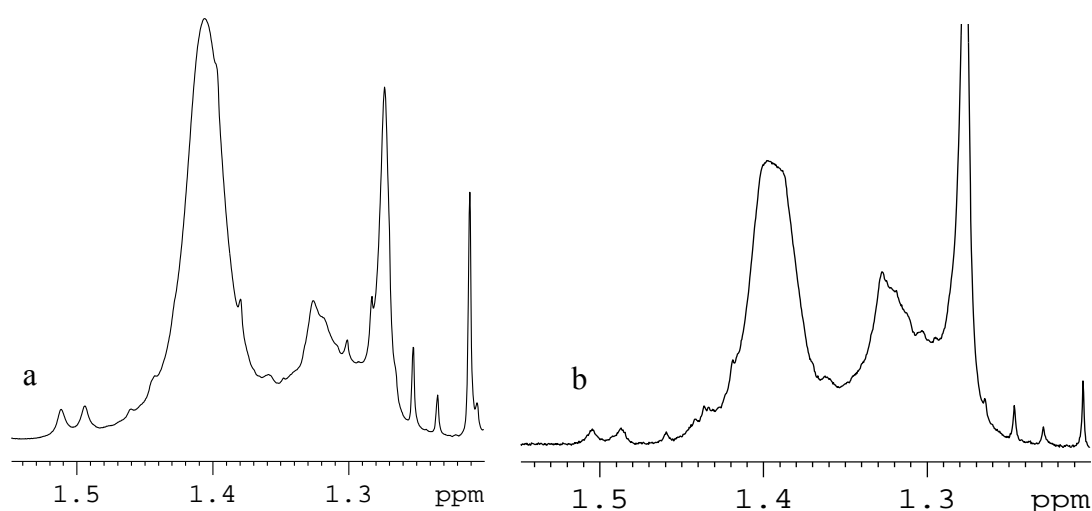


Figura 10 – Ampliação da região do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  destacando o duplete em  $\delta$  1,50 e 1,49 no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b), respectivamente.

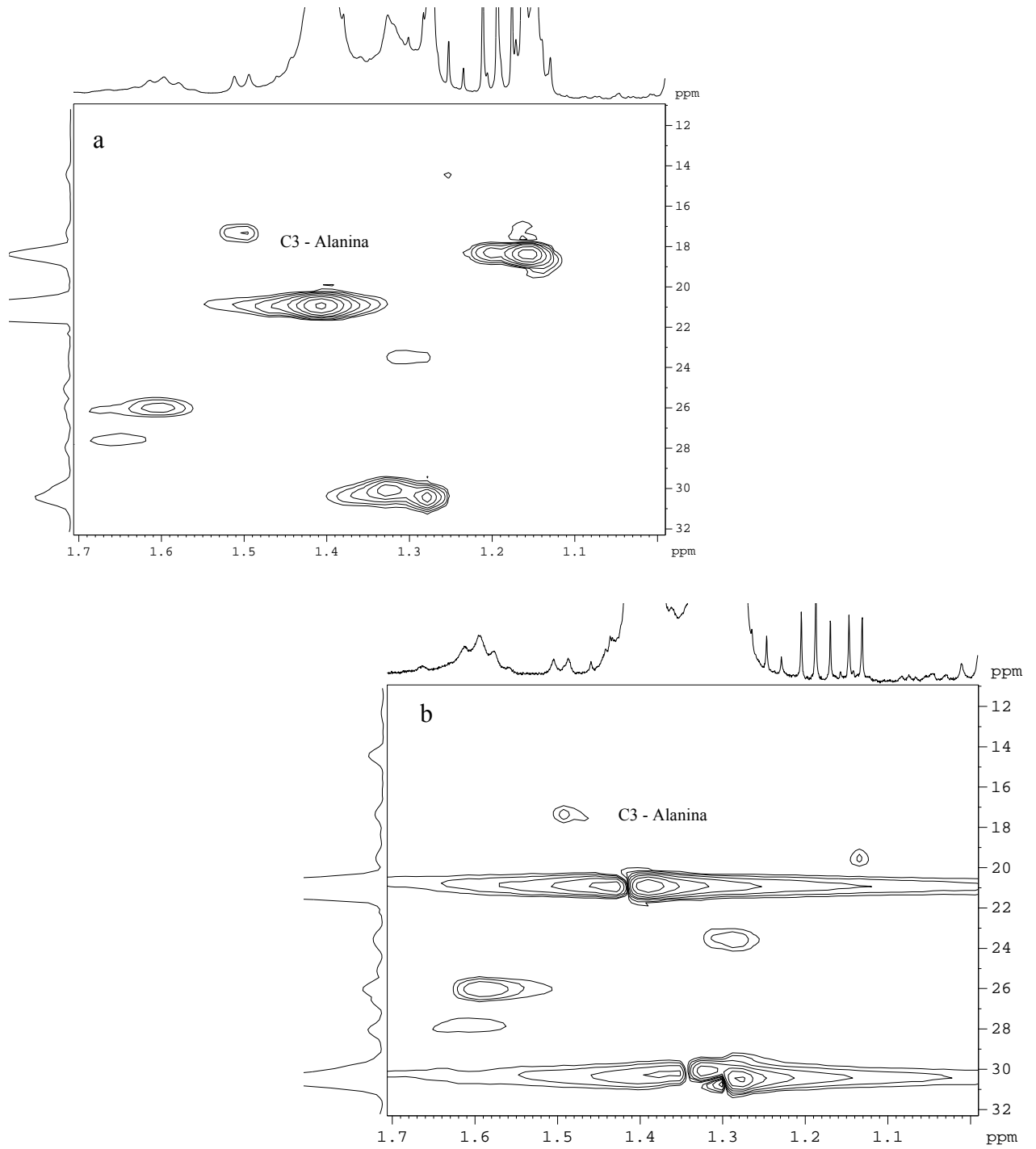


Figura 11 – Correlações  $^1\text{H}$  –  $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de gHSQC referente aos sinais do carbono 3 da alanina no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b).

### 5.5.3 Elucidação de outros compostos presentes no pólen coletado pelas abelhas sem ferrão amazônicas

As amostras de pólen apresentaram sinais de RMN de  $^1\text{H}$  característicos do ácido acético e do etanol, confirmados pelos experimentos bidimensionais.

O etanol foi identificado no pólen de *M. seminigra* através da presença de um tripleto (Figura 12) em  $\delta$  1,19 ( $J = 7,03$  Hz) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , e em  $\delta$  1,18 ( $J = 7,07$  Hz) no pólen de *M. interrupta*.

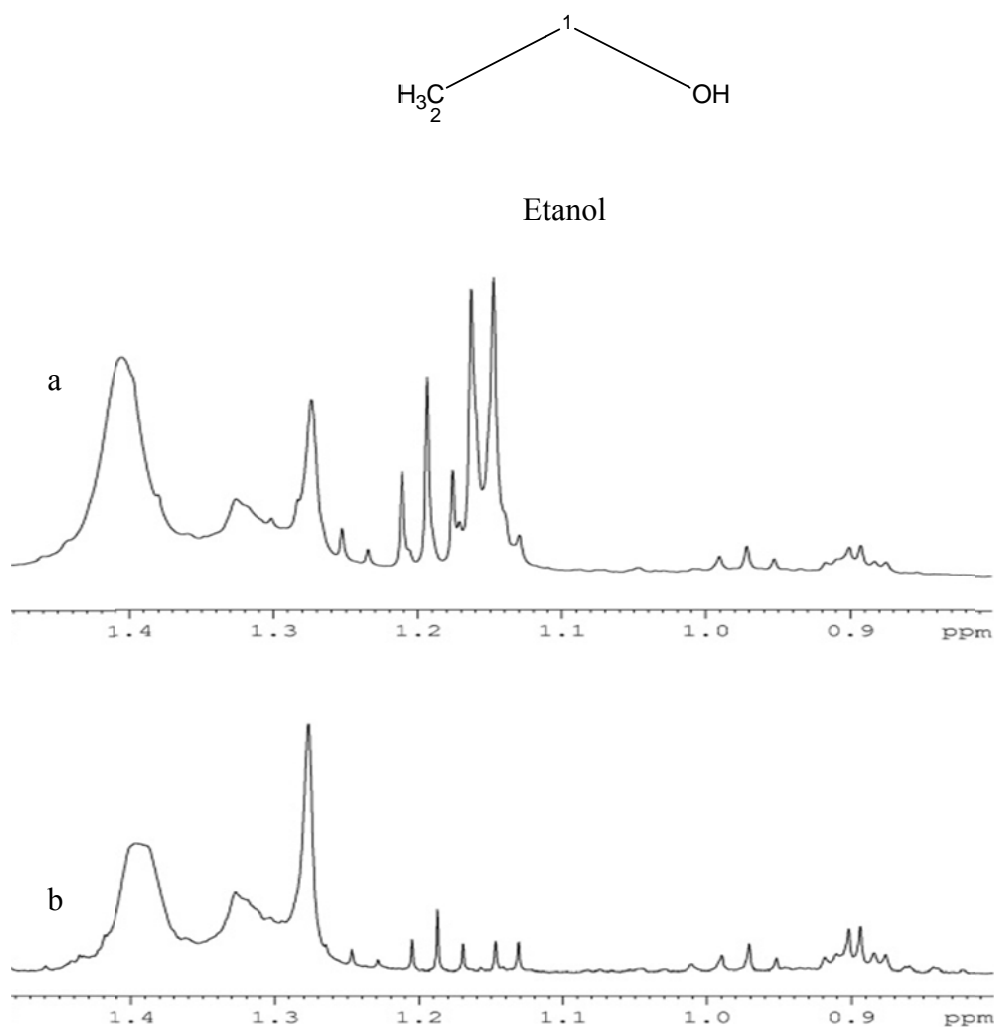


Figura 12 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com sinais do etanol em  $\delta$  1,19 e 1,18 no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b), respectivamente.

Na ampliação da região de  $\delta$  1,00 a 4,00 do experimento de gCOSY (Figura 13) verificou-se a correlação entre os hidrogênios H2 e H1 do etanol, tanto em PS quanto em PI.

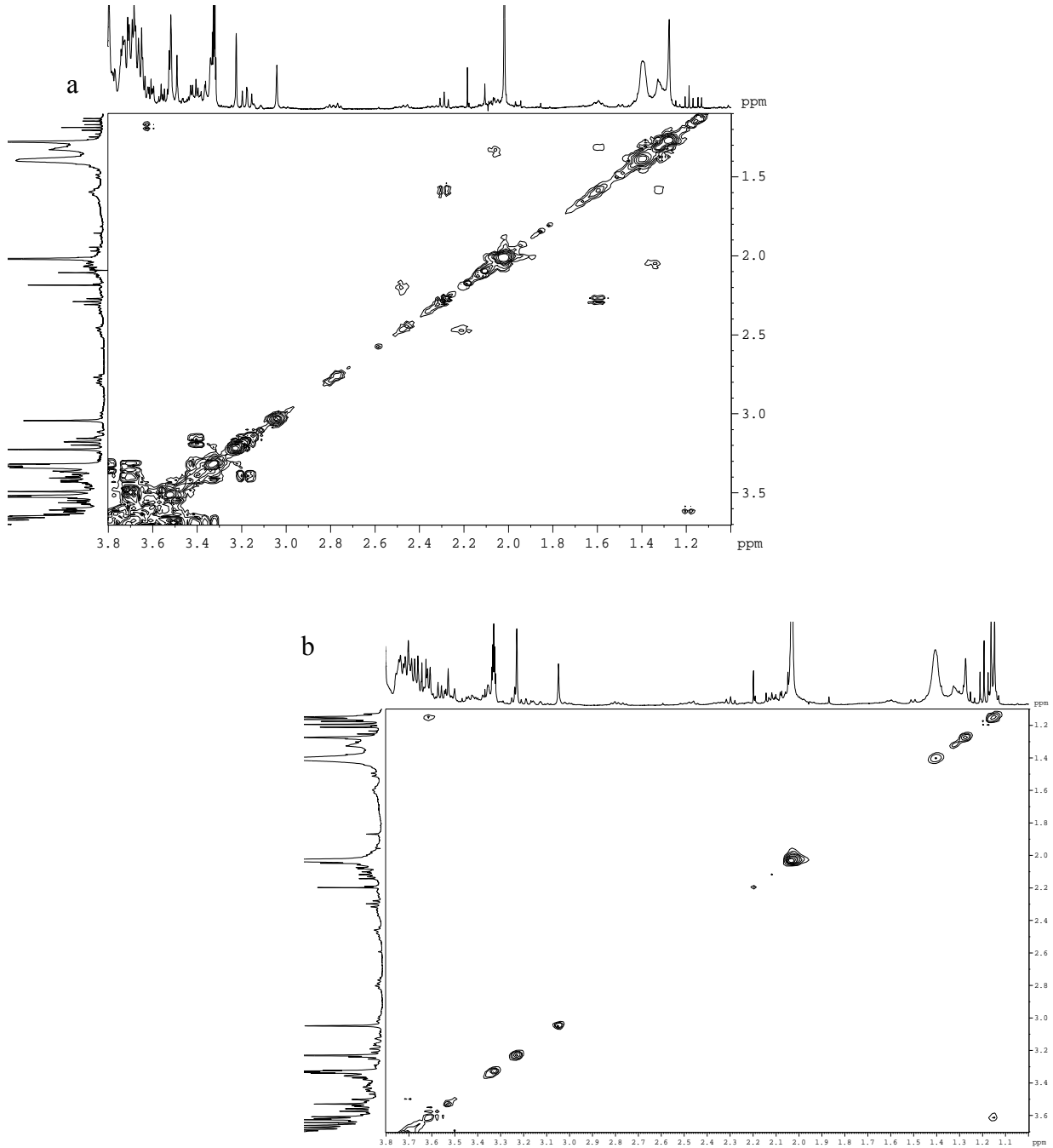


Figura 13 – Correlações <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H do etanol obtidas através do experimento de gCOSY no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b).

Na figura 14, é possível visualizar as correlações entre o hidrogênio e o carbono 2 do etanol, no experimento de HSQC, que em PS apresenta correlação em  $\delta$  18,3 enquanto que não foi possível observar correlação em PI.

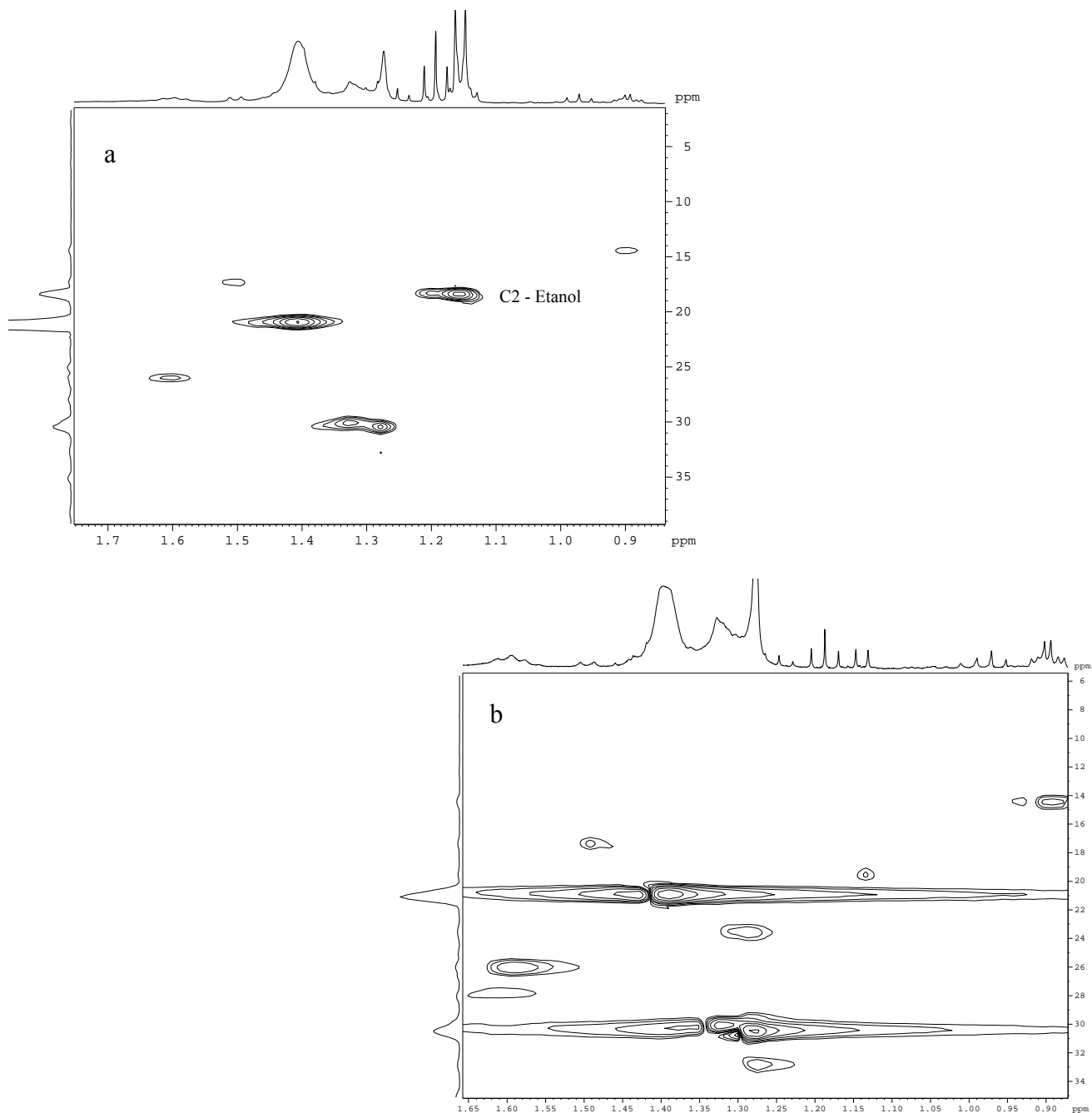
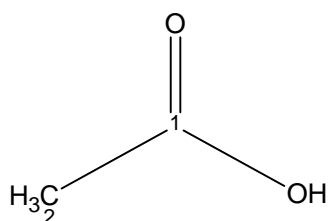


Figura 14 – Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , obtidas através do experimento de gHSQC do etanol encontrado no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b).



Já o ácido acético apresentou um simpleto em  $\delta$  2,03 no pólen de *M. seminigra* e  $\delta$  2,02 no pólen de *M. interrupta* (Figura 15).



Ácido acético

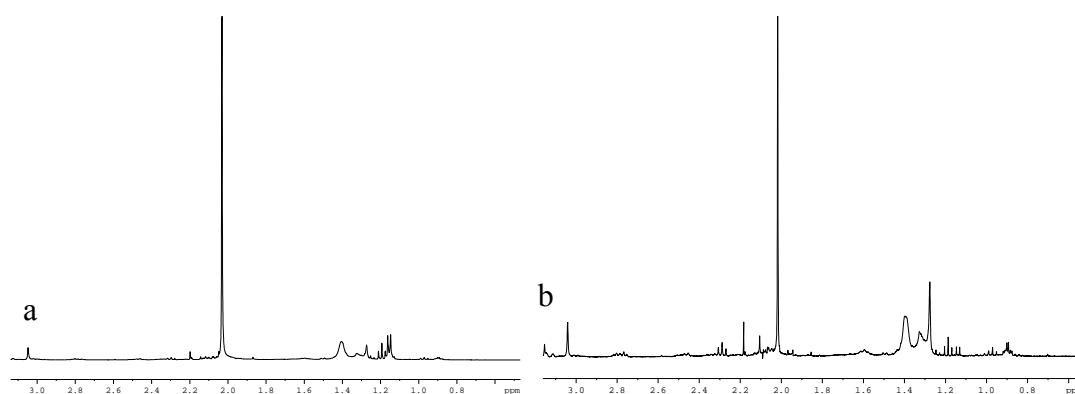


Figura 15 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  evidenciando os simpletos característicos do ácido acético em pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b).

No experimento de gHSQC (Figura 16), o hidrogênio 2 do ácido acético correlacionou-se com o carbono 2 em  $\delta$  21,2 e  $\delta$  21,1 no PS e PI, respectivamente.

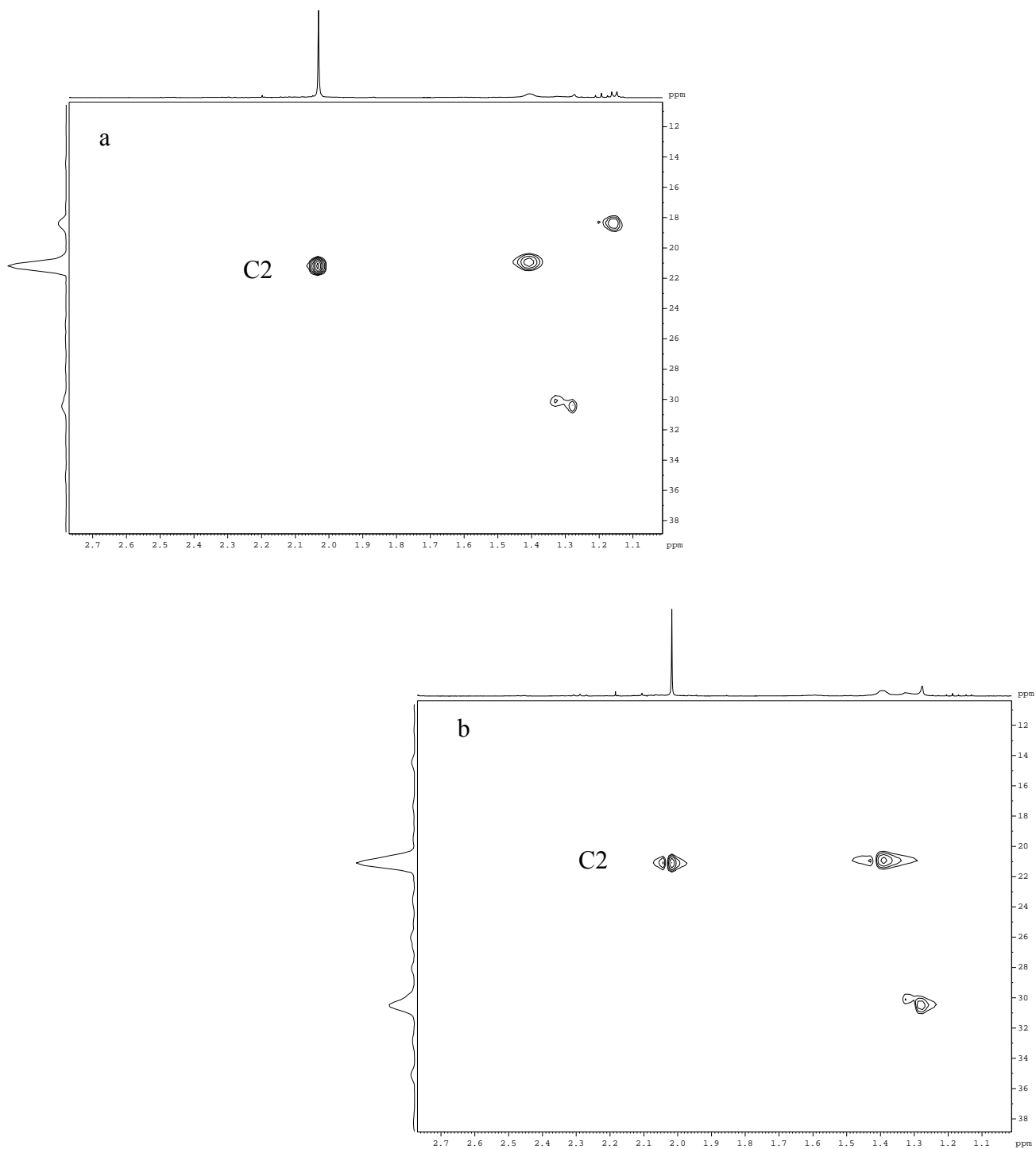


Figura 16 – Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , obtidas através do experimento de gHSQC do ácido acético encontrado no pólen de *Melipona seminigra* (a) e *Melipona interrupta* (b).

A identificação de etanol e ácido acético no pólen das abelhas sem ferrão permite sugerir que este pólen realmente passa por processos de fermentação, tanto alcoólica quanto acética. O ácido acético é produzido a partir de carboidratos fermentáveis, como a  $\alpha$ -glicose, detectada nas amostras de pólen aqui estudadas e, que pode ser produto da ação de enzimas formadas nas glândulas hipofaríngeas das abelhas, como a  $\alpha$ -amilase que tem a função de digerir a molécula de amido, que pode estar envolvida na digestão do pólen (PAMPLONA, 1989), e a enzima invertase que é responsável pela transformação da sacarose em glicose e frutose (MENEZES *et al.*, 2007).

Este processo pode acontecer em dois estágios: No primeiro estágio a glicose é convertida em etanol por ação de leveduras como as da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que já foi identificada em méis portugueses (CARVALHO *et al.*, 2005), assim como outros microrganismos fermentadores. No segundo estágio, bactérias dos gêneros *Acetobacter* ou *Gluconobacter* convertem o etanol em ácido acético (BELLINI, 2006), que foi a substância que apresentou o sinal de maior intensidade nos espectros, indicando que este é o ácido orgânico que prevalece no pólen coletado pelas abelhas estudadas. No entanto, não foram encontrados relatos na literatura que indiquem a presença de bactérias acéticas em pólen apícola.

Muitas pessoas, ao provarem pela primeira vez o pólen, relatam que o mesmo possui sabor ácido, o que foi confirmado com as análises do pH, que revelaram valores muito baixos, inclusive abaixo do Regulamento Técnico para comercialização de pólen (BRASIL, 2001). No entanto, esta substância pode contribuir para a preservação do pólen contra microrganismos deterioradores, uma vez que é considerada conservante de alimentos (FUKAYA, 1992).

## 5.6 Análises Quimiométricas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ do pólen coletado pelas abelhas sem ferrão amazônicas

Na figura 17 é apresentado o gráfico de linhas com a sobreposição de todos os espectros empregados nas análises quimiométricas, e indicação das regiões que foram excluídas da análise.

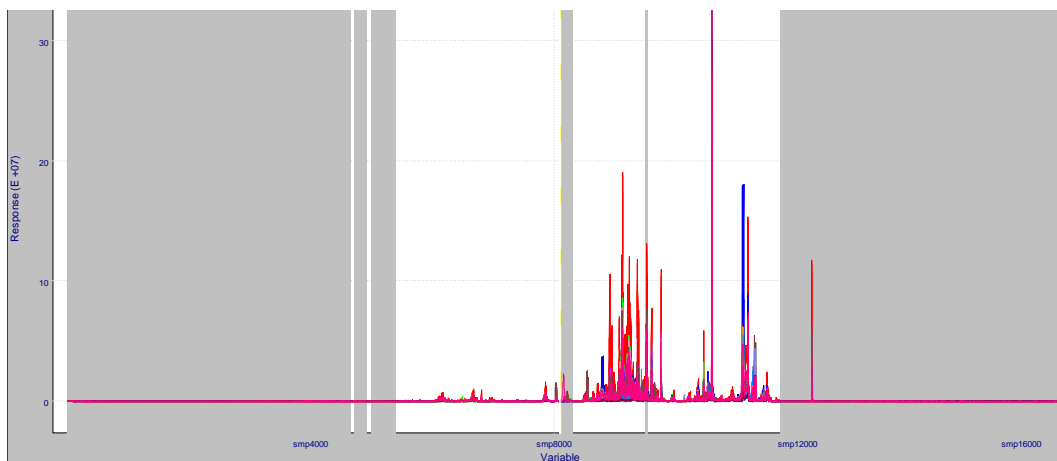


Figura 17 – Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pólen com indicação das regiões que foram excluídas.

Após a exclusão dos sinais que não interessavam na análise quimiométrica dos dados de RMN (descritos no item 4.6) obteve-se a figura 18.

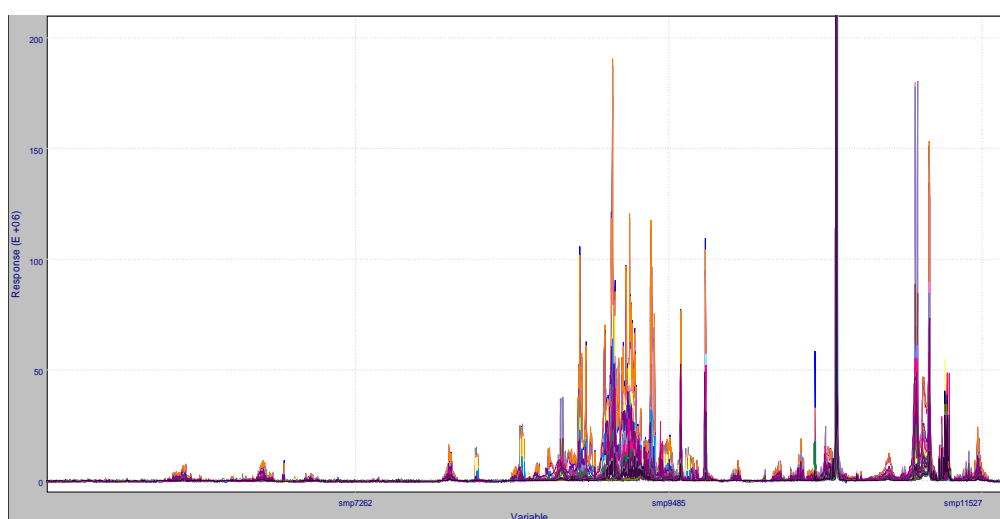


Figura 18 – Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pólen após as exclusões necessárias.

Na análise de PCA obteve-se 85,86% da informação dos dados originais, que foram descritos por oito componentes principais. O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 de todas as amostras está apresentado na figura 19. Em PC1 é descrito 48,46% da variância do conjunto de dados, já PC2 descreve 12,72%, enquanto que as duas descrevem juntas, 61,19%.

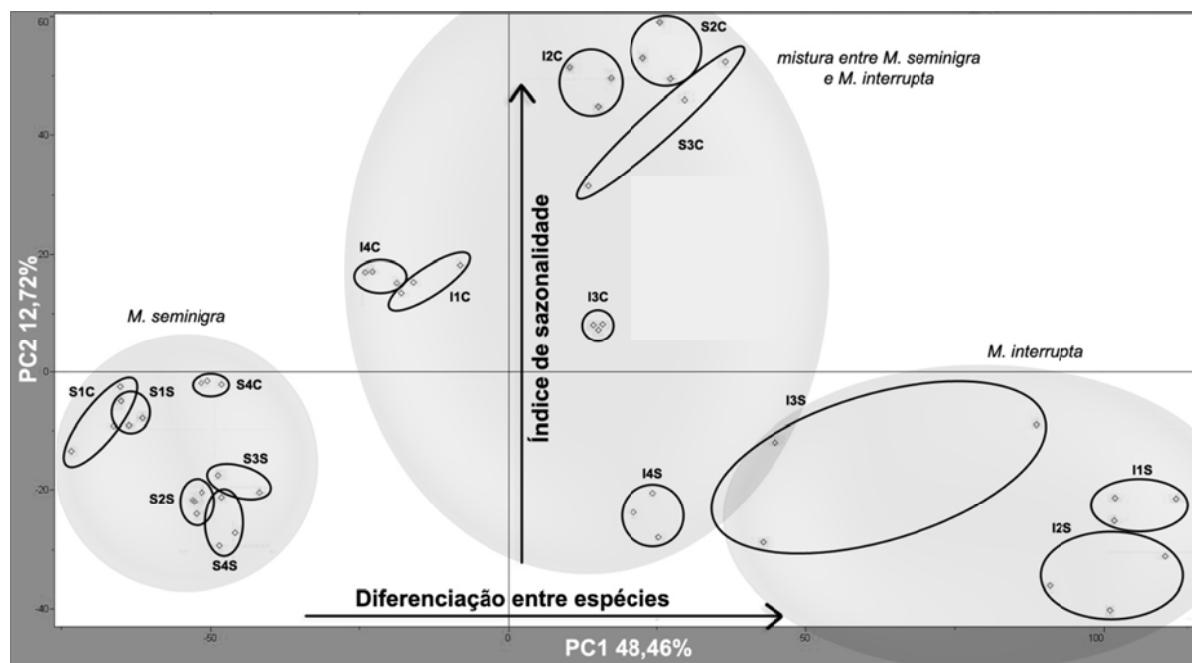


Figura 19 – Gráfico de *scores* de PCA dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pólen coletadas de colônias das abelhas sem ferrão *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta*, em duas diferentes estações climáticas na cidade de Manaus – AM.

Através da análise do gráfico de *scores*, percebe-se que são formados três diferentes grupos. O grupo da direita envolve somente amostras de *M. interrupta* coletadas no período seco (I1S, I2S, I3S); na região central do gráfico é formado outro conjunto de amostras com a mistura do pólen coletado por *M. seminigra* e *M. interrupta*, em ambas as estações climáticas estudadas (S3C, S2C, I2C, I3C, I4S, I4C, I1C); à esquerda é formado outro grupo, com amostras de pólen coletadas por *M. seminigra* no período seco e uma parte no período

chuvoso (S1S, S2S, S3S, S4S, S1C, S4C). Além disso, pôde-se observar ainda que em PC1 é possível diferenciar o pólen coletado pelas duas espécies de abelhas estudadas. Já em PC2 é possível discriminar o pólen coletado nas diferentes condições climáticas.

Através da análise do gráfico de *loadings* gerado na PCA se conheceram as variáveis responsáveis por tal agrupamento, porém não foi possível relacioná-las a todos os compostos presentes, uma vez que, diversas variáveis não pertenciam aos compostos anteriormente identificados, portanto optou-se por discutir as classes referentes aos sinais dos hidrogênios encontrados nos espectros, que segundo LE GALL *et al.* (2001) costumam apresentar regiões características das seguintes classes de substâncias: a região de hidrogênios aromáticos (6,0 a 9,0 ppm), a região de hidrogênios carbinólicos (3,0 a 6,0 ppm) e a região de hidrogênios carbinólicos, alílicos e de resíduos alquílicos, dentre outros (1,0 a 3,0 ppm).

### **5.6.1 Estudo interespecífico do forrageio de abelhas sem ferrão com base na composição química das amostras do pólen coletado pelas diferentes espécies de abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta* (PC1)**

No gráfico de *scores* (Figura 19) é possível observar a diferenciação espacial entre as amostras de pólen coletado pela abelha *M. seminigra* (PS) e pela abelha *M. interrupta* (PI), onde grande parte do PS encontra-se em valores negativos, enquanto que a maioria do PI encontra-se em valores positivos de PC1. No entanto, as amostras coletadas por *M. interrupta* no período chuvoso (IC) I4C e I1C encontram-se em valores negativos de PC1 e as amostras coletadas por *M. seminigra* também no período chuvoso (SC) S2C e S3C, encontram-se em valores positivos, contrariando a disposição das demais amostras no gráfico de *scores*.

Ainda assim, em PC1 verifica-se uma tendência de discriminação entre as espécies, baseada na separação espacial entre os grupos da esquerda (valores negativos) e direita (valores positivos) do gráfico de *scores*, que está intimamente relacionada à composição química das amostras, já que foram identificadas regiões com sinais diferentes nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pólen coletadas pelas diferentes espécies nas mesmas estações climáticas.

Na avaliação do gráfico de variáveis (*loadings*) destaca-se a região de 1,5 a 5,5 ppm como responsável pela localização das amostras em *scores* positivos e negativos de PC1.

As amostras do pólen coletado pela espécie *M. seminigra* no período seco (SS) possuem características químicas semelhantes entre si, mas diferentes das amostras coletadas das colônias da espécie *M. interrupta* no período seco (IS), o que indica que as diferentes espécies de abelhas coletam pólen de diferentes fontes florais diante do mesmo pasto apícola. As principais diferenças notadas entre PS e PI neste período, em PC1, é a presença de sinais característicos de substâncias pertencentes à classe dos carboidratos (Figura 20).

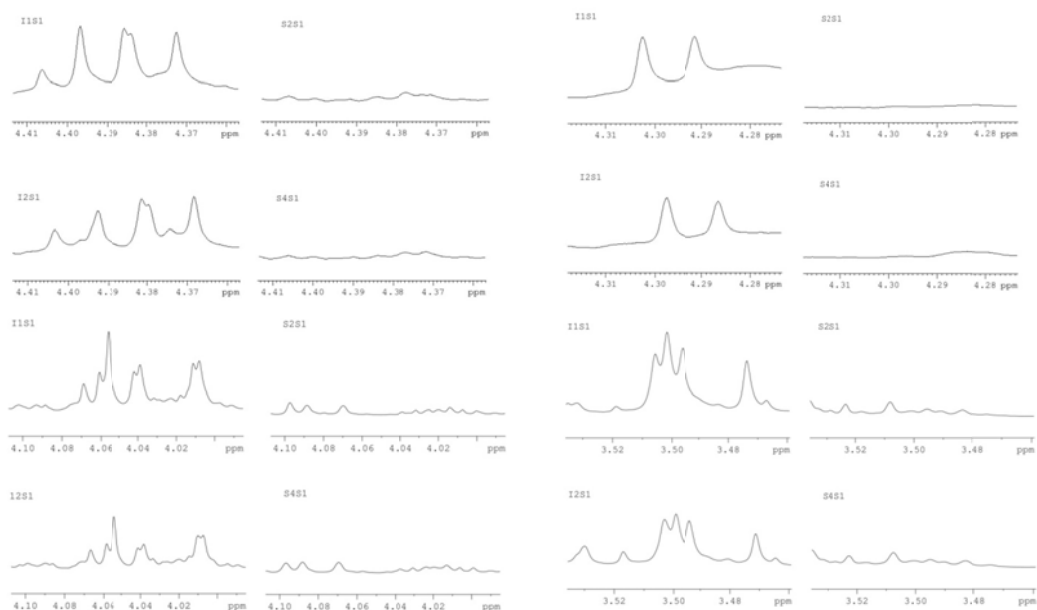


Figura 20 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* de Manaus – AM.

A região de  $\delta$  5,10 a 5,15 (Figura 21) apresenta variação na intensidade dos sinais dos hidrogênios da  $\alpha$ -glicose, que são notados claramente no pólen coletado por *M. interrupta*, mas apresentam intensidade muito baixa no pólen coletado por *M. seminigra*.

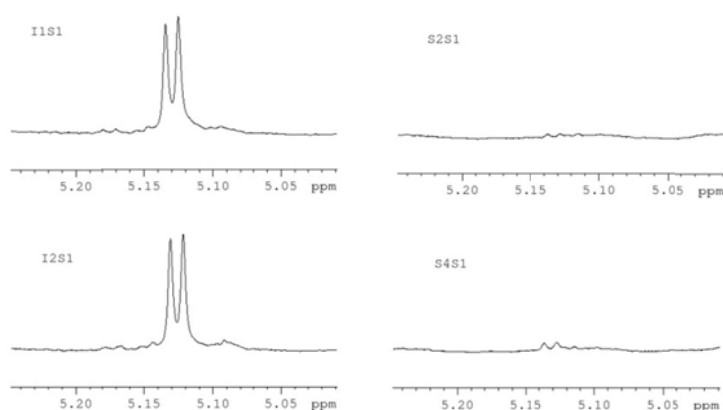


Figura 21 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos hidrogênios anoméricos da  $\alpha$ -glicose em amostras de pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletadas em Manaus – AM.



O duplete em  $\delta$  4,50 é característico da  $\beta$ -glicose e está presente no espectro do pólen coletado por *M. interrupta*, mas não no espectro do pólen coletado por *M. seminigra* (Figura 22).

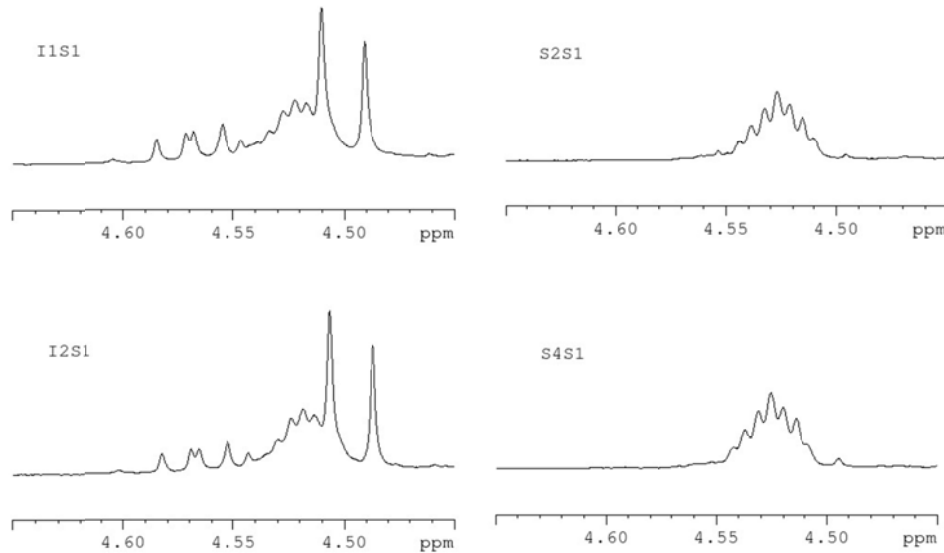


Figura 22 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos hidrogênios anoméricos da  $\beta$ -glicose em amostras de pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletadas em Manaus – AM.

O mesmo também é válido quando estudado o comportamento interespecífico das abelhas sem ferrão na outra estação climática (período chuvoso) através da composição química das amostras de pólen, que confirmou novamente que estas abelhas coletam pólen diferentes quando as mesmas fontes florais estão disponíveis. As amostras de PS (S4C e S1C) em valores negativos de PC1 se distinguem das amostras de PI (I3C e I2C), que estão em valores positivos de PC1, devido à diferença na presença e intensidade de sinais em  $\delta$  3,6 a 3,8 (Figura 23). Esta região pode apresentar sinais de metoxilas e de hidrogênios  $\alpha$  carboxílicos de aminoácidos e de carboidratos.

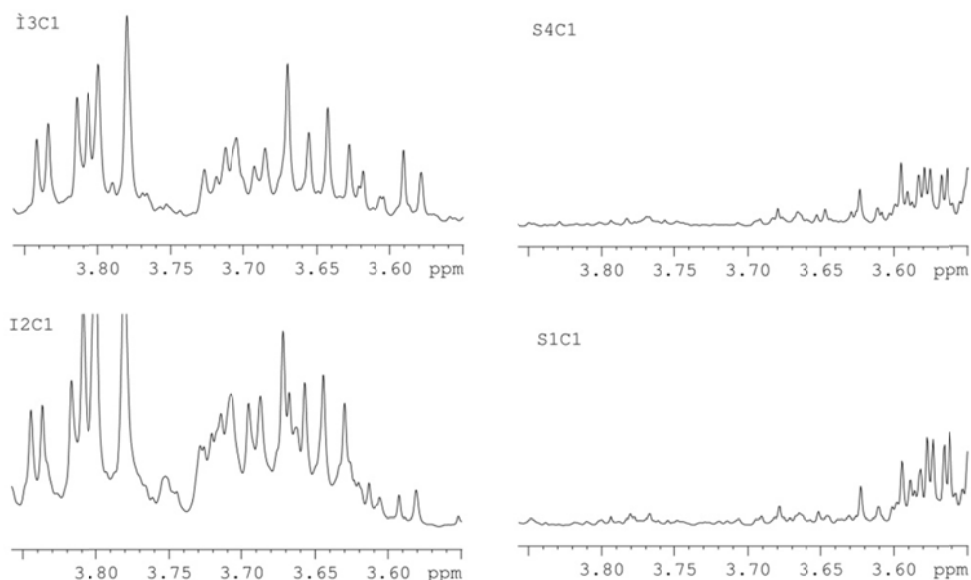


Figura 23 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região de aminoácidos e de carboidratos em amostras de pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletadas em Manaus – AM.

Quando analisamos somente as diferenças na composição química das amostras coletadas pelas diferentes espécies de abelhas, percebe-se que a região entre  $\delta$  1,12 e 1,16 teve maior impacto na disposição das amostras no gráfico de *scores* (Figura 19). Esta região apresenta sinais diferentes, e pode ser atribuída aos ácidos orgânicos e alcoóis (BERREGI *et al.*, 2003), bem como a resíduos alquílicos de aminoácidos livres. Pode-se verificar ainda, que estas variações são independentes da estação climática do ano, ou seja, IS e IC são parecidas entre si, assim como SS e SC, mas diferentes quando comparamos IS e SS e IC e SC. Portanto, esta região pode ser considerada importante na discriminação das amostras de pólen coletado pelas diferentes espécies de abelhas sem ferrão estudadas.

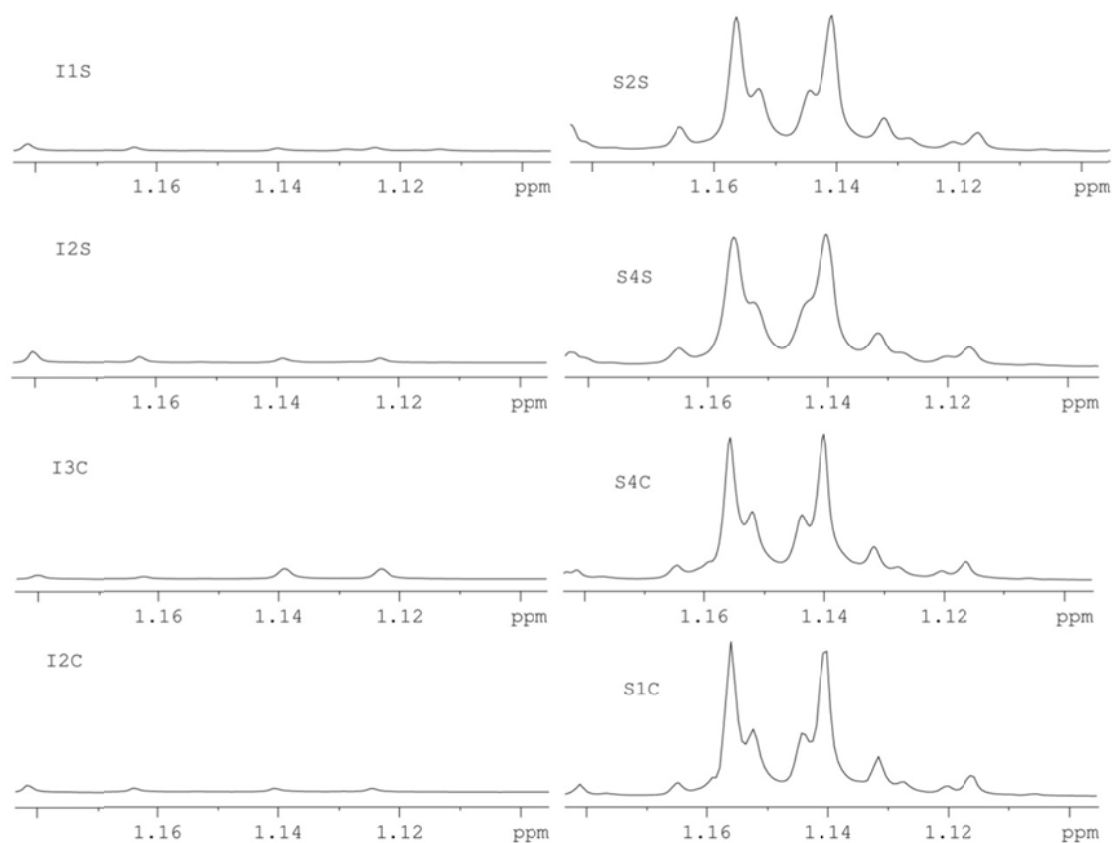


Figura 24 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região dos ácidos orgânicos, alcoóis e aminoácidos, responsáveis por diferenciar as amostras de pólen coletado por *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* de Manaus – AM.

### 5.6.2 Estudo da influência da sazonalidade sobre o comportamento de coleta de pólen intraespecífico das abelhas *M. seminigra* e *M. interrupta* (PC2)

O estudo da influência da sazonalidade sobre o comportamento de coleta de pólen entre as mesmas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas foi realizado para verificar possíveis variações nas composições químicas das amostras em estações climáticas (provavelmente floradas) diferentes.

Observou-se no gráfico de *scores* (Figura 19) que as amostras do grupo localizado na região de *scores* negativos de PC2 são referentes àquelas coletadas no período seco, e

diferenciam-se das amostras em *scores* positivos, que foram coletadas no período chuvoso. Portanto, em PC2 há uma tendência para o estabelecimento de um índice de sazonalidade.

Analisando-se as variáveis no gráfico de *loadings*, puderam-se identificar as regiões espectroscópicas de maior peso na discriminação das amostras coletadas no período seco e chuvoso, bem como seus perfis espectroscópicos. Constatou-se que ambas as abelhas estudadas coletaram pólen com composições químicas diferentes, uma vez que os espectros de RMN das amostras apresentaram diversas regiões diferentes. Isto permite sugerir que as abelhas coletaram pólen de fontes vegetais diferentes nos diferentes períodos do ano, já que as árvores que florescem em um período são diferentes das que florescem no outro período do ano.

Segundo Lião *et al.* (2010), aminoácidos alifáticos podem ser encontrados nas regiões que variam de  $\delta$  2,2 a 2,5 e  $\delta$  3,0 a 3,2, hidrogênios carbinólicos que são característicos de carboidratos podem ser encontrados nas regiões de  $\delta$  3,5 a 4,0, hidrogênios nas faixas  $\delta$  5,7 a 6,5 e  $\delta$  8,0 a 9,3 são relativos aos compostos aromáticos como os flavonoides, e hidrogênios de aminoácidos aromáticos podem ser encontrados na região entre  $\delta$  7,0 e 7,5. Todas essas regiões apresentaram sinais responsáveis por diferenciar o pólen coletado no período seco do pólen coletado no período chuvoso.

Quanto à composição química do pólen das mesmas espécies de abelhas (intraespecífica) nas diferentes estações do ano, percebeu-se que *M. interrupta* coletou pólen de fontes vegetais diferentes nas duas estações climáticas, ou seja, as fontes vegetais utilizadas no período seco provavelmente não foram as mesmas utilizadas no período chuvoso. Isto pode ser notado claramente no gráfico de PC2 (Figura 19).

No gráfico de *loadings* observou-se que os sinais responsáveis pela diferenciação das amostras coletadas por *M. interrupta* no período seco e chuvoso são referentes a compostos aromáticos como os flavonoides, que possuem atividade antioxidante. Verificou-se variações nas regiões de  $\delta$  6,63 e 7,84 a 7,88 (Figura 25), onde alguns sinais desaparecem nas amostras coletadas no período chuvoso.

LeBlanc *et al.* (2009), analisando a atividade antioxidante de amostras de pólen apícola do deserto de Sonoran - EUA expostas a altos níveis de radiação ultravioleta devido aos raios solares, constataram uma boa correlação entre o conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante. Estes autores afirmam que o pólen coletado no verão apresenta maior atividade antioxidante do que o pólen coletado em outras estações, pois os raios UV são mais intensos no verão, e, portanto as plantas utilizariam estes antioxidantes para proteger o DNA do pólen, e conseqüentemente, de animais que se alimentam deste pólen, como as abelhas e os seres humanos. Isto pode justificar também o resultado da análise da atividade antioxidante do presente trabalho, aonde o extrato de PI não apresentou atividade, uma vez que o pólen utilizado nesta análise foi coletado em um período em que a precipitação é mais intensa no local de coleta.

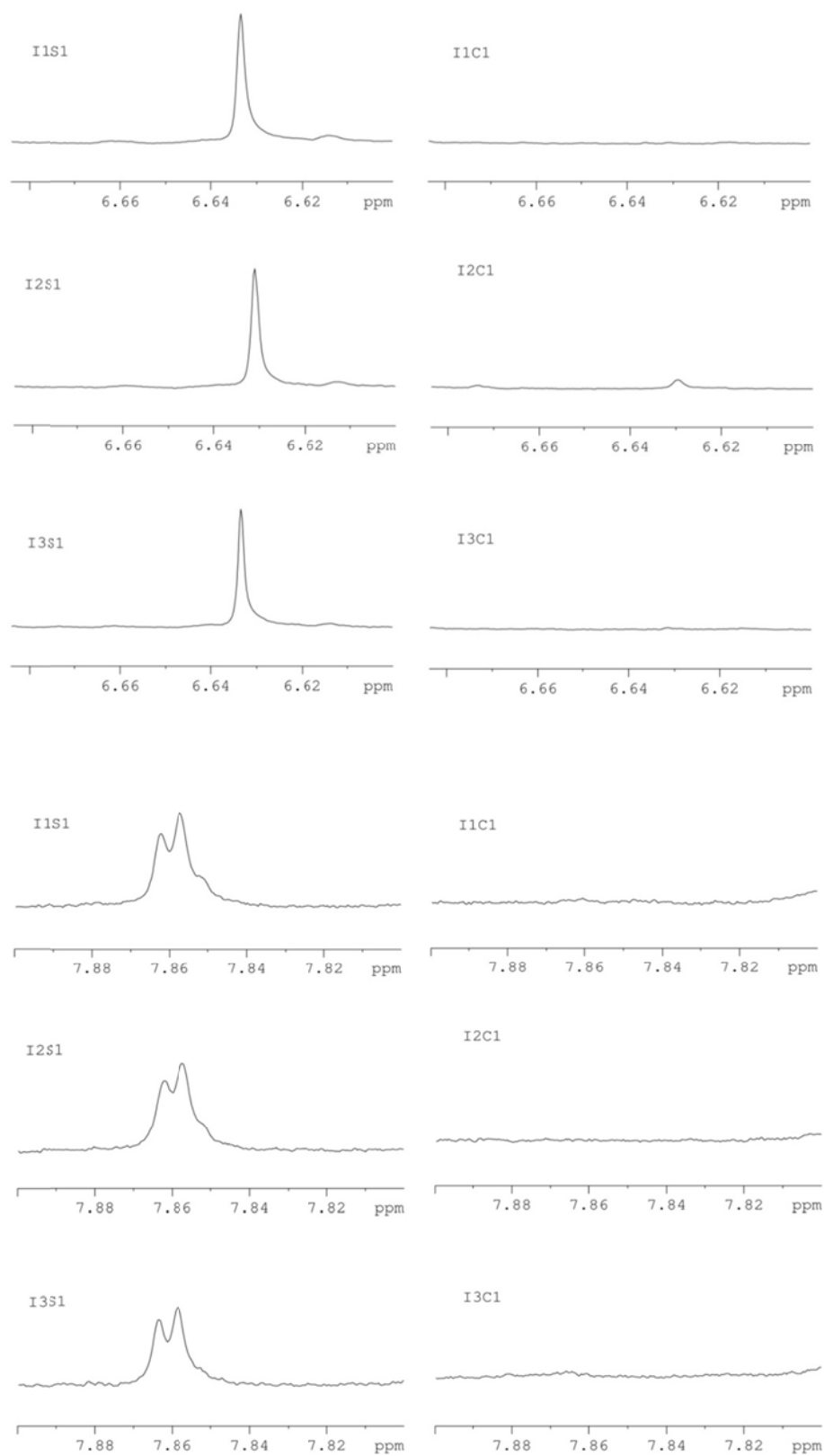


Figura 25 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região dos compostos aromáticos em amostras de pólen *Melipona interrupta* coletadas em Manaus – AM.

As abelhas das colônias nº 2 e 3 de *M. seminigra* também parecem coletar pólen de fontes vegetais diferentes durante as estações climáticas do ano, devido à composição química das amostras serem diferentes nessas estações (S2C e S2S; S3C e S3S). Como anteriormente, estas diferenças podem ser observadas na região de compostos flavonoidicos (Figura 26), onde se verifica uma redução na intensidade dos sinais nas amostras coletadas no período em que ocorre mais chuvas na região.

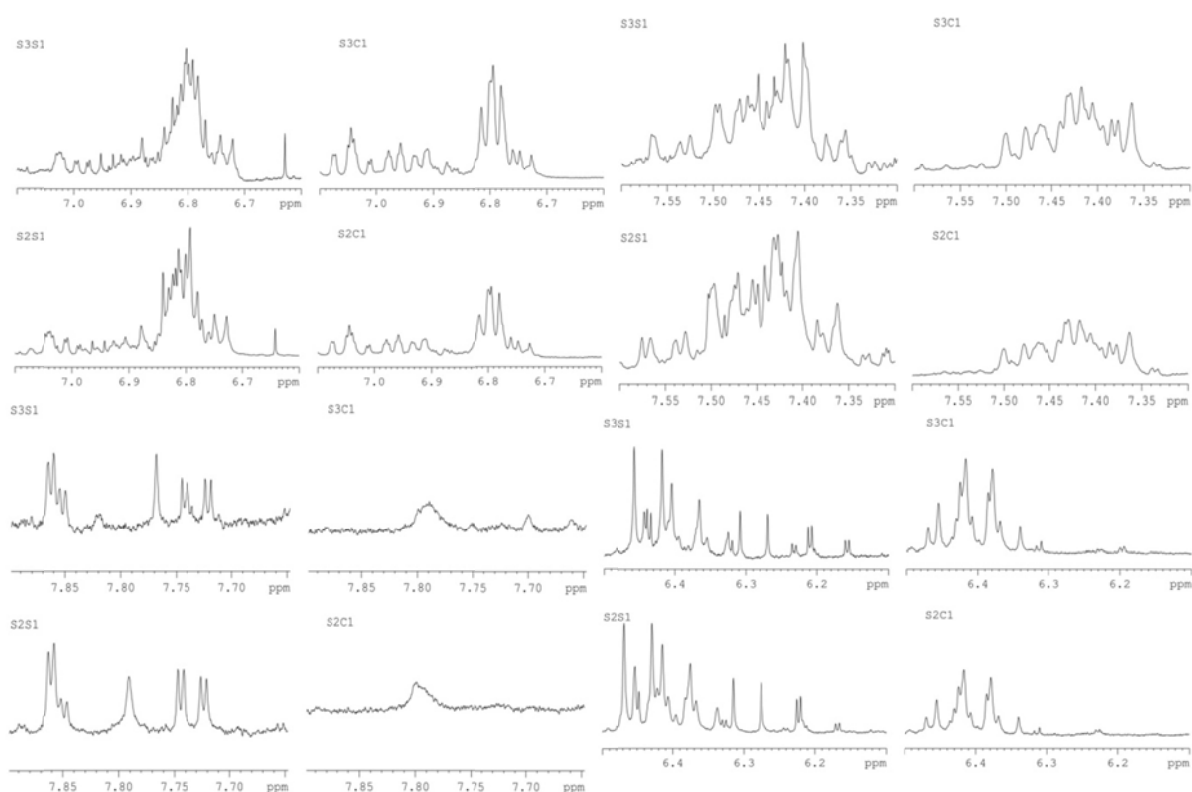


Figura 26 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  referente a região dos compostos aromáticos em amostras de pólen de *M. seminigra* coletadas no período seco e chuvoso de Manaus – AM.

A composição química do pólen coletado pelas abelhas *M. seminigra* da colônia nº 1 nas duas estações (S1C e S1S) parece ser muito semelhante, pois estas amostras se encontram próximas no gráfico de *scores* (Figura 19), o que permite sugerir que as abelhas desta colônia continuem a coletar pólen da mesma fonte vegetal. O mesmo acontece com a colônia nº 4

(S4C e S4S). Além disso, pode-se sugerir que as abelhas da espécie *M. seminigra* coletam pólen de fontes florais diferentes no período chuvoso, já que S1C e S4C estão distantes de S2C e S3C no gráfico de *scores* (Figuras 27, 28 e 29). As amostras coletadas no período seco pela colônia nº 2 e 3 de *M. seminigra* parecem ser provenientes da mesma fonte utilizada pelas colônias nº 1 e 4 dessa mesma abelha no período chuvoso, mas diferente da fonte utilizada pelas colônias nº 2 e 3 de *M. seminigra* no período chuvoso (Figuras 27, 28 e 29), ou seja, metade das colônias de *M. seminigra* analisadas coletou pólen de diferentes fontes vegetais nas diferentes estações climáticas, e a outra metade coletou pólen da mesma fonte vegetal nessas diferentes estações. Isto justifica a diferença espacial entre estas amostras no gráfico de *scores* (Figura 19), onde S2C e S3C se agrupam em *scores* positivos de PC2, enquanto que S1C e S4C agrupam-se em *scores* negativos.

As diferenças e similaridades entre estas amostras devem-se a presença de sinais na região dos carboidratos. Observou-se nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , uma variação considerável na intensidade dos sinais dos hidrogênios anoméricos da  $\alpha$ -glicose (Figura 27) e  $\beta$ -glicose (Figura 28), assim como sinais de outros carboidratos (Figura 29), nas diferentes estações climáticas. O conteúdo de açúcares no pólen pode ser justificado pela presença de mel ou néctar (STANLEY & LINSKENS, 1974). QIAN *et al.* (2008) identificaram frutose, glicose e sacarose no pólen de *A. mellifera* proveniente da Espanha, Israel, China e Romênia.



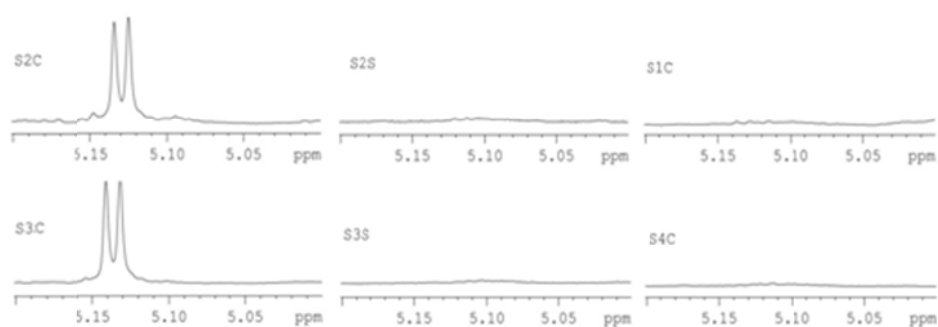


Figura 27 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região da  $\alpha$ -glicose em amostras de pólen coletadas por abelhas sem ferrão no período seco e chuvoso de Manaus - AM.

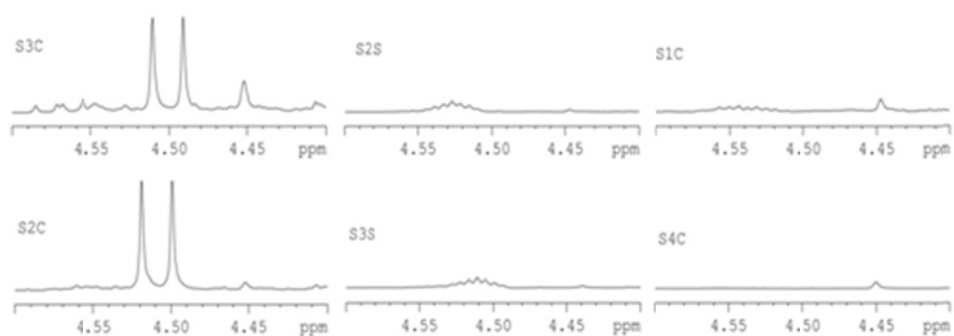


Figura 28 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen coletadas por abelhas sem ferrão no período seco e chuvoso de Manaus - AM.

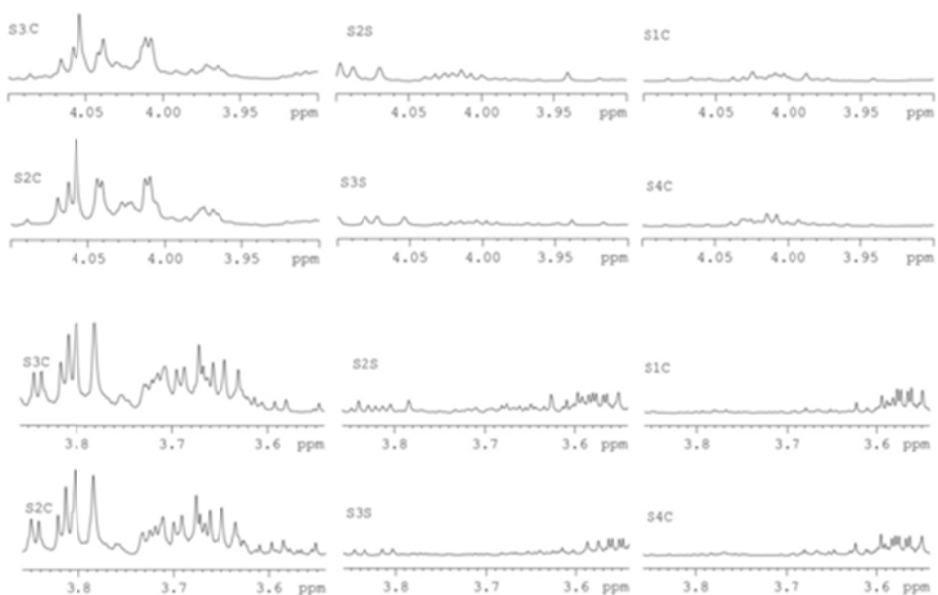


Figura 29 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen de *Melipona seminigra* no período seco e chuvoso de Manaus - AM.

Quando analisamos somente as diferenças na composição química das amostras de acordo com as estações climáticas, sem levar em consideração o comportamento de coleta intraespecífico de pólen, percebe-se que as variáveis que tiveram maior impacto na disposição das amostras no gráfico de *scores* são as apresentadas e discutidas a seguir.

A região de  $\delta$  7,7 a 7,9 (Figura 30) parece ser responsável uma das responsáveis pela diferenciação das amostras nas diferentes estações climáticas, uma vez que apresentam diferenças como os sinais que desaparecem no período chuvoso.

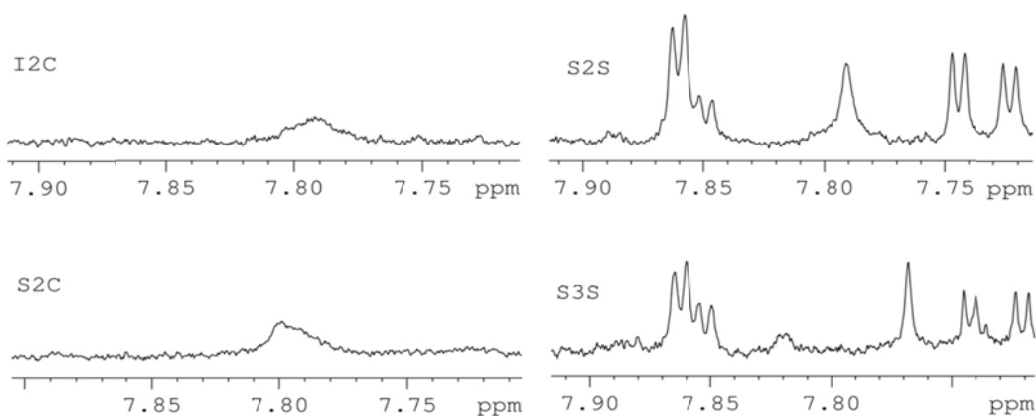


Figura 30 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região dos compostos aromáticos em amostras de pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletadas diferentes estações climáticas (período seco e chuvoso) em Manaus – AM.

Outra região apontada pela análise quimiométrica das variáveis é a de  $\delta$  2,42 e 2,48 (Figura 31), que também desaparece no período chuvoso e é característica de aminoácidos. Segundo Cook *et al.* (2003) as abelhas demonstram preferência por fontes de polens ricos em aminoácidos essenciais. Kitaoka e Nieh (2009) variaram a concentração de proteína do pólen entre 17% e 33% e mostraram que as abelhas do gênero *Bumble* regulam sua atividade de forrageamento de acordo com a qualidade nutricional do pólen.

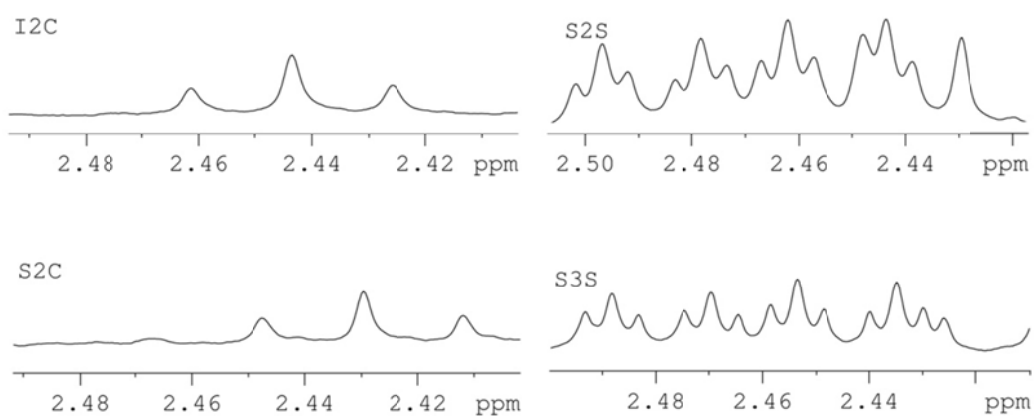


Figura 31 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região dos aminoácidos em amostras de pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletadas diferentes estações climáticas (período seco e chuvoso) em Manaus – AM.

Além destas, a região espectral das amostras de pólen entre  $\delta$  3,0 e 3,3, que é própria de carboidratos, também apresenta diferenças nas estações climáticas (Figura 32).

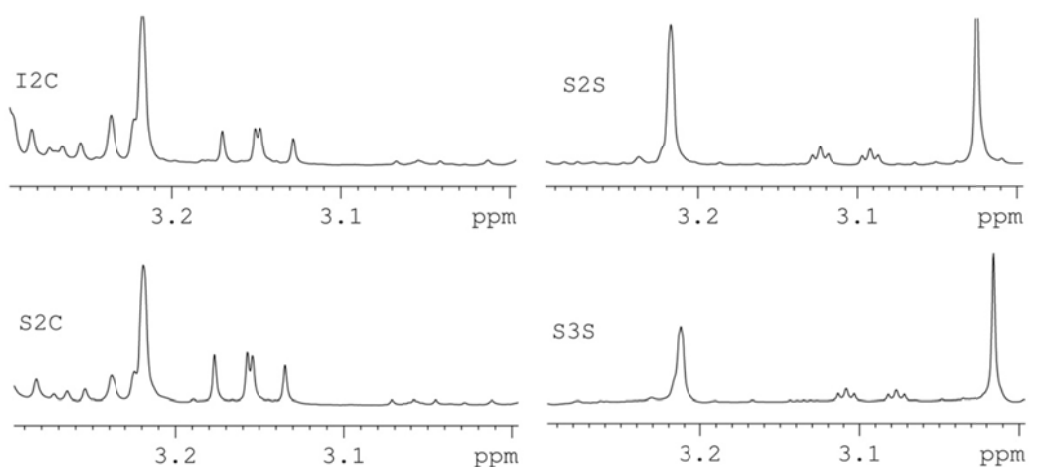


Figura 32 – Ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais referentes a região dos carboidratos em amostras de pólen de *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* coletadas diferentes estações climáticas (período seco e chuvoso) em Manaus – AM.

### 5.6.3 Análise de agrupamentos hierárquicos - HCA

Uma discriminação semelhante à observada na PCA foi obtida na análise por HCA (Figura 33), que foi realizada com os mesmos parâmetros da PCA, e um índice de similaridade igual a 0,38 discriminou as amostras em três grupos.

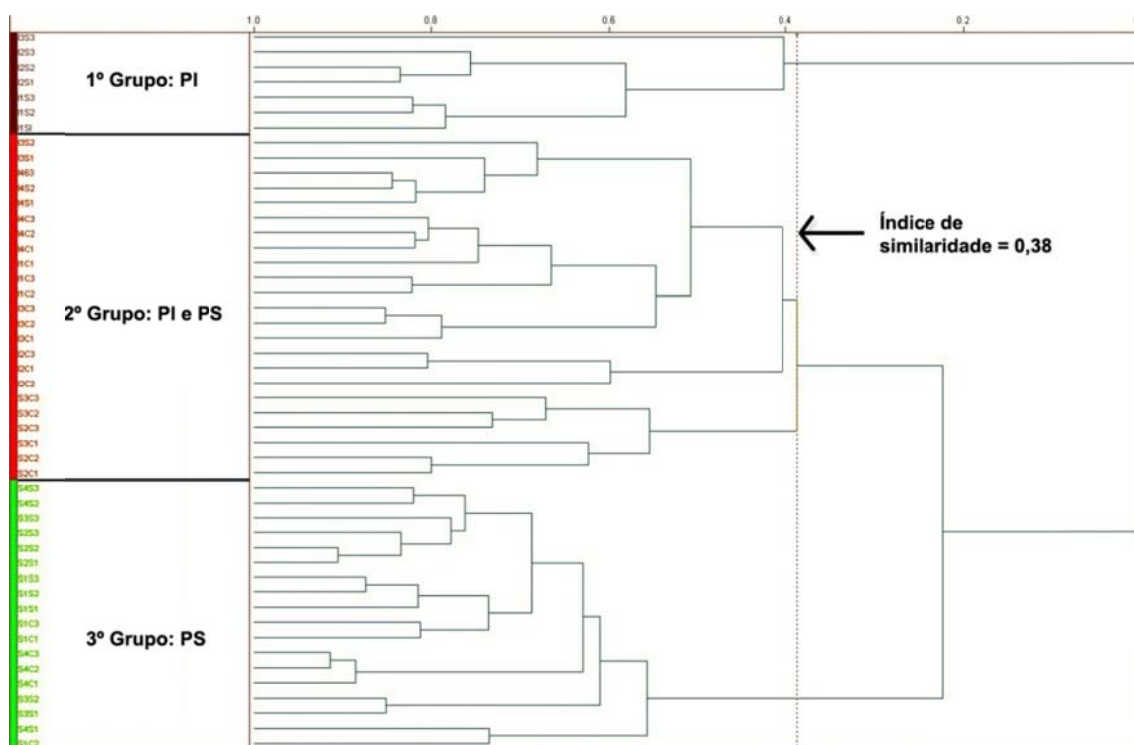


Figura 33 – Dendrograma dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pólen coletado pelas abelhas *Melipona seminigra* (PS) e *Melipona interrupta* (PI) nos períodos seco e chuvoso da cidade de Manaus – AM.

O primeiro grupo reúne amostras de pólen coletado por *M. interrupta* no período seco, que possuem características químicas parecidas, em seguida, nota-se um grupo de transição, no qual ocorre a mistura entre amostras de pólen coletado por *M. interrupta* e *M. seminigra* em ambas as estações climáticas, e por último, um grupo que reúne apenas amostras coletadas por *M. seminigra* nas duas estações climáticas. Portanto, a separação (que demonstra a

diferença) do pólen coletado pelas diferentes espécies de abelhas é bem clara. No entanto, a divisão das amostras conforme a estação climática não é observada da mesma maneira.

A diferença observada nas amostras de pólen coletadas por diferentes espécies de abelhas pode ser explicada pelo diferente comportamento de coleta de pólen destas espécies. As abelhas sem ferrão amazônicas ainda são pouco conhecidas e não existem estudos conclusivos sobre o que determina o comportamento de coleta de alimento pelas espécies aqui estudadas. Recentemente, foram publicados os primeiros trabalhos envolvendo o estudo da genética destas espécies, que revelaram que estas apresentam genes que são expressos de maneira diferente do modelo conhecido em outras espécies de abelhas, o que permite sugerir que outros aspectos como seu comportamento de coleta de alimentos e a composição química de seus produtos também sejam diferentes. No entanto, levantaram-se algumas hipóteses relacionadas ao forrageamento por outras espécies de abelhas, que podem nortear o entendimento do comportamento de coleta das abelhas sem ferrão, bem como a variação na composição química do pólen por elas coletado.

Segundo Bawa (1983), uma florada pode ser capaz de atrair abelhas devido à abundância das flores, a quantidade de pólen por elas produzido, o número de insetos competidores, a distância entre a florada e o ninho, e a preferência inata da espécie.

Questões interessantes sobre o hábito alimentar das abelhas foram propostas por naturalistas que notaram que algumas espécies utilizam um ou poucos tipos de flores (monoélicas), enquanto outras obtêm alimento em vários tipos de flores (polieléticas ou generalistas) (PIRANI & CORTOPASSI-LAURINO, 1993). CAMPOS *et al.*, (1997) afirmam que geralmente o pólen apícola é composto de um ou dois tipos polínicos principais, misturados com menores quantidades de pelotas de pólen de diversas outras fontes de pólen.

As abelhas do gênero *Bombus* são capazes de determinar a necessidade da colônia por pólen, e também podem discriminar se este pólen é de alta qualidade, alto valor nutritivo, ou de baixa qualidade (DOBSON *et al.*, 1999). Forrageiras de *Bombus impatiens* podem ser capazes de detectar de forma direta (por gosto) ou indiretamente (pelo odor) diferentes concentrações de proteínas (MAPALAD *et al.*, 2008) no pólen. Outras abelhas ainda optam por polens com alto conteúdo de lipídios insaturados, certos compostos fenólicos e aminoácidos mais adequados ao seu metabolismo.

## 6 CONCLUSÕES

As análises do perfil químico e físico-químico pelos métodos tradicionais revelaram variações significativamente diferentes nas quantidades de nutrientes entre o pólen coletado pelo mesmo gênero de abelhas sem ferrão amazônicas. O alto conteúdo de lipídios encontrado nas amostras pode ser um fator positivo, já que, geralmente, alimentos de origem vegetal apresentam ácidos graxos insaturados, importantes na proteção contra doenças cardiovasculares. Destaca-se ainda o alto conteúdo de fibra encontrado nas amostras que, dependendo do tipo, pode contribuir para o bom funcionamento do intestino, além de ajudar no controle de doenças como hipercolesterolemia e diabetes. É importante que sejam realizados outros estudos que identifiquem quais as classes de lipídios e que tipos de fibras compõem o pólen coletado por essas abelhas.

O conteúdo de proteínas da amostra de pólen coletado pela abelha *M. interrupta* e o pH e a umidade das amostras coletadas por ambas as abelhas estudadas, não atenderam ao recomendado pelo Regulamento Técnico brasileiro que fixa valores de qualidade e identidade para a comercialização de pólen apícola. Portanto, recomenda-se que sejam realizadas mais análises, principalmente em relação ao pH do pólen coletado por abelhas sem ferrão, a fim de melhor caracterizar este produto para futura comercialização. Além disso, enfatiza-se a falta de padronização em relação aos métodos analíticos utilizados nos trabalhos científicos, para a análise de pólen apícola. Embora a legislação brasileira estabeleça alguns métodos de análise, ainda permanecem várias lacunas em relação a algumas particularidades de cada método, o que dificulta a comparação de resultados e padronização das análises.

A aplicação conjunta da espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e dos métodos quimiométricos possibilitou discriminar o pólen coletado por *M. seminigra* do pólen de *M. interrupta* em diferentes estações climáticas, o que evidencia que estas abelhas possuem comportamento de forrageamento diferente diante de um mesmo pasto apícola e, portanto o pólen apresenta composição variável de acordo com a estação climática e com as espécies de abelhas que o coletam. No entanto, quando utilizados somente experimentos uni e bidimensionais de curta distância, a RMN apresentou eficiência para a identificação de algumas substâncias responsáveis pelas discriminações, e ajudou a observar todas as classes de substâncias presentes, além de reforçar os resultados obtidos nos outros métodos de análise da composição de alimentos utilizados neste trabalho. Outro fato importante foi a identificação do ácido acético como a substância que apresentou o sinal de maior intensidade nos espectros, indicando que este é o ácido orgânico predominante, e que além da fermentação alcoólica já conhecida, o pólen pode passar por fermentação acética.

Os estudos com abelhas sem ferrão e com os produtos por elas produzidos estão ainda no início. Vários testes precisam ser realizados para que sejam conhecidos mais benefícios à saúde humana e assegurar o consumo de um produto adequado de vários pontos de vista (microbiológico, químico, biodisponibilidade de nutrientes, toxicidade, etc.). No entanto, pelo que tudo indica até o presente momento, o pólen coletado pelas abelhas amazônicas, parece ser um complemento alimentar muito valioso do ponto de vista nutricional, pois além de conter diversos nutrientes importantes para a manutenção da saúde, ainda contém substâncias antioxidantes, capazes de prevenir doenças, e que tornam o pólen das abelhas amazônicas um potencial alimento funcional.



## REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. B. **Aplicação das técnicas espectroscópicas de RMN e IV e de métodos quimiométricos na quimiotaxonomia de líquens**. 2007. 155 p. Tese (Doutorado em Química) Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Controle de qualidade de pólen apícola desidratado. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA E II CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, Aracaju, 2006. **Anais...** Aracaju: SEBRAE, 2006.

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

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Cuniff, P.: AOAC International, Washington, 1995.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16 ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997. 1141 p.

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

BACELAR-LIMA, C. G.; FREIRE, D. C. B.; COLETTI-SILVA, A.; COSTA, K. B.; LARAY, J. P. B.; VILAS-BOAS, H. C.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Melitocoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 and *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonia Central, Brasil, **Acta Amazonica**. v. 36, p. 343–348, 2006.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor; 1989.

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

BAWA, K. S. Patterns of flowering in tropical plants. In.: JONES, G. E.; LITTLE, R. J. (Ed.) **Handbook of experimental and pollination biology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1983. p. 394 – 410.

BECKONERT, O.; BOLLARD, M. E.; EBBELS, T. M. D.; KEUN, H. C.; ANTTI, H.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. NMR-based metabonomic toxicity classification: hierarchical cluster analysis and k-nearest-neighbor approaches. **Analytica Chimica Acta**, v. 490, p. 3–15, 2003.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1998.

BELL, R. R.; THORNER, E. J.; SEET, J. L. L.; GROVES, M. T.; HO, N. P.; BELL, D. T. Composition and Protein Quality of Honeybee-Collected Pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. **The Journal of Nutrition**, v. 113, n. 12, p. 2489-2484, 1983.

BELLINI, M. Z. **Caracterização bioquímica dos vinagres brasileiros**. 2006. 82 p. Dissertação (Mestrado Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, K.; SPRAUL, M. Application of chemometrics to the <sup>1</sup>H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 207–213, 1998.

BERREGI, I.; SANTOS, J. I.; CAMPO, G.; MIRANDA, J. I.; AIZPURUA, J. M. Quantitation determination of chlorogenic acid in cider apple juices by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 486, p. 269–274, 2003.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOFFO, E. F. **Utilização da RMN aliada a Métodos Quimiométricos na análise de méis e aguardentes**. 2009. 177 p. Tese (Doutorado em Química) Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G.; FERREIRA, M. M. C.; TOBIAS, A. C. T. **Adulteration study in Brazilian honey by SNIF and <sup>1</sup>H NMR**. Ed. I. A. Farhat, P. S. Belton and G. A Webb. RSC Publishing. p. 105-113, 2007.

BOYE, N. P. Immunotherapy of tree pollen allergy with a modified alginate conjugated birch pollen extract compared to an aluminium adsorbed extract. **Allergy**, v. 45, n. 4, p. 241-248, 1990.

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

BRASIL. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jan. 2001, Seção 1, p. 18.

BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; DE DIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F. P.; SACCO, A. Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 177-186, 2002.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, F. L.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

BUSTAMANTE, N. C. R.; BARBOSA-COSTA, K.; CARVALHO-ZILSE, G. A.; FRAXE, T. J. P.; HARA, F. A. S.; MEDEIROS, C. M. **Conhecer para Conservar: Manejo de Abelhas Indígenas sem Ferrão em Manaus**. Coleção Conhecendo a Amazônia. Manaus: Instituto I-PIATAM, 2008. 48p.

CAMPOS, M. G. R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2008.

CAMPOS, M. G.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, P. A. An Approach to the Characterization of Bee Pollens via their Flavonoid/Phenolic Profiles. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 181–185, 1997.

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, P. A. Age-Induced Diminution of Free Radical Scavenging Capacity in Bee Pollens and the Contribution of Constituent Flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 742-745, 2003.

CARAGAY, A. B. Cancer preventive foods and ingredients. **Food Technology**, Chicago, v. 46, p. 65-68, 1992.

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil**. 2008. 248f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARPES, S. T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1818-1825, nov./dez., 2007.

CARPES, S. T.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 220-229, jul./set., 2009.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; ALENCAR, S. M. de; MASSON, M. L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, p. 1660-1664, 2008.

CARVALHO, G. A. The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 10, n. 1, p. 10-15, 2001.

CARVALHO, M.; ROCHA, A.; ESTEVINHO, L.; CHOUPINA, A. Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 11-17, 2005.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; KERR, W. E. Utilização de marcadores microsatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). **Magistra**, v. 18, p. 213-220, 2006.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em análise de alimentos**. 2ª edição revista. São Paulo: Editora UNICAMP, 2003, 207 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, 4ª ed. Editora da UNICAMP, 1990, 279 p.

CONSONNI, R.; GATTI, A.  $^1\text{H}$  NMR studies on italian balsamic and tradicional balsamic vinegars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3446–3450, 2004.

COOK, S. M.; AWMACK, C. S.; MURRAY, D. A.; WILLIAMS, I. H. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? **Ecological Entomology**, v. 28, p. 622–627, 2003.

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

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et Méliponinés du Brésil. **Apidologie**, v. 22, p. 61-73, 1991.

COSCIA, C. J. **CRC Handbook of Chromatography Terpenoids**. Florida: CRC Press. Inc., 1984, p.183.

COSTA, F. M. et al. Características produtivas e reprodutivas de colônias de *Apis mellifera* submetidas à alimentação natural na região de Maringá-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, Florianópolis-SC. **Anais...** Florianópolis: CBA, p. 1-1, 2000.

DADANT, L. **La abeja y la colmeia**. 4ª edição. Guli, 1966. 936 p.

DAY, S.; BEYER, R.; MERCER, A.; OGDEN, S. The nutrient composition of honey bee-collected pollen in Otago, New Zealand. **Journal of Apicultural Research**, v. 29, p. 138–146, 1990.

DEFERNEZ, M.; COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using  $^1\text{H}$  NMR spectra. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1009–1017, 2003.

DOBSON, H. E. M.; DANIELSON, E. M.; VAN-WESEP, I. D. Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). **Plant Species Biology**, v. 14, p. 153–166, 1999.

DOMÍNGUEZ, X. A. **Cromatografia en Papel y en Capa Delgada**. Washington, 1975.

DUARTE, I.; BARROS, A.; BELTON, P. S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GIL, A. M. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2475–2481, 2002.

FERREIRA, M. M. C.; FARIA, C. G.; PAES, E. T. Oceanographic characterization of northern São Paulo Coast: a chemometric study. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 47, p. 289–297, 1999.

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

FUKAYA, M.; PARK, T. S.; TODA, K. Improvement of acetic acid fermentation by molecular breeding and process development. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 6, p. 447–454, 1992.

GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M.; SPRAUL, M. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 488, p. 35–51, 2003.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

GOH, L. M.; BARLOW, P. J.; YONG, C. S. Examination of antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaf infusions. **Food Chemistry**, v. 82, p. 275–282, 2003.

GOMEZ-CARAVACA, A. M.; GOMEZ-ROMERO, M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220–1234, 2006.

GONÇALVES, L. S. Comments on the aggressiveness of the Africanized bees in Brazil. **American Bee Journal**, v. 114, n. 12, p. 448-450, 1974.

HANSSEN, M. **The healing power of pollen and other products from the beehive, propolis, royal jelly, honey**. Wellingborough: Thorsons publishers Ltd., 1979, p. 65.

HERBERT, E. W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 1978.

HOUGHTON, P. J.; RAMAN, A. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts**. Londres: Chapman & Hall, 1<sup>o</sup> Ed. 1998, 199 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CONTRERA, F. A. L.; KLEINERT, A. M. P. A Meliponicultura e a Iniciativa Brasileira dos Polinizadores. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA E I CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, Natal, 2004. **Anais...** Natal, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4<sup>a</sup> ed., 1<sup>a</sup> Edição Digital, São Paulo, 2008. 1020 p.

JALALI-HERAVI, M.; MASOUM, S.; SHABAZIKHAH, P. Simulation of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra of lignin compounds using principal component analysis and artificial neural networks. **Journal of Magnetic Resonance**. v. 171, p. 176–185, 2004.

JUZWIAK, S. Experimental evaluation of the effect of pollen extract on the course of paracetamol poisoning. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**, v. 49, p. 57-69, 1993.

KATES, M.; **Techniques of lipidology**: isolation, analysis and identification of lipids, In: Lipid extraction procedures. Elsevier Applied Science: London, 1972, cap. 2, p. 347-353.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Urucu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 143p, 1996.

KERR, W. E. As abelhas e o meio ambiente. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Salvador, 1998. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Apicultura, 1998. p. 27-30.

KERR, W. E. **Biologia e manejo da tíuba: a abelha do Maranhão**. EDUFMA. São Luis - MA, 1996. 156 p.

KERR, W. E. Extinção de Espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponíneos. **Anais do V Encontro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, SP. p. 4-9. 2002.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; COLETO-SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. **Aspectos poucos mencionados da biodiversidade amazônica**. Brasília: MCT, 2001. 22p. (Parcerias Estratégicas, n. 12).

KITAOKA, T. K.; NIEH, J. C. Bumble bee pollen foraging regulation: role of pollen quality, storage levels, and odor. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 63, p. 501-510, 2009.

KOSHIO, S.; MURADIAN, L. B. A. Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) em geléia real e adicionada a mel brasileiro. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 670-673, 2003.

KOSIR, I. J.; KOCJANCIC, M.; OGRING, N.; KIDRIC, J. Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). **Analytica Chimica Acta**, v. 429, p. 195-206, 2001.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Kidlington Oxford, v. 2, n. 3, p. 171-174, 2001.

LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E. Metabolite Profiling of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Usin 1H NMR Spectroscopy as a Tool to Detect Potencial Unintended Effects Following a Genetic Modification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2447-2456, 2003.

LE GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 580-588, 2001.

LEÃO, K. V. **Aplicação das técnicas espectroscópicas e quimiométricas no estudo do controle de qualidade das drogas vegetais: embaúba, malva e ginseng brasileiro**. 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Química) Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.



LEBLANC, B. W.; DAVIS, O. K.; BOUE, S.; DELUCCA, A.; DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1299–1305, 2009.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 237–240, 2007.

LIÃO, L. M.; CHOZE, R.; CAVALCANTE, P. P. A.; SANTOS, S. da C., FERRI, P. H.; FERREIRA, A. G. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de *High Resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 634–638, 2010.

LOLLI, M.; BERTELLI, D.; PLESSI, M.; SABATINI, A. G.; RESTANI, C. Classification of Italian Honeys by 2D HR-NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 1298–1304, 2008.

LOPER, G. M.; COHEN, A. C. Amino acid content of dandelion pollen: a honey bee (Hymenoptera: Apidae) nutritional evaluation. **Journal of Economic Entomology**, v. 80, p. 14–17, 1987.

LUTHRIA, D. L. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 14, p. 2266–2272, 2006.

LYNGHEIM, L., SCAGNETTI, J. **Bee pollen: natures miracle health food**. Hollywood: Wiltshire Book Company, 1979.

MACOMBER, R. S. A complete introduction to modern NMR spectroscopy. New York, **A Wiley-Interscience publication**, p. 1-2, 1997.

MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; SEGRE, A. Olive oil as seen by NMR and chemometrics. **Spectroscopy Europe**, v. 15, n. 3, 2003.

MAPALAD, K. S.; LEU, D.; NIEH, J. C. Bumble bees heat up for high quality pollen. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 2239–2242, 2008.

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

MARGHITAS, L. A.; STANCIU, O. G.; DEZMIREAN, D. S.; BOBIS, O.; POPESCU O.; BOGDANOV, S.; CAMPOS, M. G. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. **Food Chemistry**, v. 115, p. 878–883, 2009.

MARQUES-SOUZA, A. C. Fontes de pólen exploradas por *Melipona compressipes manaosensis* (APIDAE: MELIPONINAE), abelha da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 26, p. 77-86, 1996.

MARQUES-SOUZA, A. C.; MIRANDA, I. P. A.; MOURA, C. DE O.; RABELO, A.; BARBORA, E. M. Características morfológicas e bioquímicas do pólen coletado por cinco espécies de meliponíneos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 2, p. 217-229, 2002.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. M.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. **Data Handling in Science and Technology**. vol. 2, Chemometrics: a textbook. Amsterdam, Elsevier, 2001.

MCCAUGHEY, W. F., GILLIAM, M.; STANDIFER, L. N. Amino acids and protein adequacy for honey bees of pollens from desert plants and other floral sources. **Apidologie**, v. 11, p. 75–86, 1980.

MENEZES, C; BONETTI, A. M.; AMARAL, I. M. R.; KERR, W. E. Alimentação Larval de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Estudo Individual das Células de Cria. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 70-75, 2007.

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

MERRILL, A. L.; WATT, B. K. **Energy Value of Foods: Basis and Derivation**. n.º 74. United States: Agriculture Handbook, 1973. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Classics/index.html>>. Acesso em: 12 set. 2009.

MODRO, A. F. H.; MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P.; NETO, J. A. A. M. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1057-1065, 2007.

MODRO, A. F. H.; SILVA, I. C.; LUZ, C. F. P.; MESSAGE, D. Analysis of bee pollen based on color, physicochemical composition and botanical source. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 281-285, 2009.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 13<sup>a</sup> ed., 1996, 1510 p.

NETO, F. T. **Cromatografia: princípios básicos e técnicos afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 12, p. 107-110, 2009.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Tecnapis, 1997. 445 p.

NOVAES, J. A. P. **Desenvolvimento e Validação de Método para Quantificação da Capacidade Redutora de Extratos Vegetais Secos**. Manaus, 2007. 31p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

OLIVEIRA, K. C. L. S.; MORIYA, M.; AZEDO, R. A. B.; TEIXEIRA, E. W.; ALVES, M. L. T. M. F.; MORETI, A. C. C.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. **Química Nova**, v. 32, p. 1-4, 2009.

PADOVAN, G. J.; JONG, D.; RODRIGUES, L. P.; MARCHINI, J. S. Detection of adulteration of commercial honey samples by the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio. **Food Chemistry**, v. 82, p. 633–636, 2003.

PAMPLONA, B. C. **Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas**. São Paulo, 1989. 131p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

PARAMAS, A. M. G.; BAREZ, J. A. G.; MARCOS, C. C., GARCIA-VILLANOVA, R. J.; SANCHEZ, J. S. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). **Food Chemistry**, v. 95, p. 148–156, 2006.

PARK, Y. K.; HIKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K.; MASAHARU, I.; ALENCAR, S. M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, p. 2-7, 2000.

PENNINGTON, J. A. T. Food Composition Databases for Bioactive Food Components. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 419-434, 2002.

PERALTA, F. J. A.; MESQUITA, H. G.; ASSIS, M. G. P. **Iniciação a Meliponicultura: criação de abelhas melíferas sem ferrão**. INPA/IPAAM/SEBRAE. Manaus, AM, 1999. 95 p.

PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. 192 p.

PORTUGAL-ARAÚJO, V. **Contribuição para o conhecimento da biologia, cultura e domesticação das abelhas Amazônicas**. 180 p. 1978. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus-Amazonas.

PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO, E. "A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds". **Analytica Chimica Acta**. v. 596, p. 325 – 329, 2007.

QIAN, W. L.; KHAN, Z.; WATSON, D. G.; FEARNLEY, J. Analysis of sugars in bee pollen and própolis by ligand Exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 78-83, 2008.

RÊGO, M. M. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; VENTURIERI, G. A meliponicultura como ferramenta de sustentabilidade e conservação. In: VIII ENCONTRO DE ABELHAS DE RIBEIRÃO PRETO, Ribeirão Preto, 2008. **Anais...** Ribeirão Preto, 2008.

ROE, D. A. Effects of drugs on vitamins needs. **Annals of the New York Academy Sciences**, New York, v. 669, p. 156- 163, 1992.

SANTOS, M. S. **Avaliação do emprego de técnicas de RMN e IV aliadas a métodos quimiométricos na investigação de autenticidade da droga vegetal comercial “quebra-pedra”**. 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado em Química) Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SAWYER, R. **Honey identification**. Cardiff: Cardiff Academic Press, 1988. 115 p.

SERRA BONVEHÍ, J; ESCOLÁ JORDÁ, R. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 45, n. 3, p. 725-732. 1997.

SERRA-BONVEHÍ, J.; SOLIVA-TORRENTÓ, M.; CENTELLES-LORENTE, E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1848-1853, 2001.

SILVA, L. M. A. **Utilização da RMN e ferramentas quimiométricas na avaliação das alterações metabólicas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (var. caipira) causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2010. 157 p. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

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

SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; AGRA, M. F.; SILVA, E. M. S.; REIS, I. T.; FREITAS, B. M. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 173-178, 2009.

SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSAFILHO, J. A.; SILVA, S. E. M.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. B. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v. 19, n. 6, p. 507–511, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., GOSMASN, G. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, 1999, 821 p.

SMEDES, F. Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. **The Analyst**, v. 36, n. 124, p. 1711-1718, 1999.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH•, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1077-1080, 2003.

SOMERVILLE, D. C. Lipid content of honey bee-collected pollen from south-east Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v. 45, p. 1659-1661, 2005.

SOMERVILLE, D. C.; NICOL, H. I. Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v. 46, n. 1, p. 141-146, 2006.

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

STANDIFER, L. N. **Honey-bee nutrition**. Washington: Beekeeping in the United States, 1967. 147 pp.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: Biologie, Biochemistry**, Management. Berlin: Springer-Verlag, 1974.

SZCZESNA, T.; RYBAK-CHMIELEWSKA, H. Some properties of honey bee collected pollen. In Polnisch-Deutsches Symposium Salus Apis Mellifera, new demands for honey bee breeding in the 21st century. **Pszczelnicze Zeszyty Naukowe**, v. 42, n. 2, p. 79–80, 1998.

TAVARES, L. A. **Utilização de métodos quimiométricos aliados a RMN na caracterização dos diferentes tipos de cafés comerciais**. 2007. 169 p. Tese (Doutorado em Química) Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G.; FERREIRA, M. M. C.; CORREA, A.; MATTOSO, L. H. Analysis of blends of raw coffees of Arabica and Robusta varieties by <sup>1</sup>H NMR and chemometric methods. In: **Magnetic Resonance in Food Science**. The Multivariate Challenge. ENGELSEN, S. B.; BELTON, P. S.; JAKOBSEN, H. J. (Eds.). Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005, p. 80-88.

VIEIRA, F. C. B.; ARAUJO, D. M.; CARVALHO, Y. M. B.; SANTOS, A. V. Meliponicultura: uma alternativa sustentável/rentável para as comunidades ribeirinhas/rurais do estado do Amazonas. In: IV FÓRUM AMBIENTAL DA ALTA PAULISTA, Tupã, 2008: **Anais...** 2008.

VILLARREAL, L. P. S.; NUNOMURA, R. C. S.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Compostos fenólicos e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona seminigra* Cockerell, 1919 na região amazônica. In: 32 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Fortaleza, 2009: **Anais...** 2009.

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

VOGELS, J. T. W. E.; TERWEL, L.; TAS, A. C.; VAN DER BERG, F.; DUKEL, F.; VAN DER GREEF. Detection of adulteration in orange juices by a new screening method using proton NMR Spectroscopy in combination with Pattern Recognition Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 175-180, 1996.

WINNING, H.; LARSEN, F. H.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. "Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics". **Journal of Magnetic Resonance**. v. 190, p. 26-32, 2008.

WITTER, S.; LOPES, L. A.; LISBOA, B.; BLOCHTEIN, B.; MONDIN, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Abelhas sem ferrão no Rio Grande do Sul: Distribuição geográfica, árvores importantes para nidificação e sustentabilidade regional. **Mensagem Doce**, 01 mar. 2009.

ZHAO, J.; ZHANG, C. Y.; XU, D. M.; HUANG, G. Q.; XU, Y. L.; WANG, Z. Y.; FANG, S. D.; CHEN, Y.; GU, Y. L. The antiatherogenic effects of components isolated from pollen *Typhae*. **Thrombosis Research**. v. 57, n. 6, p. 957-966, 1990.

ZHAO, J.; ZHANG, C. Y.; XU, D. M.; HUANG, G. Q.; XU, Y. L.; WANG, Z. Y.; FANG, S. D.; CHEN, Y.; GU, Y. L. Further study of pollen *Typhae*'s effects on the

production of tPA and PGI-2 by cultured endothelial cells. **Thrombosis Research**. v. 56, n. 6, p. 677-685, 1989.