



Christian Frigerio

**Optimização e influência na bioactividade do processo de secagem por radiação
infravermelha de amostras de pólen apícola**

Dissertação de Mestrado

MCQ – Mestrado em Controlo da Qualidade
Água e alimentos

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Maria da Graça Ribeiro Campos
Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Setembro 2009

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Tese apenas para efeitos de investigação mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete;

Christian Frigerio

Resumo

O pólen apícola é definido na legislação como um alimento, e é o resultado da aglutinação de polenes de origem floral, feita pelas abelhas, com néctar (e/ou mel) e saliva, que é colectado a entrada da colmeia.

No presente trabalho uma nova técnica pela determinação da humidade do pólen apícola baseada na utilização de radiações infravermelhas foi desenvolvida.

O mesmo instrumento foi usado como modelo para estudar os efeitos da secagem no infravermelho no perfil fenólico e na actividade anti-radicalar de pólen apícola. A análise da humidade pelo método do IV mostrou uma boa reprodutibilidade e foi validada. A actividade anti-radicalar, avaliada pelo método do 2,2 difenil-2-picrilidrazil (DPPH), e o perfil fenólico não foram afectados pelo processo de secagem com IV, o que permite diminuir o tempo dedicado e o custo desta operação crítica.

Palavras-chave; Pólen apicola; infravermelho, anti-radicalar; 2,2-difenil-2-picrilidrazil; compostos fenólicos; flavonóides; produtos naturais

Abstract

Bee-pollen is defined in the legislation as food and is the result of the agglutination of flower pollens, made by the worker bees, with nectar (and/or honey) and salivary substances, which is collected in the entrance of the hive. In this work a new moisture analysis technique based on the use of infrared radiation was developed for commercial bee pollen. The same instrument was also used to study the effects of the IR drying on the bee pollen radical scavenge activity and phenolic/flavonoidic profile. The moisture analysis by IR method shows a good reproducibility and was validated face of a official method. The radical scavenge activity, assayed by 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method, and the phenolic/flavonoidic profile weren't affected by the IR drying process, that therefore permit decreasing the time and the cost of this critical operation.

Keywords; Bee Pollen; infrared; Radical Scavenging; 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Phenolic Compounds; Flavonoids; Natural Products

Índice das figuras

| | |
|--------------|----|
| Figura 1.1 | 1 |
| Figura 1.2 | 2 |
| Figura 2.2.1 | 17 |
| Figura 2.5.1 | 20 |
| Figura 2.5.2 | 20 |
| Figura 2.6.1 | 22 |
| Figura 2.6.2 | 22 |
| Figura 2.6.3 | 23 |
| Figura 2.6.4 | 23 |
| Figura 2.6.5 | 24 |
| Figura 3.1.1 | 26 |
| Figura 3.1.2 | 26 |
| Figura 3.1.3 | 27 |
| Figura 3.3.1 | 29 |
| Figura 3.3.2 | 30 |
| Figura 3.3.3 | 31 |
| Figura 3.3.4 | 31 |
| Figura 3.3.5 | 32 |
| Figura 3.3.6 | 33 |
| Figura 3.4.1 | 34 |
| Figura 3.4.2 | 34 |
| Figura 3.4.3 | 35 |
| Figura 3.4.4 | 36 |
| Figura 4.1 | 38 |
| Figura 4.2 | 39 |

Índice das tabelas

| | |
|--------------|----|
| Tabela 2.5.1 | 21 |
| Tabela 3.2.1 | 28 |
| Tabela 3.2.2 | 28 |
| Tabela 3.2.3 | 29 |
| Tabela 3.3.1 | 30 |
| Tabela 3.3.2 | 32 |
| Tabela 4.1 | 37 |

Lista abreviaturas e símbolos

ABS; absorvência

°C; graus Célsius

CE₅₀; concentração eficaz a 50%

DPPH; 2,2 difenil-2-picrilidrazil ou 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl

eq.; equivalentes

FP VIII; Farmacopeia Portuguesa VIII

HPLC/DAD; cromatografia de alta prestação com detector de fotodiodos

IR; infrared

IV; infravermelho

M; molar

ml; mililitro

nm; nanometro

RH%; humidade relativa

RSD%;

SD; desvio padrão

sol; solução

UV; ultra violeta

μl; microlitro

μg; micrograma

≈; cerca de

λ; comprimento de onda

λ_{max}; comprimento de onda máximo

Δ; variação

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Bioactividade terapêutica | 5 |
| 1.1.1 Actividade antioxidante | 5 |
| 1.1.2 Actividade Antiaterosclerótica | 7 |
| 1.1.3 Actividade Anti-inflamatória | 8 |
| 1.1.4 Actividade nas alterações patológicas da próstata | 9 |
| 1.1.5 Actividade na osteoporose | 11 |
| 1.1.6 Anemia e o sistema hemapoietico | 12 |
| 1.1.7 Actividade antimicrobiana | 14 |
| 1.1.8 Actividade antidiarreica | 14 |
| 1.1.9 Reacções alérgicas e toxicidade | 15 |
| 2. Materiais e métodos | 17 |
| 2.1 Material vegetal | 17 |
| 2.2 Secagem | 17 |
| 2.3 Determinação da humidade relativa | 18 |
| 2.4 Preparação dos extractos | 19 |
| 2.5 Análise cromatográfica | 19 |
| 2.6 Determinação da actividade anti-radicalar | 21 |
| 2.7 Análise estatística | 25 |
| 3. Resultados e discussão | 26 |
| 3.1 Determinação da origem floral | 26 |
| 3.2 Determinação da humidade relativa | 27 |
| 3.3 Efeitos da secagem no perfil fenólico | 29 |
| 3.4 Efeitos da secagem na actividade anti-radicalar | 33 |
| 4. Conclusões | 37 |
| 5. Bibliografia | 41 |

1. Introdução

O grão de pólen é o micrósporo das Espermatófitas, e é formado nos sacos polínicos das anteras. O transporte do pólen nas Gimnospérmicas é de tipo anemófilo (através do vento) e nas Angiospérmicas pode ser tanto anemófilo quanto zooidófilo (através de animais) ou, mais raramente, hidrófilo (água). O transporte do pólen pelas abelhas (melitofilia) é, portanto, um caso particular da zooidofilia (Paiva e Figueredo, 1987).

O pólen, em conjunto com o néctar, é o alimento principal das abelhas, que, por este motivo, possuem órgãos de recolha especializados para cada um destes substratos. A armadura bucal está adaptada à sucção de néctar e as patas para a recolha de pólen, que é compactado em grãos, chamados “cargas polínicas”. Esta compactação é possível com o auxílio do néctar. Com o primeiro par de patas a abelha limpa o pólen de toda a parte anterior do corpo e junta-o no açafate das patas traseiras. O pólen é assim agrupado sobre uma escova que se encontra na primeira articulação do tarso das patas posteriores (Figura 1.1). Com o segundo par de patas recolhe o que se encontra no tórax e na região ventral. Cada recolha incide quase sempre sobre um único *taxon*, e raramente misturam diferentes pólenes na mesma carga, geralmente numa proporção inferior a 1%. Por esta razão podemos considerar estas cargas como “puras” (Campos, 1997).

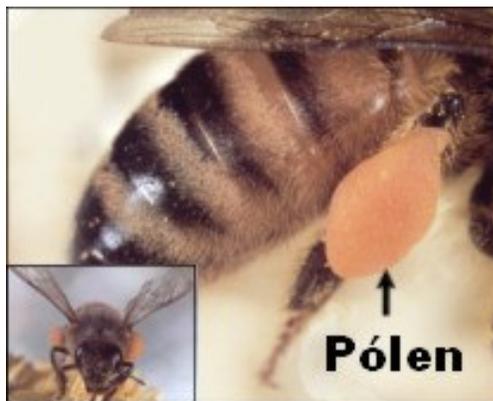


Figura 1.1 Abelha a colher pólen e com a carga polínica direita em destaque (neste caso de coloração laranja) (www.apiarioanhemi.com.br)

Para além disso, é sabido que as abelhas só visitam uma pequena parte da flora e não necessariamente em função da produção de pólen, mas pelas características dos constituintes.

As razões pelas quais as abelhas se orientam para as colheitas ainda não estão bem definidas, embora, Lindsted (1971) tenha demonstrado que, como existem compostos

que as atraem e orientam, ou até as “viciam”, impedindo-as de procurar outro tipo de alimento, elas se fidelizam na colheita.

Dillon e Louveaux (1987) mostraram que os estímulos que intervêm para a recolha do grão de pólen estão hierarquizados: o estado pulverulento da substância é o estímulo de base; em seguida, intervêm os estímulos olfactivos complexos. O pólen é praticamente a única fonte de proteínas para as abelhas (Penfold e Willis, 1961).

As abelhas não consomem o pólen directamente no local da colheita, mas transportam-no e armazenam-no na colmeia. Mesmo por causa deste comportamento é possível recolher o pólen através de um dispositivo chamado “caça-pólen” (Figura 1.2).



Figura 1.2 Caça Polén (www.prometal.cl)

As abelhas são forçadas a entrar para a colmeia, passando por uma rede de orifícios de tamanho igual ao do seu corpo, o que provoca a queda das cargas polínicas que transportam nas corbículas das patas traseiras numa gaveta colocada debaixo da entrada da colmeia.

Sendo que o pólen é a principal fonte de alimentos para as abelhas e para as larvas, uma dada percentagem dos orifícios do caça-pólen permite a entrada de uma parte da colheita. A partir do pólen armazenado as abelhas produzem a Geleia Real para alimentar as larvas e a rainha.

O pólen mais vulgarmente comercializado é o que se retira à entrada da colmeia, sem que tenha sofrido nenhuma alteração química.

Os produtos da colmeia, incluindo o pólen apícola, são usados, enquanto alimento divino, desde há muitos séculos, criando uma ligação entre a dieta, a medicina e a terapia.

Aproximadamente em 487-380 a.C., Herodicos de Selymbrie, mestre de ginástica, inaugurou o seu método da dieta, “Grand Arte” e no mesmo período Hippocrate de Cos (a.C. 460-377) estabeleceu as regras no seu Tratado da Dieta “The Food and the Man Nature” (Debry, 1991). Desde então, empiricamente ou não, reconheceu-se que uma

dieta correcta poderia ter um efeito profiláctico e evitar o aparecimento de algumas doenças.

No que diz respeito aos produtos da colmeia foram publicados muitos artigos, principalmente sobre o mel. No entanto, sobre o Pólen Apícola e a Geleia Real muito trabalho ainda está por fazer.

Um problema da maioria dos artigos publicados, relacionado com os nutrientes presentes no Pólen Apícola, é a falta da identificação da espécie floral das amostras utilizadas no estudo. É reconhecido que isso tem influência no tipo e na quantidade dos constituintes investigados. Existem já vários estudos que suportam a ideia de que o teor em macronutrientes do Pólen Apícola faz deste produto um bom suplemento alimentar, principalmente devido às proporções bem equilibradas de proteínas, de lípidos e de hidratos de carbono. Também o valor calórico do Pólen Apícola foi avaliado por alguns autores em $381,70 \pm 14,69$ kCal ($1595,51$ kJ) por 100g (Orzaez-Villanueva *et al.*, 2002). De acordo com Peris (1984), uma dose diária de 15g de Pólen Apícola fornece a quantidade mínima de aminoácidos necessários ao corpo humano. Cerca de 40% do seu conteúdo é constituído por vários tipos de açúcares. Este valor pode variar em função dos compostos que os autores incluem nesta classe. Por exemplo, Huidobro (1987) obteve valores de 61%, mas considerando como parte desta fracção açúcares redutores (frutose, glicose), maltose, sacarose e polissacáridos. Nesse mesmo trabalho foram incluídos, num grupo especial, o amido e outros polissacáridos que não são absorvidos como, por exemplo, celulose, hemicelulose, lenhina, esporopolenina, etc. Esta separação é efectivamente importante, pois foi verificado que aproximadamente 50% do peso do Pólen Apícola corresponde a material insolúvel, tanto em solventes orgânicos como em solventes aquosos, onde provavelmente se poderão incluir as fibras (Campos, 1997). Os lípidos e os minerais (cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre, manganésio, etc.) representam 5 e 3% respectivamente. A maior parte (60%) dos ácidos gordos encontram-se na forma livre. Os ácidos gordos ligados, são caracterizados por um elevado teor de ácido α -linolénico (70%) seguido por pequenas quantidades de ácido linoleico e oleico. O ácido palmítico é o ácido gordo saturado mais abundante (Seppänen *et al.*, 1989). No Pólen Apícola encontram-se ainda diversas vitaminas como as do complexo B, o ácido ascórbico e também as vitaminas A, D e E. A variação das concentrações destes compostos nas diversas espécies de pólen pode ser explicada com os resultados médios das análises apresentadas em bibliografia (Herbert *et al.*, 1987; Hagedorn e Burguer, 1967).

Face a estas considerações é evidente a necessidade de mais investigação para chegar à padronização deste produto, que deverá ser sujeito a um rigoroso controlo de qualidade, quer seja uma aplicação dietética, quer uma matéria-prima bioactiva para possíveis

aplicações terapêuticas (Campos, 1997), nomeadamente a incluir em “Medicamentos à Base de Plantas”.

A partir deste pressuposto é fácil entender a utilidade do trabalho desenvolvido, onde tentamos desenvolver e validar uma técnica útil pelo controlo da qualidade do pólen apícola.

Como se verá nos próximos capítulos, estão descritas determinadas actividades só para determinados *taxa*, pois em função deste muda o perfil dos constituintes presentes. Muitos trabalhos da literatura científica falham neste ponto, o que torna os resultados dificilmente reproduzíveis, não sendo a matéria-prima padronizada. Daí a necessidade de utilizar um método sistemático para caracterizar o Pólen Apícola em relação aos seus poléns constitutivos.

A composição floral do pólen é afectada por diferenças na área de colheita e, na mesma área, pela estação (Szczesna *et al.*, 2002).

Campos *et al.*, (1996, 1997) realizaram vários estudos que envolveram amostras de Pólen Apícola colhido em zonas e anos diferentes e que nos ajudam na identificação das fontes florais. O método utilizado, que envolveu a análise dos perfis flavonóidicos/fenólicos das amostras, por cromatografia líquida de alta pressão com detector de fotodiodos (HPLC/DAD), demonstrou ser mais sensível e preciso do que a análise microscópica. Para além disso, o perfil das espécies é independente de factores geográficos ou climáticos, o que torna este método universal.

Este mesmo método foi utilizado em estudos taxonómicos mais avançados por Almaraz-Abarca *et al.*, (2008), onde se concluiu, por exemplo, que o perfil flavonóidico/fenólico representa um importante marcador taxonómico nas Cactaceae.

Do ponto de vista da actividade terapêutica é de fundamental importância, para além da identificação da espécie floral, a determinação digamos “quantitativa” da bioactividade. No caso da actividade antioxidante, pode ser avaliada através de ensaios simples como o do DPPH (Leja *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2006). Campos *et al.* (2003), estabeleceram que a actividade anti-radicalar é específica da espécie, independente da zona e da estação de colheita, e que tende a diminuir com o envelhecimento.

Sendo esta actividade possivelmente ligada a outras, como por exemplo a actividade anti-inflamatória, antiaterosclerótica ou anti-cancerígena, a sua avaliação pode ser utilizada como marcador da bioactividade de Pólen Apícola.

Aqui insere-se a segunda parte do trabalho, ou seja a tentativa de aplicar o mesmo principio sobre que se baseia a determinação por infravermelhos da humidade na secagem do pólen apícola, e ver se esta técnica altera a actividade anti-radicalar.

2. Bioactividade terapêutica

1.1 Actividade antioxidante

Entre as diferentes teorias sobre o impacto dos radicais na saúde a “*radical theory of aging*” é a que ganhou mais adeptos após a descoberta do envolvimento dos radicais livres em quase todos os processos de degradação celular, como doenças cardiovasculares, artrite, cancro, diabetes, etc., e podem igualmente ser os responsáveis pela doença de Parkinson e de Alzheimer (Féher *et al.*, 1986).

Existem também dados contrastantes com respeito aos efeitos anti-envelhecimento dos antioxidantes, e muito pouco é dito sobre a eficácia e a biodisponibilidade dos antioxidantes “exógenos” em comparação com os níveis normais de antioxidantes próprios do organismo, quando este se encontra num estado saudável normal (Le Bourg, 2001).

Também o Pólen Apícola foi usado durante séculos para proteger o organismo das doenças e, especialmente, para reduzir o processo de envelhecimento. Seguindo esta teoria Dudov e Starodub (1994), alimentaram ratos com Pólen Apícola durante um mês e estudaram o estado do sistema redox dos eritrócitos. Estabeleceram que o teor de glutathione, os grupos -SH totais, assim como, a actividade da glutathione peroxidase e da glutathione reductase aumentaram em comparação com o grupo de controlo. Simultaneamente houve uma diminuição do malonodialdeído e de conjugados diénicos nos eritrócitos. A actividade da superóxido catalase e da superóxido dismutase aumentou, mas não de forma significativa. Os autores concluíram, portanto, que nos eritrócitos dos ratos alimentados com Pólen Apícola os processos oxidativos foram bloqueados.

A resposta imunitária humoral primária e secundária (o nível de IgM e IgG específicas), assim como a intensidade da hipersensibilidade tardia aos eritrócitos de ovelha, foram investigadas em coelhos alimentados com Pólen Apícola durante um mês. Os resultados mostraram que o Pólen Apícola possui actividade imunomoduladora, enquanto estimulou a resposta imune humoral e alterou a reacção da hipersensibilidade tardia (Dudov *et al.*, 1994).

Talvez isto tudo possa ser explicado através da teoria antioxidante. O exercício físico aeróbio impõe ao organismo um consumo suplementar de oxigénio, que nos seres humanos pode chegar a ser dez vezes o consumo básico. O conceito de “esforço oxidativo” supõe, antes de tudo, a rotura do equilíbrio precário existente entre a produção e a inactivação dos radicais livres do oxigénio. Portanto, com o exercício físico o “stress” é provocado por um excesso da produção de radicais. Todavia, parece paradoxal que uma pessoa que pratica desporto com regularidade viva numa situação de “esforço

oxidativo permanente”, pagando as consequências que isso implica. Hoje em dia é reconhecido pelos cientistas que o treinar a resistência, sendo este um mecanismo adaptável, aumenta as defesas antioxidantes, evitando então que o maior consumo de oxigénio provoque consequências negativas.

Liu e Li em 1990 observaram o efeito morfológico do Pólen Apícola na lipofuscina intercelular de ratos NIH. Os resultados demonstraram uma redução da concentração de lipofuscina no músculo cardíaco, no fígado, no cérebro e nas glândulas supra-renais após administração do Pólen Apícola.

Um grande número de artigos foi publicado na tentativa de encontrar uma relação entre a actividade antioxidante e os componentes do Pólen.

De facto, não foi possível estabelecer uma relação/ligação absoluta entre eles mas verificou-se que a papel principal poderia ser atribuído aos compostos fenólicos (Campos *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 1994; Leja *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 2007). Foi também descoberto que a actividade antioxidante do Pólen Apícola é específica da espécie e independente da sua origem geográfica (Campos, 1997; Almaraz-Abarca *et al.*, 2004) e que diminui com o envelhecimento do Pólen, principalmente se as condições de armazenamento não são as ideais (Campos *et al.*, 2003).

O Pólen Apícola mostrou bons resultados também num estudo que visava avaliar a sua actividade na peroxidação do ácido linoleico e na captação do radical hidroxilo (Liu e Li, 1990).

Bevzo e Grygor'eva (1997) provaram que pequenas doses de raios-X activavam a peroxidação lipídica e as enzimas antioxidantes no fígado de ratos. A introdução de extracto de Pólen Apícola na dieta dos animais normalizou a actividade de algumas enzimas do sistema da glutathiona.

A exposição crónica combinada a radiações ionizantes (dose de 0,25 GY), e cloretos de cádmio ou atrazina, na água em concentrações 5 vezes superiores à “Limited Permissible Concentration” (LPC), levou a um incremento no nível intercelular de K⁺, reduzido no cérebro do rato. No caso das radiações isto é causado por alterações no transporte activo dos iões, e por alterações na permeabilidade da membrana no caso dos xenobióticos. Administrando óleo com β-caroteno e Pólen Apícola os efeitos da radiação foram eliminados, mas os dos xenobióticos não. Os autores teorizaram que a acção selectiva dos fármacos está ligada à sua actividade antioxidante (Anan'eva e Dvoretiskii, 1999).

Uzbekova *et al.*, (2003) avaliaram os efeitos da administração de Pólen Apícola nas funções hepáticas de ratos idosos. Após um mês observaram uma diminuição dos níveis do malonodialdeído e uma normalização no nível dos grupos tiólicos (SH-G). Também o teor de ureia sérica e proteínas melhorou significativamente.

Na medicina tradicional chinesa uma mistura de Pólen Apícola, de *Radix Polygoni multiflore*, *semen ziziphi spinosae*, *radix salviae multiorhizae*, *fructus schisandrae* e *fructus ligustris lucidae*, conhecido como “NAO Li SU”, é usado como “remédio” para a diminuição da memória. Iversen *et al.*, (1997) avaliaram o efeito da preparação num estudo duplamente cego com placebo, em 100 voluntários idosos afectados por problemas de deterioração da memória. Os efeitos foram avaliados após um período de 3 meses de tratamento, por um conjunto de testes psicológicos e bioquímicos. Nenhum efeito desejado foi observado, mas houve aumento do número de eritrócitos e dos níveis de creatinina sérica após tratamento. No subgrupo que inicialmente mostrou um número de eritrócitos abaixo da média, foi encontrada uma correlação positiva significativa entre o aumento deste parâmetro e alterações na pontuação da Wechsler Memory Scale.

A actividade antioxidante marcada, em particular como radical *scavenger*, do Pólen Apícola permite-nos pensar que pode ser um factor relevante em algumas das bioactividades aqui apresentadas.

1.2 Actividade Antiaterosclerótica

A *aterosclerose* é um problema de saúde de grande importância hoje em dia. É o termo utilizado para descrever a infiltração de monócitos, acumulação de substâncias gordas, colesterol, resíduos do metabolismo celular, cálcio e fibrina, acumulando-se no revestimento interno de uma artéria. A acumulação resultante é chamada placa.

Arteriosclerose é um termo geral usado para definir o espessamento e o endurecimento das artérias que pode ocorrer normalmente com a idade. A placa pode então obstruir parcial ou totalmente a corrente sanguínea.

Alguns grupos de investigação demonstraram que o extracto de Pólen tem propriedades benéficas, baixando os níveis plasmáticos de lípidos (Samochowiec e Wójcicki, 1981; Wójcicki e Samochowiec, 1984), reduzindo o tamanho da placa arteriosclerótica (Wójcicki *et al.*, 1986) e diminuindo a agregação das plaquetas *in vitro* (Kosmider *et al.*, 1983) e *in vivo* (Wójcicki e Samochowiec, 1984). Os resultados destes ensaios foram confirmados nos seres humanos (Wójcicki *et al.*, 1983) e sugerem que a adição de ácidos polinsaturados à dieta diminui a viscosidade do sangue e reduz os níveis de triglicéridos e colesterol nos pacientes com doença cardiovascular.

Seppänen *et al.* (1989) analisaram em cromatografia gasosa a composição dos ácidos gordos presentes no extracto lipossolúvel de Pólen (Cernitin GBX), que tem actividade antiaterosclerótica comprovada. As análises revelaram que a maior parte (mais de 60%) dos ácidos gordos encontrava-se na forma livre, em particular (cerca de 70%) ácido linolénico (18:3n-3, α -ALA).

O ácido α -linolénico é um ácido gordo essencial, ou seja, é essencial para a saúde humana mas não é sintetizado pelo organismo. Por este motivo, o ALA deve ser obtido através da alimentação. O ALA, assim como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosaheptaenóico (DHA), pertencem ao grupo dos ácidos gordos omega-3 (Ω -3).

Uma vez ingerido, o ALA é convertido em EPA e DHA, que são mais prontamente usados pelo organismo. O EPA tem actividade anti-coagulante, enquanto reduz a agregação plaquetária. É incorporado *in vivo* nos fosfolípidos das plaquetas, onde substitui, em certa medida, o ácido araquidónico e compete com este para a ciclo-oxigenase e a lipoxigenase, exercendo assim um efeito anti-trombótico. Também pode ser convertido em prostaglandina H_3 e a tromboxano A_3 , compostos que promovem de forma menor a agregação plaquetária (Moncada e Vane, 1984).

1.3 Actividade Anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta fisiológica ao dano, físico ou biológico, dos tecidos ou das células, que envolve um conjunto de reacções destinadas a remover a causa e a reparar o dano.

Podemos distinguir dois tipos de inflamação:

- Inflamação aguda, de curta duração, caracterizada por edema e o movimento das células do sistema imune, desde o sistema vascular para os tecidos extra-vasculares, com o objectivo de eliminar a causa do dano e reparar os tecidos.
- Inflamação crónica, processo de longa duração, onde a inflamação, a destruição dos tecidos e a recuperação ocorrem ao mesmo tempo.

Para o tratamento da inflamação são actualmente usados fármacos anti-inflamatórios não-esteróides e fármacos anti-inflamatórios esteróides, que nem sempre têm grande sucesso na cura destes sintomas. Por essa razão há necessidade de investigar uma nova e segura classe de fármacos anti-inflamatórios.

Choi (2007) avaliou a actividade antinociceptiva e anti-inflamatória de extractos de Pólen de pinheiro (*Pinus densiflora*) em ratos. Os resultados sugeriram que o efeito analgésico possa estar relacionado com as suas propriedades anti-inflamatórias, neurogénicas e narcóticas, e que o extracto actua na ciclooxigenase e na lipoxigenase. O autor especulou que os compostos responsáveis pelas actividades possam fazer parte da fracção flavonóidica do extracto, de acordo com a extensa bibliografia que existe sobre a actividade anti-inflamatória destas moléculas (Kim *et al.*, 2004).

1.4 Actividade nas alterações patológicas da próstata

Uma das actividades terapêuticas mais conhecidas do pólen é a actividade profiláctica e curativa nas desordens da próstata.

Os três problemas mais comuns que podem afectar este órgão são: inflamação (prostatite), inchaço da próstata (hiperplasia prostática benigna/BPH), e cancro. Nem a prostatite nem o inchaço da próstata são reconhecidos como causas directas do desenvolvimento do cancro. No entanto, é possível que os homens que têm uma ou ambas dessas patologias venham a desenvolver também cancro da próstata.

Por volta dos 60 anos, mais de metade dos homens americanos têm sinais microscópicos de BPH, e pelos 70 anos mais de 40% terão hiperplasia detectável por exame físico. Aos 50 anos, um terço tem sinais microscópicos do cancro de próstata, e chegando aos 75 anos, metade a três quartos terão cancro. A maioria destas neoplasias permanecem latentes, não proporcionam nenhum sinal ou sintoma ou têm um crescimento lento, pelo que nunca se transformam numa ameaça grave à saúde (<http://www.cancer.gov>).

A prostatite crónica é uma condição muito comum e mal compreendida com impacto significativo na qualidade de vida dos homens. Devido à falta de eficácia das terapias convencionais, não é surpreendente que os pacientes se tenham orientado com frequência crescente para a fitoterapia e outros tratamentos complementares.

Embora algumas destas terapias possam ser abundantemente usadas, somente poucas foram sujeitas a estudos científicos minuciosos e testadas em ensaios clínicos controlados.

Nestes tratamentos estão incluídos o Zinco, Cernitin Pollen Extract (Becker e Ebeling, 1988; Buck *et al.*, 1990; Macdonald *et al.*, 1999; Wilt *et al.*, 2000; Thompson, 2001), Quercetina, Saw Palmetto (*Serenoa repens*) e acupunctura. As terapias complementares podem certamente ter muito para oferecer aos pacientes, em particular para aqueles com condições crónicas e degenerativas, em que as terapias convencionais não deram bons resultados. No entanto, estas terapias necessitam de ser validadas segundo os mesmos critérios científicos usados para terapias médicas convencionais (Shokes, 2002).

Lin *et al.* (1990) estudaram as alterações morfológicas da hiperplasia prostática canina tratada com Pólen Apícola. Doses de 5-10 g/kg de amostra foram administradas por via oral ao longo de 2 meses a cães idosos com hiperplasia prostática. O tamanho da próstata reduziu igualmente após 1 ou 2 meses. O exame microscópico mostrou uma marcada diminuição no diâmetro da glândula, na altura do tecido epitelial e uma menor introversão/invaginação pipilar do *epitélium* em comparação ao controlo. Nenhum efeito foi observado nos níveis plasmáticos de estradiol ou de testosterona, assim como, nenhuma toxicidade aparente.

Bruneton (1999) relatou no “Compendium of Pharmacognosy” que um extracto de pólen de flora seleccionada foi comercializado como tratamento para a prostatite. O extracto inclui duas fracções bioactivas. Uma é hidrossolúvel e a outra, rica em esteróis, é solúvel em acetona. A fracção hidrossolúvel de AB Cernelle, Vegeholm, Sweden, foi estudada por Zhang *et al.*, (1995) e inibiu, *in vitro*, o crescimento de células tumorais e não tumorais da próstata. A bioactividade descrita foi atribuída ao 2,4 dihydroxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (DIBOA), um ácido hidroxâmico cíclico. Este é um composto activo presente no extracto de pólen, que pode ser o responsável pela diminuição dos sintomas nos pacientes com hiperplasia benigna. Num ensaio com 79 pacientes entre os 62 e 89 anos, afectados por esta doença, o extracto de pólen mostrou um moderado efeito benéfico na redução do volume da próstata e no estímulo a urinar (Yasumoto *et al.*, 1995). O extracto total diminuiu a hipertrofia da próstata em ratos, mas nos seres humanos não foi verificada nenhuma alteração nos níveis de sangue da hormona luteinizante (LH), da hormona folículo-estimulante (FSH), da testosterona ou da dihidro-testosterona. Nos pacientes com adenoma prostático, os maiores benefícios foram a diminuição da noctúria, diminuições importantes do resíduo pós urinar e, no tratamento a longo prazo, diminuição do diâmetro antero-posterior da próstata. O débito urinário não sofreu nenhuma alteração. Os efeitos nos outros sintomas usuais da hipertrofia benigna da próstata não foram significativos (Bruneton, 1999).

A actividade do DIBOA, e de outros análogos estruturais, foi igualmente estudada por Roberts *et al.*, (2000). O DIBOA mostrou capacidade de inibir as células do cancro da próstata que são hormona independentes. Em contraste com os resultados de outros estudos, foi evidenciada uma inibição não somente das células DU-145, mas também uma actividade ainda maior nas células MCF-7 (linha de células do cancro da mama humanas derivada de um paciente com carcinoma mamário metastático) e nas células COS-7.

O extracto de pólen Prostat/Poltit (produzido por Allergon), num estudo duplamente cego com placebo, mostrou-se capaz de melhorar os sintomas em homens com síndrome crónica da dor pélvica e com prostatite não bacteriana crónica (CPPS/CNBP) (Elist, 2005). Num ensaio clínico controlado realizado por Dutkiewicz (1996), 89 pacientes com hiperplasia prostática benigna (BPH) foram tratados com Cernilton durante 4 meses: 51 receberam Cernilton e 38 Tadenan (controlo). Foram descritas melhorias significativas em 78% dos pacientes do grupo tratado com Cernilton, contra 55% dos pacientes tratados com Tadenan. Os sintomas obstrutivos e a irritação responderam melhor à terapia. Nos pacientes tratados com Cernilton houve uma melhoria significativa no fluxo urinário, diminuição da urina residual e do tamanho da próstata. Este estudo mostra que o Cernilton é eficaz para pacientes com BPH.

A fracção hidrossolúvel de outro extracto de pólen de flora seleccionada, *Secale cereale*, (Cernitin T60) foi experimentada em ratos implantados com carcinoma de Lewis (Furusawa *et al.*, 1995). Esta mostrou ser um potente imunoestimulante dos macrófagos sem citotoxicidade *in vitro*. A actividade desta fracção foi explicada por Jatou *et al.*, (1997), que identificaram uma série de glicósidos, em particular os Secalósidos A e B, responsáveis pela acção antitumoral *in vivo*. Não foi detectada toxicidade *in vitro* em várias linhas celulares (L120 leucemia, S180 sarcoma, células KB). Foi também demonstrado que, em presença da inibição da proliferação celular com Ciclofosfamida, inibição da activação dos macrófagos com 2-cloroadenosina ou em ratos imunodeficientes, os efeitos eram abolidos. Face a estes resultados, foi colocada a hipótese de os mecanismos de acção envolverem, possivelmente, a activação do sistema imunitário.

Outro polissacárido (LBPP) foi isolado do pólen de *Brassica napus* L., e testada a sua actividade antitumoral em ratos com Sarcoma 180 e melanoma B16 (Yang *et al.*, 2007). Houve uma diminuição no crescimento dos tumores, um aumento da resposta imune e uma diminuição da anormalidade do sangue periférico (actividade antianémica). Portanto, concluiu-se, como nos estudos precedentes, que a actividade antitumoral é provavelmente devida a uma acção imunomoduladora e antianémica.

O Pólen Apícola de *Brassica campestris* também foi objecto de estudo. A fracção esteróide do seu extracto clorofórmico revelou-se capaz de aumentar a actividade da 3-caspase, com conseqüente apoptose das células PC-3 do cancro da próstata, provavelmente via inibição da expressão da proteína Bcl-2 (Wu e Lou, 2007).

1.5 Actividade na osteoporose

Define-se osteoporose a perda da massa e da arquitectura óssea, que têm como consequência a redução da resistência e o aumento do risco de fracturas. As fracturas, por fragilidade, são características da osteoporose e são, particularmente comuns, na coluna, no quadril e no antebraço. Verifica-se um aumento relativo à idade e têm um grande impacto na saúde da população idosa no mundo ocidental, causando morbidade e mortalidade significativas e custos económicos enormes para os serviços sanitários de toda a União Europeia. As mudanças demográficas e o crescimento da esperança de vida conduzirão a um aumento acentuado no número de indivíduos que irão sofrer destes episódios nas próximas décadas.

O osso é constituído por uma matriz extracelular de colagénio, principalmente colagénio de tipo I, onde o mineral ósseo é depositado sob a forma de sais do cálcio.

O esqueleto contém 99% do cálcio total do organismo e a homeostase está intimamente ligada com o metabolismo ósseo. A concentração sérica do cálcio é regulada principalmente pela hormona paratiroideia e pelo calcitriol, o metabolito biologicamente activo da vitamina D, sintetizado no rim a partir do precursor calcidiol. A hormona paratiroideia afecta a homeostase do cálcio através dos efeitos no osso, no rim e no metabolismo da vitamina D.

Durante a infância e a adolescência a massa do osso continua a aumentar, até um pico máximo na terceira década de vida. Depois do pico máximo ter sido alcançado, há um período de consolidação do osso, em que a integridade do esqueleto é mantida pelo processo de remodelação óssea. Neste período o tecido ósseo mais antigo é removido pelos osteoclastos e substituído por um novo tecido formado pelos osteoblastos.

A idade em que a perda de massa óssea começa não está bem definida, mas parece ocorrer por volta dos 40 anos, tanto nos homens como nas mulheres. Nos homens, a perda calcula-se, em média, entre 0,5 e 1% por ano. Nas mulheres há uma aceleração, até aproximadamente 2% por ano, após a menopausa (com variação entre 1% e 6%).

Depois da menopausa há um aumento do *turnover* ósseo e uma diminuição na formação do osso, que conduzem à perda rápida da massa óssea (Compston, 1994). É estimado que nas mulheres aproximadamente 35% e 50% do osso cortical e esponjoso (trabecular) são perdidos no curso da vida (Mazess, 1982; Riggs *et al.*, 1981).

A osteoporose primária é tradicionalmente classificada em: tipo I, ou osteoporose *post*-menopausa, e tipo II, ou osteoporose senil (Riggs e Melton, 1983). A deficiência de estrogénios é indicada como o principal factor patogénico responsável para a osteoporose tipo I, caracterizada, prevalentemente, pela perda do osso esponjoso. A osteoporose de tipo II, que ocorre em homens e mulheres idosos, resulta da perda de osso cortical e esponjoso. Postula-se que a deficiência da vitamina D e o hiperparatiroidismo secundário são os maiores responsáveis pela perda da massa óssea.

Foram identificados vários factores de risco para esta patologia:

- Factores endógenos, como o sexo feminino, a idade, a estrutura física magra, a raça Asiática ou Caucasiana
- Factores exógenos, como menopausa prematura, hipogonadismo primário ou o secundário no homem, amenorreia primária ou secundária, alimentação deficiente em cálcio, deficiência das vitaminas D, terapia com glucocorticóides.

As intervenções farmacológicas actuais, para a prevenção das fracturas nos pacientes com osteoporose, apostam principalmente na redução do *turnover* e da reabsorção dos ossos. O tratamento da doença é feito com estrogénios, bifosfonatos, cálcio, calcitonina, metabolitos da vitamina D e fluoreto. O cálcio e a vitamina D são usados, igualmente, na prevenção primária e secundária.

Recentemente o grupo de investigação do Laboratory of Endocrinology and Molecular Metabolism da University of Shizuoka, conduziu um extenso trabalho sobre os efeitos do extracto de Pólen Apícola de *Cistus ladaniferus*. Num primeiro estudo, de Yamaguchi *et al.*, (2006) o extracto hidrossolúvel aumentou significativamente a actividade da fosfatase alcalina, enzima que participa na mineralização óssea (Majeska e Wuthier, 1975), e o teor de ADN em tecido diafiseal e metafiseal do fémur de rato cultivados *in vitro*. Estes efeitos foram confirmados *in vivo*, tendo sido também observado um aumento da concentração de cálcio nos dois tecidos. As actividades *in vitro* foram completamente inibidas na presença de cicloheximida, um inibidor da síntese proteica, o que pode indicar que a actividade é mediada pela síntese de alguma proteína.

No estudo sucessivo, Hamamoto *et al.*, (2006a) observaram que o extracto de Pólen Apícola de *Cistus ladaniferus* inibiu, *in vitro*, a reabsorção óssea em tecidos femurais de ratos e também inibiu a formação de células osteoclásticas em culturas de células da medula.

Sempre Hamamoto *et al.*, (2006b) aperceberam-se que a fracção mais activa do extracto era a que tinha massa molecular (MW) inferior a 1000. Esta mostrou aumentar significativamente, *in vitro*, o teor de cálcio nos tecidos diafiseal e metafiseal do fémur de rato e prevenir a formação de células osteoclásticas em culturas de células da medula na presença da hormona paratiroideia. Os efeitos foram inibidos após tratamento da fracção a 80 °C durante 20 ou 60 minutos.

Outros dois modelos da osteoporose, *in vivo*, foram utilizados por Yamaguchi *et al.*, (2007a,b) para avaliar os efeitos do extracto de Pólen Apícola de *Cistus ladaniferus*. Um dos modelos assenta no facto que a diabetes é conhecida como causa da perda de massa óssea e hipercalcémia por perda de cálcio do osso. Neste primeiro estudo, os autores usaram ratos em que induziram a diabetes com administração de estreptozotocina (STZ). A administração do extracto inibiu a perda de peso provocada pela STZ, preveniu parcialmente o aumento dos níveis plasmáticos da glucose, dos triglicéridos e do cálcio, e inibiu a diminuição do fósforo inorgânico plasmático. A nível dos tecidos metafiseal e diafiseal do fémur houve prevenção da diminuição da fosfatase alcalina, da concentração do ADN e da concentração do cálcio (esta pode ser a razão da diminuição dos valores plasmáticos).

No segundo estudo foram utilizados ratos ovariectomizados. O tratamento com extracto de pólen não preveniu o aumento de peso observado no controlo, mas levou a uma restauração das alterações morfológicas do tecido metafiseal, à prevenção da sua desmineralização e da perda de densidade mineral. Houve também um aumento da “polar-strength” diafiseal e metafiseal, assim como, a prevenção da perda de cálcio em ambos os tecidos.

No último trabalho de Yamaguchi *et al.*, (2007c) foi experimentada a actividade da fracção MW 1000 em células osteoblásticas MC3T3-E1, *in vitro*. Observaram que esta fracção possuía um efeito estimulador na proliferação destas células, supostamente actuando como um factor de crescimento, aumentava a concentração de ADN (sugerindo uma actividade mitogénica) e da fosfatase alcalina, provavelmente estimulando a diferenciação e a mineralização dos osteoblastos.

1.6 Anemia e sistema hematopoiético

A anemia é uma doença caracterizada por um baixo número de glóbulos vermelhos. Isto pode ser causado por muitas razões, entre as quais a hemólise, uma dieta pobre em ferro ou a produção de diferentes tipos de hemoglobina. Em função da causa há diferentes tipos de anemias como, a anemia hemolítica, a anemia ferropénica nutritiva, anemia falciforme, entre outras.

Relativamente a esta doença, foram realizadas várias pesquisas com Pólen Apícola e outros produtos da colmeia. Wang *et al.* (1993) avaliaram os efeitos de Pólen Apícola oral em murganhos e ratos com anemia hemolítica. Os resultados mostraram que o Pólen Apícola antagonizou marcadamente a inibição do sistema hemopoiético e reduziu o número de glóbulos brancos no sangue nestes animais.

Haro *et al.* (2000) realizaram um estudo similar em ratos saudáveis e em ratos com anemia ferropénica nutritiva. Estudaram o efeito da adição de Pólen Apícola multiflora numa dieta padrão. O grupo alimentado com Pólen Apícola mostrou um maior aumento de peso, assim como, um aumento dos níveis de hemoglobina e uma diminuição no número de plaquetas, constituindo estes valores um parâmetro hemático que reflecte o estado do ferro no organismo. Concluiu-se que o pólen apícola aumenta a utilização digestiva do ferro, mostrando-se útil neste tipo de doenças.

O Pólen Apícola pode, portanto, ter efeitos benéficos no tratamento da anemia e de doenças relacionadas com o sistema hemopoiético, mas mais estudos são necessários para compreender o mecanismo envolvido e sua contribuição para a actividade terapêutica.

1.7 Actividade antimicrobiana

Embora haja poucos estudos sobre a actividade antimicrobiana do Pólen Apícola, os existentes mostram que o pólen possui estas propriedades contra algumas espécies bacterianas, especialmente patogénicas das plantas. Campos *et al.* (1998) fizeram ensaios preliminares usando diferentes flavonóides isolados a partir de extractos de

Pólen Apícola de *Eucalyptus globulus*, *Ranunculus sardous* e *Ulex europeus*. Observaram que os derivados da herbacetina encontrados no Pólen de *Ranunculus Sardous* e *Ulex europeus* têm actividade antibiótica marcada contra *Pseudomonas aeruginosa*. O pólen de *Eucalyptus globulus*, rico principalmente em derivados da quercetina, não mostrou nenhuma actividade.

Esin *et al.*, (2006) estudaram a actividade anti-bacteriana de Pólen turco em 13 espécies bacterianas patogénicas para as plantas. Os resultados mostraram que o extracto de Pólen tem um efeito inibidor contra todos os micróbios patogénicos, embora com diferenças em função da espécie patogénica em estudo. Os investigadores concluíram então, que este extracto de Pólen Apícola tem potencial para se tornar um agente protector de sementes, porque algumas das bactérias patogénicas são transmitidas através deles.

1.8 Actividade antidiarreica

Outra actividade terapêutica que se pode atribuir ao Pólen Apícola é o seu efeito antidiarreico. Há poucos trabalhos nesta direcção, mas os existentes confirmam esta actividade. Campos (1997) estudou o efeito de extractos de Pólen Apícola de *Eucalyptus globulus* e de *Salix atrocinerea* em ratos Swiss OFFI. Os resultados mostraram que ambas as espécies têm propriedades antidiarreicas. No entanto, têm algumas diferenças; o extracto de Pólen de *Eucalyptus globulus* revelou-se mais eficaz em retardar a diarreia e o de *Salix atrocinerea* reduziu maioritariamente a percentagem de excrementos diarreicos. Ambas as espécies florais reduziram os excrementos diarreicos em cerca de 30%.

Este estudo concluiu que a actividade antidiarreica do Pólen Apícola das espécies testadas pode ser devida aos constituintes polifenólicos, especialmente à quercetina e seus derivados, embora outros compostos possam ter um papel nesta actividade e ser também responsáveis pelas diferenças nos resultados.

1.9 Reações alérgicas e toxicidade

São poucos os estudos de efeitos secundários e de toxicidade do Pólen Apícola, que é normalmente bem tolerado, embora a presença de pólenes e de substâncias alergénicas não possa ser excluída.

Num relatório publicado por Puente *et al.*, (1997) foi relatado um exemplo de uma mulher espanhola de 34 anos, com um historial clínico de rino-conjuntivite sazonal e intolerância ao mel que desenvolveu gastroenterite eosinofílica após ingestão de Pólen Apícola.

Também Greenberger e Flais (2001) estudaram a reacção alérgica num paciente que tinha tido uma reacção anafiláctica após a ingestão do pólen apícola. O paciente teve reacção alérgica com formação de eritema após administração de Pólen Apícola em concentração de 1 mg/mL.

Uma das situações provavelmente mais problemáticas relaciona os possíveis efeitos adversos relacionados com a presença de alcalóides. Boppré *et al.*, (2008) descreveram a presença em Pólen Apícola de *Echium vulgare*, *Echium plantagineum*, *Eupatorium cannabinum*, *Senecio jacobaea*, *Senecio ovatus* de alcalóides pirrolizidínicos e seus derivados, que são conhecidos por terem actividade hepatotóxica, pneumotóxica, genotóxica e carcinogénica (Stegelmeier *et al.*, 1999).

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

O pólen apícola utilizado neste estudo é pólen fresco destinado ao mercado. A colheita foi realizada em Janeiro de 2009 em Lavos (Figueira da Foz, Portugal) e imediatamente congelado e conservado a uma temperatura de -21°C .

A identificação do *taxon* fez-se através da comparação dos perfis obtidos por análise em HPLC/DAD de cargas polínicas separadas em função da cor e de acordo os que fazem parte da nossa base de dados.

Também se procedeu à confirmação destes resultados por observação ao microscópio de suspensões das amostras separadas.

De qualquer forma, a identificação através da comparação dos perfis fenólicos resulta mais fácil e menos sujeita a eventuais erros aleatórios.

2.2 Secagem

A secagem do pólen apícola é um processo de extrema importância pela conservação e portanto pela segurança deste produto que, quando colhido, tem uma humidade relativa (RH%) entre 25-30%. Valores entre 4 e 8% são considerados adequados (Campos *et al.* 2008), não só para evitar o crescimento de bactérias mas também para manter características organolépticas adequadas.

Os métodos de secagem utilizados foram dois:

- Secagem por radiação infravermelha (IV)
- Secagem tradicional

Pela secagem IV utilizou-se como modelo uma balança para medição da humidade Kern MLB 50-3 (figura 2.2.1).



Figura 2.2.1 Moisture analyser Kern MLB 50-3

O princípio de funcionamento deste aparelho baseia-se na medição, por diferença em comparação com a massa inicial, da quantidade de humidade perdida após irradiação controlada com raios IV. Este tipo de radiação, quando absorvida, não tem energia suficiente para promover transições electrónicas (como no caso da radiação UV), mas esta energia é devolvida ao sistema através de fenómenos de oscilação das ligações moleculares que provocam colisões entre as moléculas. Desta forma gera-se calor, que favorece a evaporação da água.

Se, como no caso, se utiliza uma radiação na região do médio infra-vermelho aumentamos ainda a capacidade de secagem, enquanto o comprimento de onda da radiação resulta bem ajustado com as bandas de absorção da água.

Para além disso, sendo uma radiação tem uma capacidade de penetração maior no substrato, e portanto a transferência de calor não está limitada por causa de fenómenos de condução, como acontece na secagem tradicional.

O método desenvolvido prevê a secagem de amostras de 1g de pólen apícola por 10 minutos a uma temperatura de 50°C.

A secagem tradicional foi realizada a uma temperatura de 40°C numa estufa com extracção de ar, pelo tempo necessário para chegar a humidade desejada (4 horas e 45 minutos).

2.3 Determinação da humidade relativa

A avaliação do conteúdo de água em qualquer produto destinado ao consumo humano é de primária importância. Uma das principais razões é que a água disponível no substrato está directamente ligada à possibilidade de desenvolvimento de bactérias e fungos.

Sobre esta matriz, pólen apícola, já existem estudos que demonstram a contaminação por fungos produtores de micotoxinas e ocratoxinas (Gonzalez *et al.*, 2005), e a sua capacidade de funcionar como substrato estimulador da produção de ocratoxina A em *Aspergillus ochraceus* Wilh., constituindo portanto um grande risco para os consumidores (Medina *et al.*, 2004).

Para avaliar a humidade relativa de cada amostra de pólen foram retiradas cinco alíquotas de 1g cada e foram secas a uma temperatura de 50°C até peso constante ao longo de três intervalos de tempo de 45 segundos cada usando uma balança para medição da humidade Kern MLB 50-3

Como método de referência pela validação foi utilizado um dos métodos descritos na FP. VIII.

Transcrevendo o Método aí citado no ponto 2.2.32. PERDA POR SECAGEM vem que:

“A perda por secagem é a perda de massa expressa em percentagem m/m .

Método. Coloque a quantidade indicada da amostra num recipiente tarado e seco previamente nas condições preconizadas para a substância a ensaiar. A secagem da substância faz-se até massa constante ou durante o tempo indicado, segundo um dos seguintes processos. Se a temperatura de secagem é indicada por um só valor em vez de um intervalo, a secagem é efectuada à temperatura prescrito $\pm 2^\circ\text{C}$.”

A alínea que seleccionámos foi a d) uma vez que se aproxima mais do processo que os apicultores utilizam na secagem do produto antes de ser colocado no mercado. Assim nessa alínea vem que:

d) «na estufa com indicação de um intervalo de temperatura»: a secagem é efectuada na estufa no intervalo de temperatura prescrito na monografia.

Como não existe monografia para o pólen apícola serviu-nos de base a temperatura de 40°C uma vez que assim manteríamos estáveis uma percentagem elevada de constituintes.

2.4 Preparação dos extractos

Amostras dos diferentes *taxa*, tanto frescos quanto secos, foram extraídos com uma solução de Etanol/água 1:1, nas concentrações de 20mg/mL e 10mg/mL respectivamente, em ultra-sons por 30 minutos.

O material insolúvel foi separado centrifugando a 6000 rpm por um tempo de 5 minutos e as amostras foram imediatamente analisadas.

Escolheu-se a mistura etanol/água 1:1 porque nos permite extrair uma maior variedade de compostos em comparação com outros solventes e também por ter um baixo impacto ambiental.

2.5 Análise cromatográfica

A análise cromatografica foi realizada por cromatografia de altas prestações (HPLC) acoplada com um detector de fotodiodos (diode array, DAD), segundo o método descrito por Campos *et al.* (1997).

Este tipo de técnica é considerada, já a muitos anos, a de eleição para análise e identificação de flavonoides e ácidos fenólicos (Markham & Bloor, 1998), que se prestam

facilmente à detecção por absorção na região espectral do UV/visível porque possuem vários cromóforos, como se mostra a título de exemplo na figura 2.5.1.

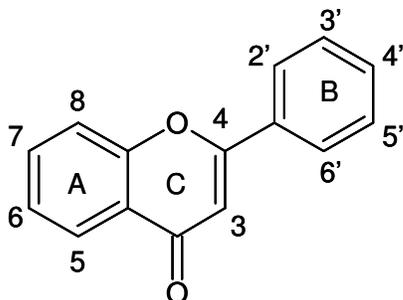


Figura 2.5.1 Cromóforos de uma flavona

Estes cromóforos, também chamados anéis A B e C, são visíveis nos espectros sob a forma de três diferentes bandas (figura 2.5.2). As substituições nos diferentes anéis provocam desvios hipsocrômicos ou batocrômicos, em função do tipo de substituição.

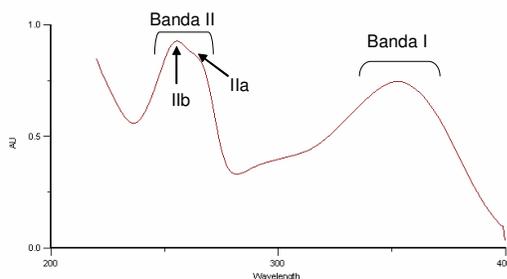


Figura 2.5.2 Espectro de absorção de um flavonoide, com evidenciadas as bandas I, IIa e IIb

Através da leitura desses espectros, em particular observando a posição dos diferentes máximos de absorção e a altura relativa entre eles, podemos obter importantes informações sobre as estruturas em questão.

Para o pólen apícola vários trabalhos publicados utilizam esta técnica na separação e estudo dos perfis polínicos, (Campos 1997a, Campos 1997b, etc) e foi também proposta como método de referência para identificação de espécie floral, na base do facto que o perfil fenólico de um *taxon* resulta independente das condições climáticas e geográficas (Campos 1997b, Campos *et al.* 2008).

Os extractos foram analisados num cromatografo Gilson 170, equipado com uma coluna Waters Spherisorb (4,6x250mm), auto injector e um detector UV-vis diode array (DAD) Gilson 170.

Os volumes de injeção foram 20µL para os extractos de pólen fresco e 10µL para as amostras secas, e a eluição foi realizada utilizando um fluxo de 0,8mL/min com uma temperatura da coluna de 24°C.

Os eluentes usados foram água acidificada a pH \simeq 2,3 com ácido ortofosfórico (A) e acetonitrilo (B) misturados em gradiente linear.

O gradiente utilizado foi o seguinte:

| Tempo | A | B |
|--------------|----------|----------|
| 0 min | 100% | 0% |
| 0-12 min | 91% | 9% |
| 12-20 min | 87% | 13% |
| 20-30 min | 67% | 33% |
| 30-32 min | 67% | 33% |
| 32-42 min | 57% | 43% |
| 42-60 min | 57% | 43% |

Tabela 2.5.1 Gradiente utilizado na análise em HPLC/DAD do perfil fenólico

Por cada pico cromatográfico foi adquirido um espectro entre λ 220 e 400nm e os cromatogramas foram gravados a λ 260 e 340nm.

A identificação das estruturas foi realizada por comparação com a base de dados e aplicando as regras teóricas apresentadas no livro de Campos & Markham (2007).

As áreas de todos os picos cromatográficos foram adquiridas a λ 340nm de forma a poder calcular a concentração dos compostos principais de cada amostra em mg equivalentes de rutina/ mg de pólen seco. Para esta quantificação construiu-se uma curva de calibração da rutina e por regressão linear calculou-se a equação da recta

$$y = 4,2159 \times 10^{-9} A + 0,0062 \quad R^2 = 0.9996$$

2.6 Determinação da actividade anti-radicalar

Para determinar esta actividade utilizou-se uma técnica já amplamente referenciada na bibliografia, que utiliza o radical livre 2,2 difenil-picrilhidrazil (DPPH).

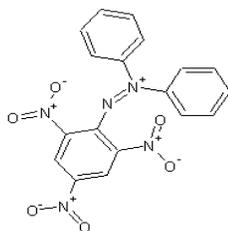


Figura 2.6.1 - Radical 2,2 difenil-picrilhidrazil

Esta técnica *in vitro* é um método espectrofotométrico que se baseia na diminuição da absorção típica das soluções deste radical causada pela redução do mesmo.

Os flavonóides e os ácidos fenólicos são amplamente conhecidos por serem moléculas anti-radicalares (referencias), e no caso do pólen apícola são considerados os maiores, mas não os únicos, contribuintes para esta actividade. Existem várias teorias sobre a forma como os flavonoides possam interagir com as espécies radicalares, mas parece fundamental a existência de dois ou mais grupos funcionais referidos na figura 2.6.2

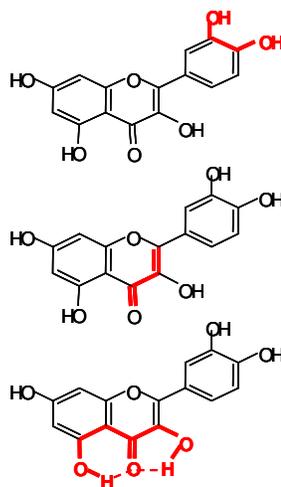


Figura 2.6.2 Grupos estruturais envolvidos na actividade anti-radicalar

O intervalo de linearidade existe por concentrações de DPPH entre 10×10^{-5} M e 10×10^{-4} M. As soluções podem ser conservadas por um máximo de 8 horas e os recipientes utilizados para as conter não podem ser de plástico ou de materiais similares. Acrescentando ao DPPH várias alíquotas de substância anti-radicalar pode-se notar como a banda com λ_{\max} nos 517nm diminui linearmente sem que ocorra alguma alteração. A banda a λ_{\max} 320nm apresenta-se, pelo contrário, alterada na sua forma. A leitura da absorvência portanto é realizada a uma λ_{\max} de 517nm o que não corresponde ao verdadeiro máximo (figura 2.6.3), mas sim ao máximo do pico mais estável ao longo do tempo.

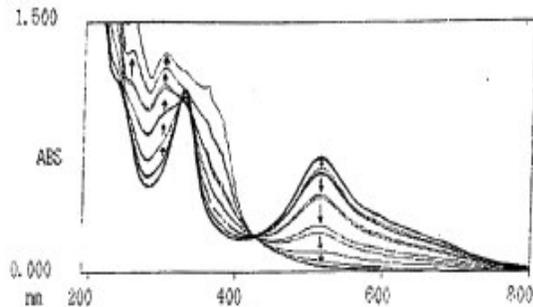


Figura 2.6.3 espectro DPPH adicionado de Aliquotas de quercetina padrão (in Campos, 1997)

A validação do processo é feita por avaliação da capacidade anti-radicalar de um composto de actividade conhecida, frente a uma solução do radical de concentração conhecida. Neste caso o padrão escolhido foi o ácido ascórbico em solução etanólica a 50%, o qual teve uma concentração eficaz a 50% (CE_{50}), nas condições de trabalho, de 2.41 $\mu\text{g/ml}$ de solução de DPPH.

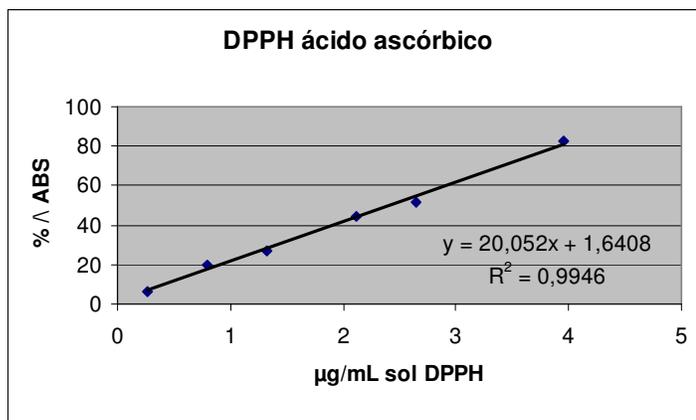
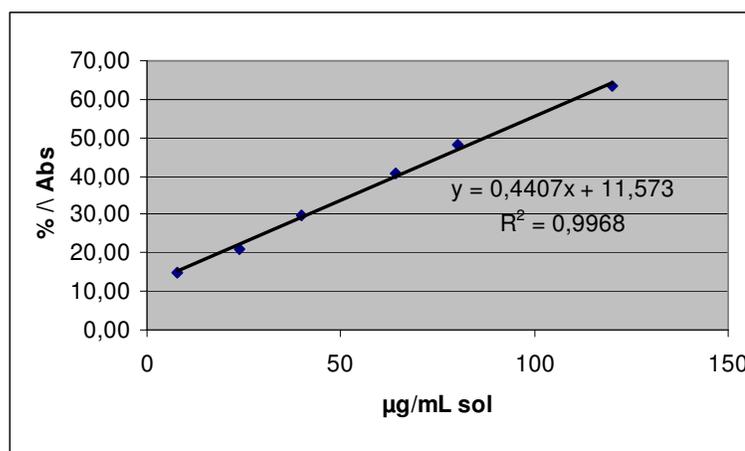


Figura 2.6.4 Resultado do ensaio da actividade anti-radicalar do ácido ascórbico

Esta actividade expressa-se como CE_{50} , ou seja a concentração da solução em análise necessária para diminuir em 50% a absorção da solução de DPPH a λ_{max} 517 nm. No método utilizado no presente estudo 5,91 mg de DPPH, exactamente pesados, foram misturados com 125 ml de etanol puro, com a ajuda de ultra-sons. Uma vez solubilizado o radical são acrescentados mais 125 ml de água, tendo assim um volume final de 250 ml. É absolutamente necessário solubilizar o DPPH em etanol puro e depois acertar o volume final com água, isto porque a solubilidade do radical em soluções aquosas é limitada.

Em tubos de ensaio a 2,5 ml desta solução são adicionados pequenos volumes (1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25 µl) dos extractos de pólen apícola anteriormente homogeneizados. Agitam-se os tubos em *vortex* por alguns segundos e deixa-se reagir por 10 minutos. A absorvência é portanto lida a λ_{\max} 517 nm e calcula-se a variação percentual da em comparação com um branco, constituído por uma solução de DPPH sem acréscimo de extracto algum. No Microsoft Excel por extrapolação gráfica é calculada a recta de regressão entre os pontos e através dela calcula-se a CE_{50} do extracto analisado. Por exemplo,

| Dose extracto (µl) | ABS | µg pólen | µg polen/mL sol | % Δ ABS |
|--------------------|-------|----------|-----------------|---------|
| Branco I | 0,71 | - | - | - |
| 25 | 0,124 | 500 | 200 | 82,50 |
| 20 | 0,182 | 400 | 160 | 74,31 |
| 15 | 0,26 | 300 | 120 | 63,30 |
| 10 | 0,369 | 200 | 80 | 47,92 |
| 8 | 0,42 | 160 | 64 | 40,72 |
| 5 | 0,498 | 100 | 40 | 29,71 |
| 3 | 0,56 | 60 | 24 | 20,96 |
| 1 | 0,603 | 20 | 8 | 14,89 |
| Branco II | 0,707 | - | - | - |



$$CE_{50} = 65,63 \text{ µg polen/mL sol}$$

Figura 2.6.5 Exemplo de calculo da CE_{50}

Foram ensaiados em triplicado as amostras de pólen fresco, seco pela metodologia IV e seco pela metodologia tradicional.

2.7 Análise estatística

Todas as determinações de humidade se realizaram em quintuplicado, os testes da actividade anti-radicalar e as análises em HPLC/DAD foram feitas em triplicado, e os resultados foram sujeitos a estudo estatístico clássico.

Os resultados dos ensaios do DPPH pelas diferentes metodologias de secagem foram comparados entre eles através de T-test ($p \leq 0,05$) e a validação do método de determinação da humidade relativa por IV foi realizada face ao método de referência através de um teste Z-score.

3. Resultados e discussão

3.1 Determinação da origem floral

Como já foi referido anteriormente a determinação dos *taxa* presentes no pólen utilizado neste trabalho foi realizada por análise em HPLC/DAD dos extractos etanólicos, comparando sucessivamente os perfis fenólicos obtidos com os existentes na nossa base de dados.

A separação das cargas em função da cor levou à formação de dois grupos distintos; um primeiro com cargas de cor acastanhada e um segundo com cargas de cor laranja.

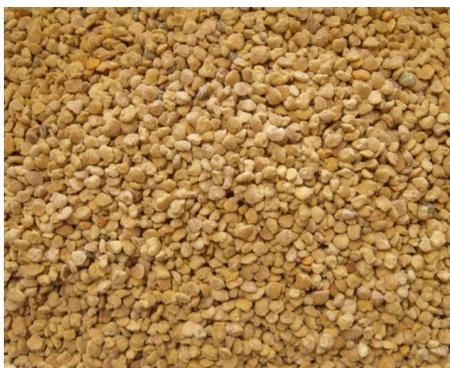


Figura 3.1.1 Aspecto das cargas polínicas de *Eucalyptus globulus*

A análise dos extractos realizados a partir destas amostras mostrou perfis completamente distintos, que pertencem às espécies *Eucalyptus globulus* (figura 3.1.2) e *Salix atrocinerea* (figura 3.1.3). Os resultados foram confirmados por observação ao microscópio Figura 3.1.1.

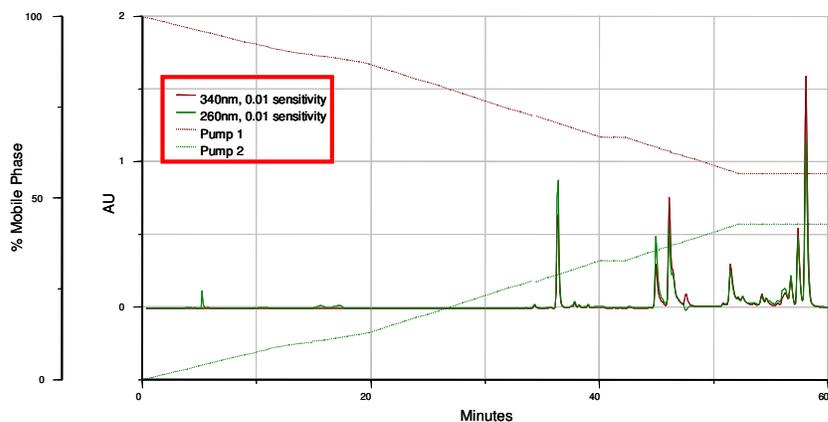


Figura 3.1.2 Perfil de *Eucalyptus globulus*

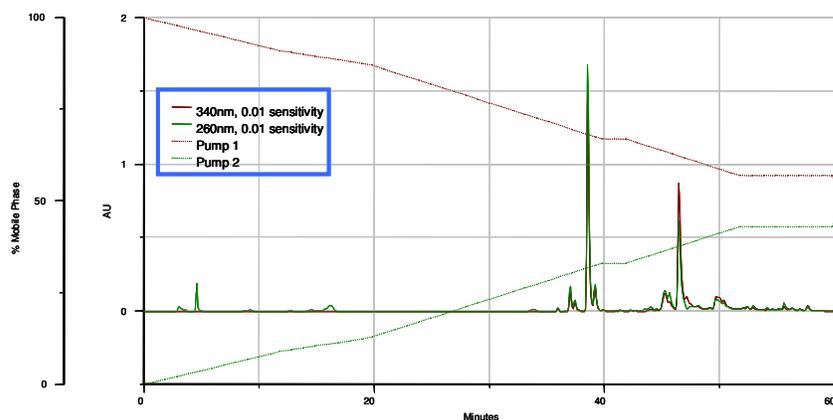


Figura 3.1.3 Perfil de *Salix atrocinerrea*

3.2 Determinação da humidade relativa

A avaliação da humidade relativa realizou-se com o Moisture Analyzer Kern MLB 50-3. Os resultados obtidos não concordam com os da bibliografia, enquanto as amostras mesmo pertencendo a espécies diferentes mostraram os mesmos valores de humidade relativa, $24,73 \pm 0,21\%$ para o pólen de *Eucalyptus globulus* e $24,77 \pm 0,35\%$ para o pólen de *Salix atrocinerrea*.

Este facto pode ser devido a uma errada manipulação pelo apicultor ou no momento da colheita ou na conservação do produto, que provocou uma distribuição uniforme do conteúdo de água. Provavelmente os resultados existentes na bibliografia referem-se a pólenes colhidos e conservados separadamente, evitando assim a difusão da humidade até ao equilíbrio, o que não é normalmente feito no caso do pólen comercial, Sendo o método muito rápido (≈ 15 minutos) e potencialmente menos caro que o método oficial sentimos a necessidade de o avaliar em termos de reprodutibilidade e precisão, validando-o em comparação com um dos métodos da Farmacopeia Portuguesa VIII. A avaliação da reprodutibilidade foi realizada quantificando a humidade relativa de 5 diferentes amostras de pólen disponíveis no nosso laboratório em quintuplicado, em dias diferentes e por operadores diferentes. Os resultados mostrados na tabela 3.2.1 mostram a reprodutibilidade do método, tendo valores de RDS% absolutamente aceitáveis vista a heterogeneidade da matéria-prima.

| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 4 | Amostra 5 |
|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 11,79 | 27,82 | 26,1 | 2,26 | 22,34 |
| | 11,48 | 27,79 | 26,1 | 1,3 | 23,94 |
| | 11,08 | 27,88 | 25,88 | 2,19 | 22,05 |
| | 11,49 | 27,48 | 25,09 | 2,48 | 22,69 |
| | 11,61 | 27,86 | 25,86 | 2,08 | 22,79 |
| SD | 0,26 | 0,16 | 0,42 | 0,17 | 0,34 |
| Media | 11,49 | 27,77 | 25,81 | 2,25 | 22,47 |
| RDS% | 2,27 | 0,59 | 1,61 | 7,49 | 1,51 |

Tabela 3.2.1 Avaliação da reprodutibilidade. Dados expressos como RH%

É também importante notar uma tendência do RSD% a diminuir com valores de humidade relativa cada vez mais baixos, o que indica uma progressiva perda de reprodutibilidade.

Procedeu-se então a validação do “Método de IV” face ao método oficial.

Escolheu-se uma das amostras (amostra 5) e repetiu-se a secagem, mas desta vez seguindo as indicações da Farmacopeia.

| | Determinação IV | Determinação FU VIII |
|--------------|------------------------|-----------------------------|
| | 22,34 | 22,2 |
| | 23,94 | 22,14 |
| | 22,05 | 22,2 |
| | 22,69 | 22,15 |
| | 22,79 | 21,89 |
| Media | 22,762 | 22,116 |
| SD | 0,721 | 0,129 |

Tabela 3.2.2 Resultados da determinação da RH% na amostra 5 segundo os dois métodos

Foi então utilizado o Test Z-score, assumindo o valor obtido através da secagem segundo o método da Farmacopeia como verdadeiro. Na realização do teste admitimos um erro de $\pm 0,2\%$, que representa a incerteza da medida indicada nas características do Kern MLB 50-3.

| | Secagem IR | Secagem FU VIII |
|------------------------------|--------------------|-----------------|
| Mean | 22,762 | 22,116 |
| Known Variance | 0,51967 | 0,01673 |
| Observations | 5 | 5 |
| Hypothesized Mean Difference | 0,2 | |
| z | 1,361681309 | |
| P(Z<=z) one-tail | 0,0866493 | |
| z Critical one-tail | 1,644853476 | |
| P(Z<=z) two-tail | 0,1732986 | |
| z Critical two-tail | 1,959962787 | |

Tabela 3.2.3 Resultados do test Z-score

Sendo que o z calculado é inferior ao z tabelado podemos afirmar que o método de determinação da humidade por IV realizado nas condições descritas previamente é equivalente ao método da Farmacopeia escolhido.

Em conclusão o método desenvolvido mostrou-se reprodutível e preciso em comparação com a metodologia oficial escolhida, para além de ser notavelmente mais rápido e portanto menos dispendioso do ponto de vista energético.

3.3 Efeitos da secagem no perfil fenólico

Pólen apícola é uma matriz particularmente rica em compostos fenólicos, os quais são considerados os maiores responsáveis das várias actividades biológicas atribuídas a este produto, sobretudo pela actividade anti-radicalar (Leja *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 1994, Campos *et al.*, 2003; Mărghitaş *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2006).

Na figura 3.3.1 podemos ver o perfil completo de uma amostra de *Eucalyptus globulus* fresco e na tabela 3.3.1 especificados os compostos maioritários com os respectivos espectros e estruturas.

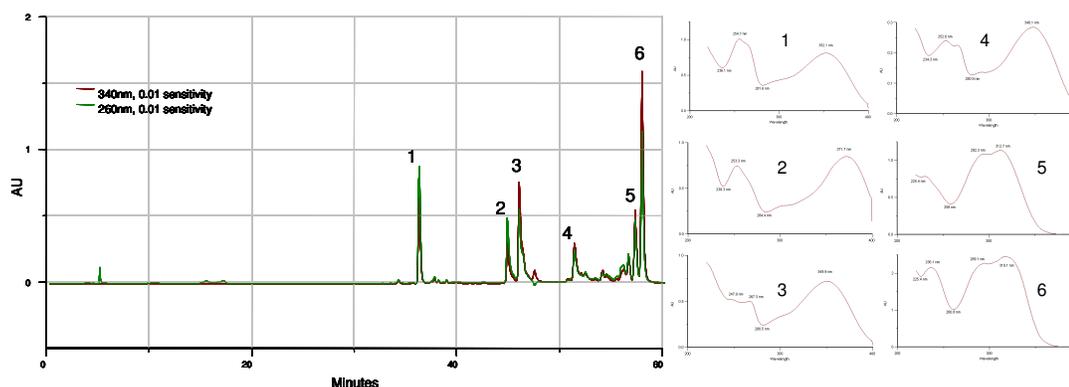


Figura 3.3.1 Perfil de HPLC/DAD dos compostos fenólicos e polifenólicos do pólen apícola de *Eucalyptus globulus* fresco

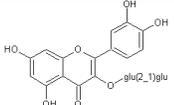
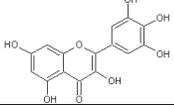
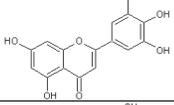
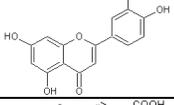
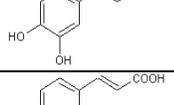
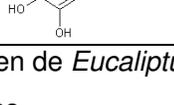
| | Tempo de retenção (minutos) | Composto | Estrutura |
|---|-----------------------------|---------------------------|---|
| 1 | 35,98 | Quercetina 3-O-soforósido |  |
| 2 | 44,61 | Miricetina |  |
| 3 | 45,71 | Tricetina |  |
| 4 | 51,21 | Luteolina |  |
| 5 | 57,11 | Derivado do acido cafeico |  |
| 6 | 57,76 | Derivado do acido cafeico |  |

Tabela 3.3.1 Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Eucalyptus globulus* com relativos tempos de retenção e estruturas

Comparando agora os cromatogramas obtidos a partir dos extractos de pólen de *Eucalyptus* fresco, seco por IV e seco pelo método tradicional podemos verificar que não qualquer alteração no perfil cromatográfico (figura 3.3.2).

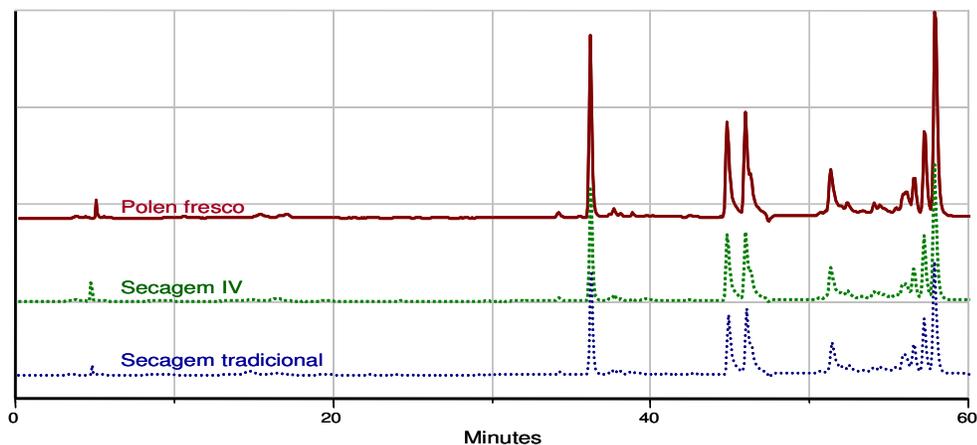


Figura 3.3.2 Comparação dos cromatogramas de pólen apícola de *Eucalyptus globulus* fresco, seco por IV e pelo método tradicional

Verificou-se também que os espectros UV correspondentes aos constituintes não sofreram qualquer tipo de alteração (dados não apresentados).

Passamos então a verificar se houve alguma alteração do ponto de vista quantitativo. Para este objectivo escolhemos quantificar a quercetina 3-O-soforósido como marcador.

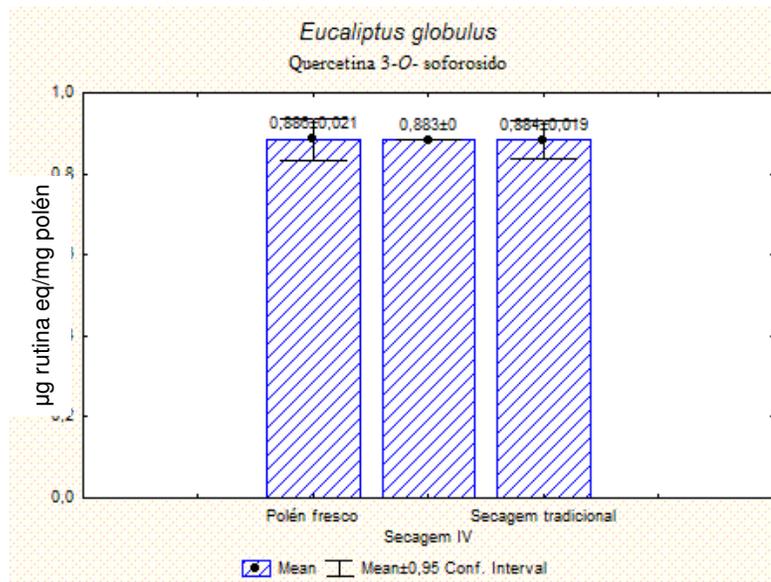


Figura 3.3.3 Resultados da quantificação de quercetina 3-O-soforósido

Observando o gráfico é claro como nem a secagem IV nem a tradicional provocaram variação alguma no conteúdo do composto quantificado, como de resto se esperava dada a perfeita sobreponibilidade dos cromatogramas.

Passando agora ao pólen de *Salix atrocinerea* na figura 3.3.4 podemos ver o perfil completo de uma amostra pólen fresco e na tabela 3.3.2 especificados os compostos maioritários com os relativos espectros e estruturas, quando conhecidas.

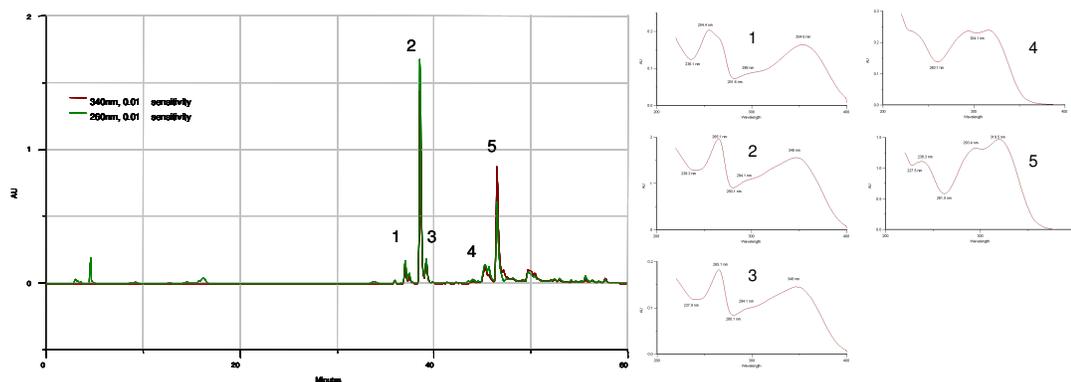


Figura 3.3.4 - Perfil HPLC/DAD dos compostos fenólicos e polifenólicos do pólen apícola de *Salix atrocinerea* fresco

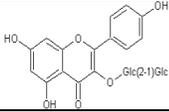
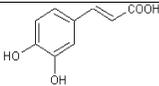
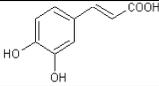
| | Tempo de retenção (minutos) | Composto | Estrutura |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| 1 | 37,04 | Quercitina – 3-O- derivado | |
| 2 | 38,62 | Caempferol-3-O-neohesperidósido) |  |
| 3 | 39,26 | Caempferol-3-O-derivado | |
| 4 | 45,31 | Derivado do acido cafeíco |  |
| 5 | 46,52 | Derivado do acido cafeíco |  |

Tabela 3.3.2 Resumo dos principais compostos encontrados em pólen de *Salix atrocinerea* com relativos tempos de retenção e estruturas

Sobrepondo os cromatogramas obtidos a partir dos extractos de pólen de *Salix atrocinerea* fresco, seco por IV e seco pelo método tradicional podemos verificar que, como no caso precedente, são perfeitamente reproduzíveis (figura 3.3.5).

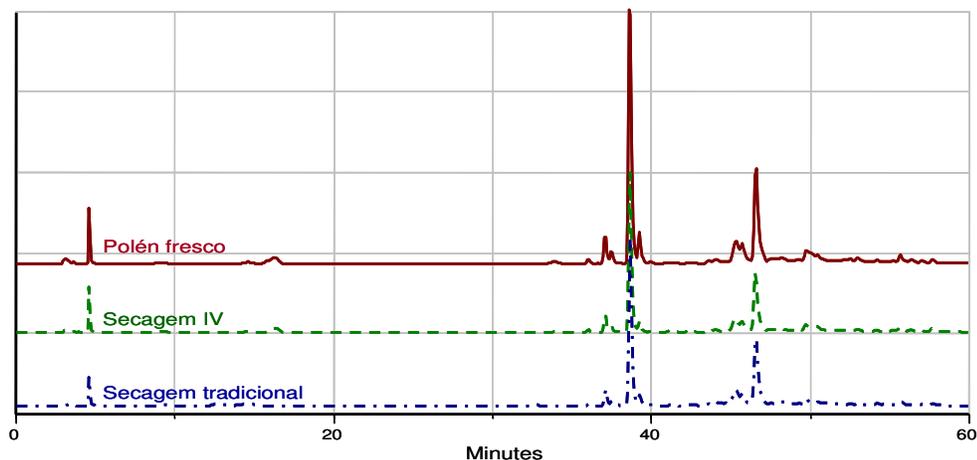


Figura 3.3.5 Comparação dos cromatogramas de pólen de *Salix atrocinerea* fresco, seco por IV e pelo método tradicional

Os espectros UV dos diferentes constituintes mantiveram-se inalterados (dados não mostrados).

A verificação de eventuais alterações quantitativas devidas aos processos de secagem, realizou-se quantificando o Caempferol-3-O-neohesperidósido, que é o composto maioritário no extracto etanólico de pólen de *Salix atrocinerea*.

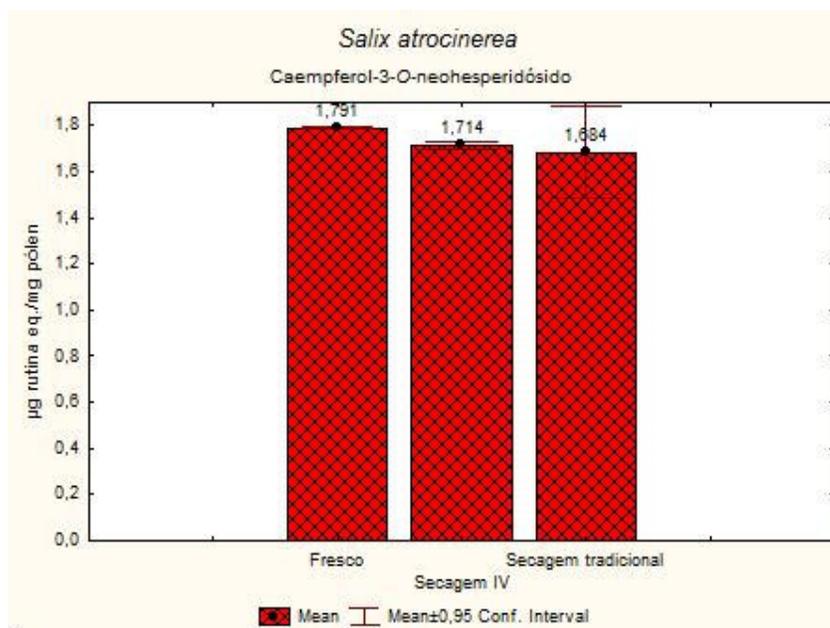


Figura 3.3.6 Resultados da quantificação de Caempferol-3-O-neohesperidósido

Analisando os resultados verifica-se alguma diferença na concentração deste composto, mas que não é significativa do ponto de vista quantitativo ($0,1\mu\text{g}/\text{mg}$ de pólen). Para além disso a diferença maior existe entre o pólen fresco e o seco tradicionalmente, mas a média deste último é “falseada” por um valor aberrante.

Concluindo podemos afirmar que a secagem com IV não provocou alterações no perfil fenólico dos *taxa* estudados, o que também se observa na secagem tradicional.

Contudo o método por IV destaca-se pela rapidez com que é conduzida a secagem, que se pode traduzir num menor consumo de recursos energéticos e numa melhor rentabilização do tempo, com um conseqüente aumento da produtividade quer analítica quer comercial.

3.4 Efeitos da secagem na actividade anti-radicalar

As evidências científicas acerca da actividade anti-radicalar do pólen apícola são várias, e na bibliografia está amplamente descrita para um grande número de espécies florais (Silva *et al.*, 2006; Leja *et al.*, 2007; LeBlanc *et al.*, 2009; Šaric *et al.*, 2009; Mărghitaş *et al.*, 2009), pois é *espécie-específica*, independente da origem geográfica e das condições climáticas, e diminui ao aumentar o tempo de conservação (Campos *et al.*, 2003, Campos, 1997a).

Mesmo que os compostos fenólicos, dos quais este produto é rico, sejam considerados como os principais contribuintes é provável que existam outros compostos que participam para a actividade anti-radicalar (Campos *et al.*, 2000).

Sendo o teste do DPPH um método simples, rápido e extensamente referenciado na bibliografia, foi escolhido para a avaliação desta actividade.

Inicialmente tentamos utilizar amostras constituídas por uma única carga polínica ($\approx 10\text{mg}$), de forma a diminuir ao máximo o consumo de matéria-prima e de solventes, mas os resultados não foram reprodutíveis (Figura 3.4.1).

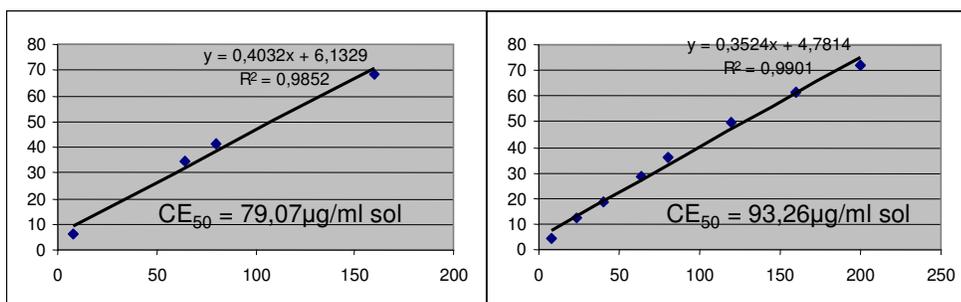


Figura 3.4.1 Resultado do teste do DPPH em duas amostras constituídas por uma única carga polínica de *Eucalyptus globulus*

Mesmo ao aumentar os tamanhos das amostras (mantendo a concentração invariada), para evitar pequenas contaminações devidas à desagregação de parte das cargas polínicas provocada pelo manuseamento, os resultados não se mostraram melhores (figura 3.4.2).

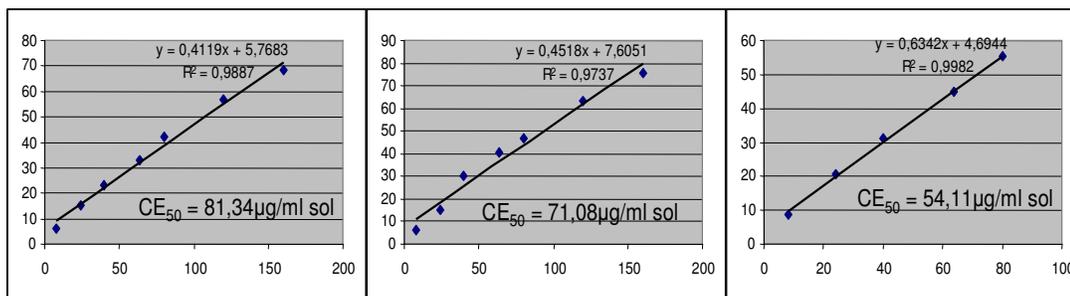


Figura 3.4.2 Resultado do teste do DPPH em três amostras preparadas com 0,5g de pólen apícola de *Eucalyptus globulus*

Evidenciou-se, então, que a centrifugação das amostras utilizadas nos ensaios provocava grandes alterações nos resultados o que conduziu a um novo passo na metodologia e

que consistiu em suspender as amostras de pólen apícola antes de colocá-las a reagir com o radical DPPH.

Numa primeira análise dos resultados obtidos com o pólen apícola de *Eucalyptus globulus* (figura 3.4.3) nota-se que a CE_{50} do pólen fresco é muito superior ao referido na bibliografia: $64,47 \pm 1,29 \mu\text{g/ml}$ contra $40 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ (Campos *et al.*, 2003). Este fenómeno pode ser devido ao mau estado de conservação ou a algum erro na fase da colheita/produção. Daqui a utilidade de avaliar a actividade anti-radicalar de amostras comerciais (Campos *et al.*, 2008).

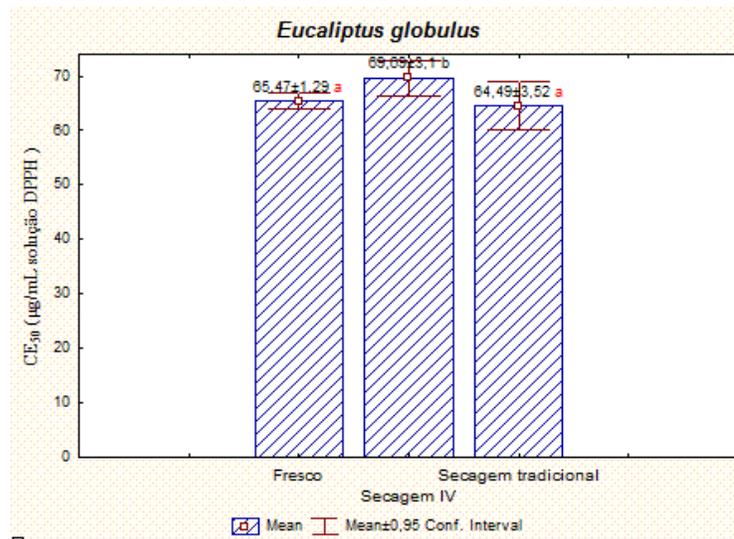


Figura 3.4.3 Resultados do ensaio da actividade anti-radicalar para o pólen apícola fresco, seco pelo método IV e seco pelo método tradicional de *Eucalyptus globulus* expressos em $CE_{50} \pm SD$. a, b grupos diferentes.

As amostras secas pelas duas metodologias proporcionaram resultados muito semelhantes aos do pólen apícola fresco. Contudo, após termos aplicado o teste T podemos ver como na realidade o pólen seco por IV perdeu actividade, mesmo sendo a diferença mínima, em comparação ao pólen fresco. Também a sua capacidade de captar o radical DPPH resulta inferior ao método de secagem tradicional, que é comparável com o fresco.

Analisando agora os resultados proporcionados pelo pólen de *Salix atrocinerea* (figura 3.4.4), notamos em primeiro lugar que a actividade anti-radicalar resulta notavelmente superior aos referidos em bibliografia: $102,33 \pm 3,96 \mu\text{g/ml}$ contra $150 \pm 4,7 \mu\text{g/ml}$ (Campos *et al.*, 2003).

Se juntamos este resultados com a presença de uma proporção relativa entre o composto maioritário e os derivados do ácido cafeico não própria da variedade de *Salix atrocinerea*

descrita na nossa base de dados, e também não devida a contaminação por pólen de *Eucalyptus globulus*, podemos postular que podemos ter em estudo uma nova variedade de *Salix atrocinerea* ainda não descrita (Gomes *et al.*, 2009).

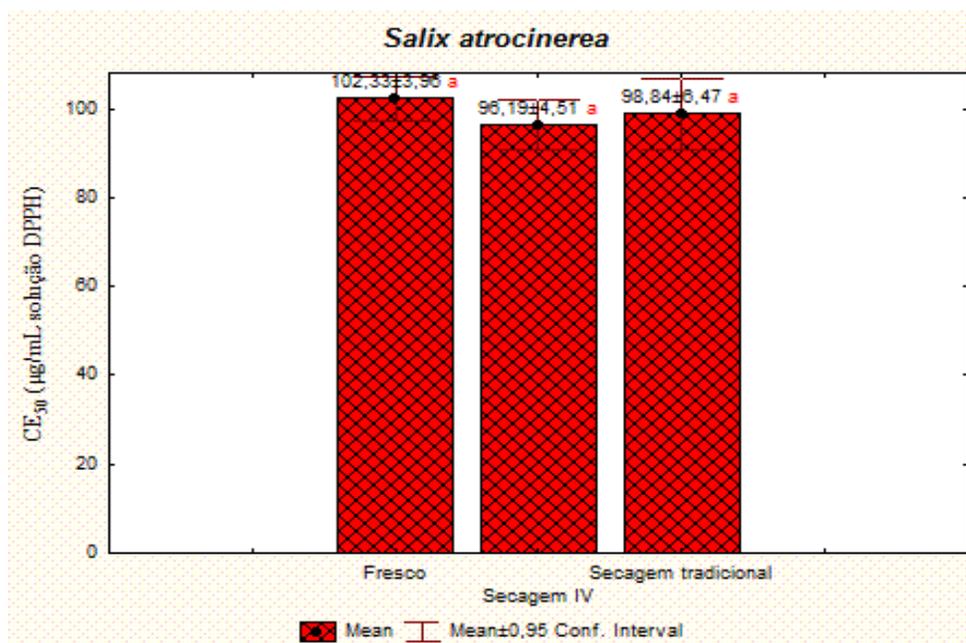


Figura 3.4.4 Resultados do ensaio da actividade anti-radical para o pólen apícola fresco, seco pelo método IV e seco pelo método tradicional de *Salix atrocinerea* expressos em $CE_{50} \pm SD$. a grupo.

As amostras secas tiveram uma maior actividade anti-radical em comparação ao pólen fresco, mas esta diferença não resulta estatisticamente significativa. De facto, pelo teste T todas as amostras são iguais e portanto a secagem tanto por IV quanto a tradicional não provocou alteração da actividade do pólen apícola de *Salix atrocinerea*.

Em conclusão podemos dizer que, para os dois taxa em estudo, a secagem tradicional não se mostrou prejudicial do ponto de vista da bioactividade como estávamos a espera. A secagem com IV levou a uma perda muito limitada da actividade no pólen de *Eucalyptus globulus*, fenómeno que não se repetiu no de *Salix atrocinerea*.

Contudo continua a haver uma vantagem do ponto de vista da velocidade de exsiccção e da contenção dos custos desta operação, sem perda da actividade anti-radicalar.

4. Conclusões

Como já discutido na introdução o pólen apícola é um produto de particular interesse do ponto de vista alimentar, isto pelo seu conteúdo bem equilibrado de macronutrientes (Orzaez-Villanueva *et al.*, 2002; Peris, 1984), quais açúcares, lipídios e proteínas, e também de micronutrientes, como por exemplo vitaminas e minerais (Herbert *et al.*, 1987; Hagedorn e Hamburguer, 1967).

A este produto da colmeia são também atribuídas várias actividades biológicas, entre as muitas actividades anti-radicalar, nas alterações patológicas da próstata e na osteoporose (Campos *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006; Leja *et al.*, 2007; LeBlanc *et al.*, 2009; Šarić *et al.*, 2009; Mărghitaș *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 1995; Elist, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2006;

Face a estas considerações é evidente que haja a necessidade de ulteriores pesquisas para chegar à padronização deste produto, que deverá ser sujeito a um rigoroso controlo de qualidade, que seja visando uma aplicação dietética quer seja destinada como matéria-prima bioactiva para possíveis aplicações terapêuticas (Campos, 1997) nomeadamente a incluir em “Medicamentos à Base de Plantas”.

Neste sentido enquadra-se a necessidade de desenvolver uma mais rápida metodologia de determinação da humidade, tanto para controlar este importante parâmetro tanto para poder padronizar a matéria-prima em futuros estudos de bioactividade.

A luz das performances obtidas pelo analisador de humidade Kern MLB 50-3 em termos de reprodutibilidade e de precisão podemos concluir que o objectivo foi alcançado. Este, nas condições descritas e para o material utilizado, mostrou-se equivalente ao método descrito na alinha d) do ponto 2.2.32. PERDA POR SECAGEM da FP VIII (Teste Z-score), e restituiu valores de RDS% absolutamente aceitáveis quando testado com amostras com diferente humidade relativa.

| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 4 | Amostra 5 |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Desvio padrão | 0,26 | 0,16 | 0,42 | 0,17 | 0,34 |
| Media | 11,49 | 27,77 | 25,81 | 2,25 | 22,47 |
| RDS% | 2,27 | 0,59 | 1,61 | 7,49 | 1,51 |

Tabela 4.1 Resumo da avaliação da reprodutibilidade da determinação da humidade relativa por IV. Dados expressos como RH%

Para além de ser equivalente o método mostra-se enormemente mais rápido, e portanto menos dispendioso do ponto de vista energético.

Com base do princípio do funcionamento deste analisador de humidade decidimos também otimizar uma técnica de secagem com radiação IV pelo pólen apícola, e avaliá-la face a uma “simulação” do método tradicional que consta de uma secagem por convecção.

A técnica foi otimizada ao longo do tempo, até chegar as condições utilizadas no estudo onde se mostrou basicamente equivalente a técnica tradicional.

Este resultado não foi exactamente o esperado; isto não pelo resultado da secagem IV, mas porque ao contrário do esperado a secagem tradicional não proporcionou alterações nos parâmetros estudados.

A secagem por IV não produziu nenhuma alteração no perfil fenólico dos dois *taxon* em estudo e na actividade anti-radicalar de *Salix atrocinerea*. No entanto relevou-se uma diminuição, mesmo que muito pequena, da actividade do pólen de *Eucalyptus globulus*. O facto de esta variação ser tão limitada e não ser acompanhada por nenhuma alteração do perfil fenólico, deixa-nos muitas dúvidas sobre o seu valor. Contudo mais são necessários para eliminar esta incerteza.

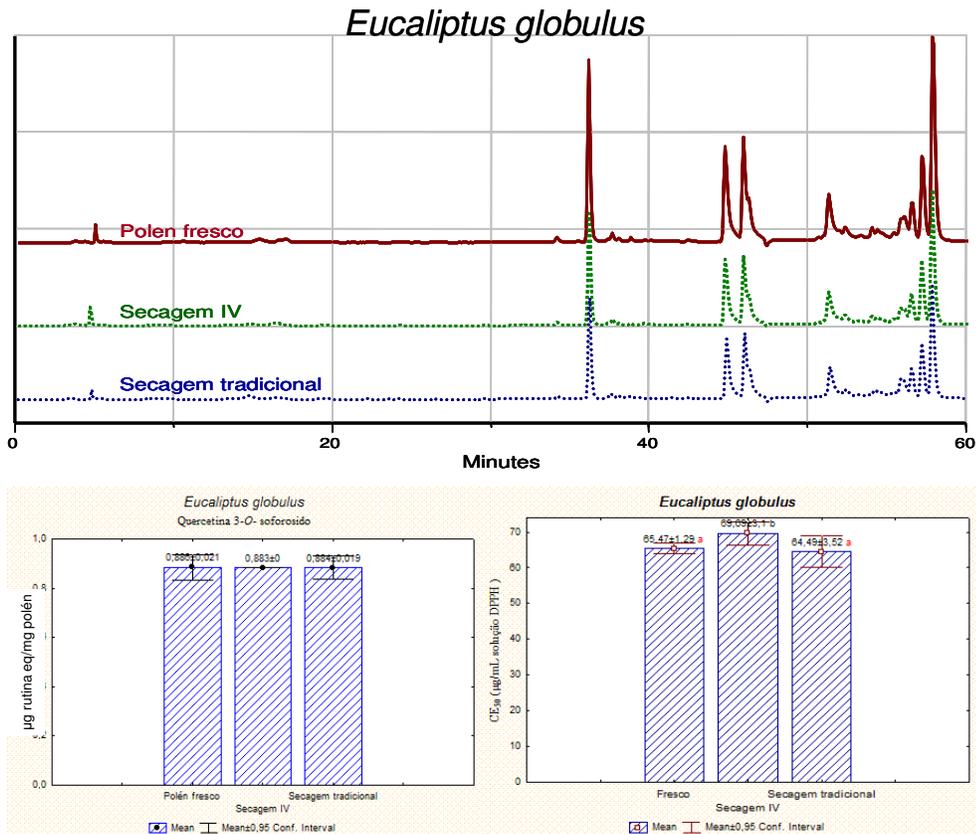


Figura 4.1 Resumo efeitos da secagem no perfil fenólico e na actividade anti-radicalar de *Eucalyptus globulus*

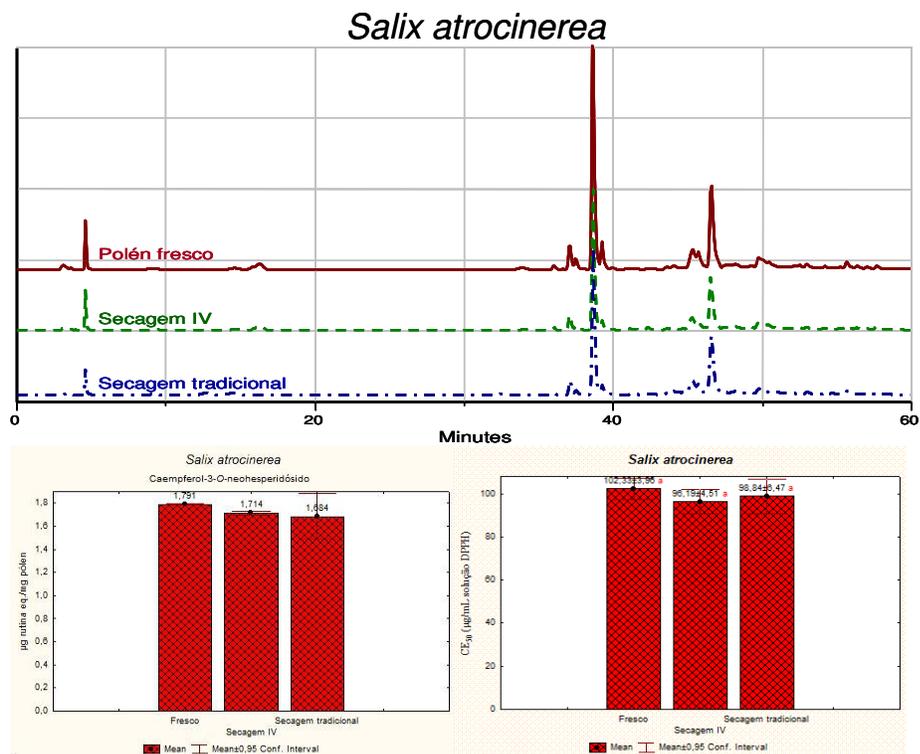


Figura 4.2 Resumo efeitos da secagem no perfil fenólico e na actividade anti-radicalar de *Salix atrocinerea*

Em conclusão podemos dizer que a secagem por IV não produz “relevantes” alterações na actividade anti-radicalar nas condições utilizadas no estudo, e portanto pode ser aplicada no tratamento desta matéria prima em substituição do método tradicional, muito mais demorado e caro.

Outro facto importante surgiu com este estudo.

Mais uma vez foi estabelecido que não só os compostos fenólicos concorrem pela actividade anti-radicalar. Isto é demonstrado pelas incidência nos resultados dos testes do DPPH da centrifugação, o que nos sugere que haja algum composto insolúvel no nosso solvente a concorrer pela actividade. Contudo analisando os resultados de Campos (1997), onde foram avaliadas todas as fracções obtidas a partir da extracção do pólen, não conseguimos justificar esta actividade. Podemos então só postular que haja algum composto que esteja ligado a superfície das estruturas celulares do pólen que participe na actividade.

Concluindo mais estudos são precisos para determinar a real aplicabilidade na industria desta técnica de secagem com radiação IV avaliando possíveis alterações de outros compostos existentes no pólen apícola, em particular os de interesse alimentar.

Também novos estudos deverão ser feito de forma a identificar e isolar os compostos que apresentam actividade anti-radicalar, para além dos já conhecidos, porque esta actividade está na base de outras como actividade anti-inflamatoria, anti-aterosclerotica e antitumoral.

5. Referências

Almaraz-Abarca N, Campos MG, Ávila-Reyes JA, Naranjo-Jiménez N, Herrera-Corral J, Gonzales-Valdez LS Variability of antioxidant activity among Honeybee-collected Pollen of different botanical origin. *Interciencia* 2004 **29**: 574-578

Almaraz-Abarca N, Campos M.G, Delgado-Alvarado E.A, Ávila-Reyes J.A, Herrera-Corral J, González-Valdez G.S, Naranjo-Jiménez N, Frigerio C, Tomatas A.F, Almeida A.J, Vieira A, Uribe-Soto J.N Pollen Flavonoid/Phenolic Acid Composition of Four Species of Cactaceae and its Taxonomic Significance. *Am J of AgricBiol Scien* 2008 **3** (3): 534-543

Anan'eva TV, Dvoretzkii AI Effect of beta-carotene oil and bee pollen on ion transport in rat brain slices following radiation-chemical exposure. *Radiats Biol Radioecol* 1999 **39** (2-3): 341-4

Becker H and Ebeling L Conservative treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) with Cernilton® – Results of a placebo-controlled double-blind study. *Urologe* **28**: 301-306

Bevzo VV, Grygor'eva, NP Effect of bee pollen extract on glutathione system activity in mice liver under X-ray irradiation. *Ukr Biokhim Zh* 1997 **69** (4): 115-7

Boppré M, Colegate SM, Edgar JA, Fischer OW Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in Pollen and Drying-Related Implications for Commercial Processing of Bee Pollen. *J Agric Food Chem* 2008 **56** (14) 5662-72

Bruneton J Pharmacognosie – Phytochimie & Plantes Medicinales. Ed. Tec & Doc. – Lavoisier 3^aed. Revise. 758 1999

Buck AC, Cox R, Rees RW, Ebeling L, John A Treatment of outflow tract obstruction due to benign prostatic hyperplasia with pollen extract, Cernilton. A double-blind, placebo-controlled study. *Brit J Urology* 1990 **66**: 398-404

Campos MG, Cunha AP, Navarro MC, Utrilla MP Free radical scavenger activity of Bee-pollen, *Bull Groupe Polyphenols* 1994 **17**: 415-417

Campos MG “Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas”, [tese] Coimbra Faculdade de farmácia da Universidade de Coimbra; 1997

Campos MG, Markham K, Cunha A Quality assessment of beepollens using flavonoid / phenolic profiles *Bull Groupe Polyphenols* 1996 18: 54–55

Campos MG, Markham KR, Mitchell KA, Cunha A P An approach to the characterization of bee pollens via their Flavonoid/Phenolic profiles *Phyt anal* 1997 **8** 181-185

Campos MG, Cunha AP, Markham KR Inhibition of Virulence of *Pseudomonas auruginosa* cultures, by flavonoids isolated from bee-pollen: possible structure-activity relationships communication, XIXth international conference on polyphenols, Lille 1998

Campos MG, Webby R, Kevin A, Coleta M, Markham K, Cunha AP Free-radical scavenging properties of bee-pollens – the non-involvement of flavonoids? *Bull Groupe Polyphenols* 2000 **20** (2) 347-348

Campos MG, Webby RF, Markham KR, Mitchell KA, Cunha A P Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee-pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J Agric Food Chem* 2003 **51**: 742-745

Campos M G, Bogdanov S, Almeida-Muradian L B, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C & Ferreira F Pollen composition and standardisation of analytical methods, *J of Apic Res* 2008 47, 154-161

Choi E Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Pine (*Pinus densiflora*) Pollen Extract. *Phytother Res* 2007 **21**, 471–475

Compston JE Hormone replacement therapy for osteoporosis: clinical and pathophysiological aspects. *Repro Med Rev* 1994 **3**: 209-24

Debry G Evolution des concepts en nutrition humain. *Cah Nutr Diét* 1991 **26** (6) 435-442

Dillon J, e Louveaux J (1987) Pollen et gelée royale. *Cah Nutr Diét* 1987 **23**:6 458-464

Dudov IA, Morenets AA, Artiukh VP, Starodub NF Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load. *Ukr Biokhim Zh* 1994 **66**(6): 91-93

Dudov IA, Starodub NF Antioxidant system of rat erythrocytes under conditions of prolonged intake honeybee flower pollen load. *Ukr Biokhim Zh* 1994 **66**(6): 94-96

Dutkiewicz S Usefulness of Cernilton in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Int Urol Nephrol* 1996 **28**: 49-53

Elist J Effects of pollen extract preparation Prostat/Polit on lower urinary tract symptoms in patient with Chronic Nonbacterial Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *Urology* 2005 **6**(1): 60-63

Esin B, Hüseyin B, Musa Ö Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *J of Food Eng* 2006 **77**: 992–996

Féher J, Csmós, Vereckei A Clinical importance of free radical reactions and their role in the pathogenesis of various human diseases. in *Free Radical Reactions in Medicine* 1986 48-147

Furusawa E, Chou SC, Hirazumi A, Melera A Antitumour potential of pollen extract on lewis lung carcinoma implanted intraperitoneally in syngeneic mice. *Phytother Res* 1995 **9**, 255 – 259

Nelson G. M. Gomes, Christian Frigerio, Maria G. Campos, Adrien F. M. Kremer Phenolic/flavonoidic profile and radical scavenging activity of Honeybee-Collected Pollen from *Salix atrocinerea* Brot. Submitted to *Food Chem* September 2009

Gonzalez-G, Hinojo MJ, Mateo R, Medina A, Jimenez M Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. (2005) *Int J Food Microbiol.* 2005 Nov 15; 105(1): 1-9

Grant SFA, Reid DM, Blake G Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen Ia1 gene. *Nat Gen* 1996 **14**: 1-6

Greenberger PA, Flais, MJ Bee pollen-induced anaphylactic reaction in an unknowingly sensitized subject. *Annals of allergy asthma & immunology* 2001 **86** (2): 239-242

Hagedorn H H and Burger M Effect of the age of pollen used in pollen supplements on their nutritive value for the honeybee. II. Effect of vitamin content on pollens. *J Apic Res*, 1967 **7**: 97-101

Hamamoto R, Ishiyama K, Yamaguchi M Inhibitory Effects of Bee Pollen *Cistus ladaniferus* Extract on Bone Resorption in Femoral Tissues and Osteoclast-Like Cell Formation in Bone Marrow Cells in Vitro. *Journal of Health Science* 2006a **52**(3): 268-275

Hamamoto R, Ishiyama K, Hashimoto K, Yamaguchi M Characterization of the active component in bee pollen *Cistus ladaniferus* extract in stimulating bone calcification and in inhibiting bone resorption in vitro. *Journal of Health Science* 2006b **52** (5) 607-612

Haro A, López-Aliaga I, Lisbona F, Barrionuevo M, Alférez MJ, Campos MS Beneficial Effect of Pollen and/or Propolis on the Metabolism of Iron, Calcium, Phosphorus, and Magnesium in Rats with Nutritional Ferropenic Anemia. *J. Agric. Food Chem* 2000 **48**: 5715-5722.

Herbert EW Jr., Vanderslice JT, Meis-Hsia H, Higgs D J Levels of thiamine and its esters in bee collected pollen using liquid chromatography and robotics. *Apidologie* 1987 **18**(2): 129-136

Huidobro JF, Simal J, Muniategui S El polen apícola: Determinación del contenido em glucidos. *Offarm* 1987 **6** (5): 57-71

Jaton JC, Roulin K, Rose K, Sirotnak FM, Lewenstein A, Brunner G, Fankhauser CP, Burger U The secalosides, novel tumor cell growth inhibitory glycosides from a pollen extract. *J of nat prod* 1997 **60**: 356-360

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J Pharmacol Sci* 2004 **96**: 229 – 245

Iversen T, Fiirgaard KM, Schriver P, Rasmussen O, Andreasen F The effect of NaO Li Su on memory functions and blood chemistry in elderly people. *J Ethnopharmacol* 1997 **56**(2): 109-16

Kosmider K, Wójcicki J, Samochowiec L, Woyke M, Górnik W Effect of Cerniton on platelet aggregation in vivo. *Herba Polon* 1983 **29**: 237

LeBlanc BW, Davis O K, Boue S, DeLucca A & Deeby T Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen *Food Chem* 2009 **115**, 1299-1305

Le Bourg E Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 2001 **498**: 183-186 <http://www.imsb.au.dk/~rattan/biogerontology.html>

Leja MA, Mareczek G, Wy_zgolik J, Klepacz-Baniak KC Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem* 2007 **100**: 237–240

Lin XL, Zhu LQ, Yuan YY, Li LM (1990) Morphological changes in aged canine prostatic hyperplasia treated with bee pollen. *Chin Tradit Herb Drugs* 1990 **21**: 164-166

Lindsted Chemical control of feeding behavior. *Comp Biochem Physiol* 1971 **39A** 553-581

Liu XL, Li LM Morphological observation of effect of bee pollen on intercellular lipofuscin in NIH mice. *J Chin Mater Med Zhongguo Zhongyao Zazhi* 1990 **15**: 561-563

Macdonald R, Ishani A, Rutks I, Wilt I. A systematic review of Cenilton for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 1999 **85**: 836-841

Majeska RJ, Wuthier RE Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochem Biophys Acta* 1975 **391** 51-60

Mărghitaş L. A., Stanciu O. G., Dezmirean D. S., Bobiş O., Popescu O., Bogdanov S., & M. G. Campos *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania *Food Chem* 2009 **115**, 878-883

Mazess RB On aging bone loss. *Clin Orthop* 1982 **165**: 239-52

Medina A, Gonzalez G, Saez JM, Mateo R, Jimenez M Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Syst-Appl-Microbiol*. 2004 Mar; **27**(2): 261-7

Moncada S, Vane JR Prostacyclin and its clinical applications. *An Clin Res* 1984 **16**: 241

Ohta S; Fujimaki T; Uy M M; Yanai M; Yukiyoishi A; Hirata T Antioxidant hydroxycinnamic acid derivatives isolated from Brazilian bee pollen. *Natural product research* 2007 **21** (8): 726-32

Orzaez-Villanueva MT, Diaz-Marquina A, Bravo-Serrano R, Blazquez-Abellan G The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition *Int J Food Sci Nutr* 2002 **53**(3): 217-224

Paiva J, Figueredo E Polinização e melissopalínologia I° Congresso Nacional de Apicultura (Portugal) Câmara Municipal da Nazaré 1987

Penfold AR, Willis JL The Eucalypts Botany, Chemistry, Cultivation and utilization. New York ed. Interscience Publisher, Inc. 1961 p.282-299

Peris J Producción y comercio de los productos apícolas en España. El Campo del Banco de Bilbao *Apicultura* 1984 **93** (Bilbao)

Puente S, Iniguez A, Subirats M, Alonso MJ, Polo F, Moneo I Eosinophilic gastroenteritis caused by bee pollen sensitization. *Med Clin (Barc)* 1997 **108**(18): 698-700

Riggs BL, Melton LJ Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. *Am J Med* 1983 **75**: 899-901

Riggs BL, Wahner HW, Dunn WL *et al* Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging: relationship to spinal osteoporosis. *J Clin Invest* 1981 **67**: 328-35

Roberts KP, Liu LT, Lind R E, Iyer RA, Prasad G, Hanna PE Cyclic hydroxamic acid inhibitors of prostate cancer cell growth: selectivity and structure activity relationships. *Prostate* 2000 **34**(2): 92-99

Samochowicz L, Wójcicki J Effect of pollen on serum and liver lipids in rats fed on a high-lipid diet. *Herba Polon* 1981 **27**: 33

Šaric A, Balog T, Sobočanec S, Kušić B, Šverko V, Rusak G, Likić S, Bubalo D, Pinto B, Reali D & Marotti T Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen *Food Chem Toxicol* 47, 547-554

Seppänen T, Laakso I, Wójcicki J, Samochowiec L An Analytical study on fatty acids in pollen extract. *Phytother Res* 1989 **3** (3) 115-116

Shoskes DA Phytotherapy and other alternative forms of care for the patient with prostatitis. *Curr Urol Rep* **3**(4): 330-334

Silva TMS, Câmara CA, da Silva Lins AC, Maria Barbosa-Filho J, Freitas da Silva EMS, Breno Magalhaes de Assis Ribeiro dos Santos F Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J of Food Comp & Analysis* 2006 **19** (6/7) 507-511

Stegelmeier BL, Edgar J A, Colegate S M, Gardner D R, Schoch T K, Coulombe R A, Molyneux R J Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J Nat Toxins* 1999 **8** (1) 95-116

Szczesna T, Rybak-Chimielewska H, Chmielewsky W Sugar composition of pollen loads harvested at different periods of the beekeeping season. *J of Apic Sci* 2002 **46**(2): 107–115

Thompson I Pharmacologic agents in complementary medicine in prostatic disease. *Drugs Today* 2001 **37**: 427-433

Uzbekova DG, Makarova VG, Khvoynitskaya LG, Slepnev AA Evaluation of Bee-collected Pollen influence in lipid peroxidation, antioxidant system and liver function in old animals. *J of Hepat* 2003 **38**: 703 Suppl 2

Wang MS, Fan HF, Xu HJ Effects of bee pollen on blood and hemopoietic system in mice and rats. *Chin Tradit Herb Drugs* 1993 **24**: 588-591, 601

Wilt T, Macdonald R, Ishani A, Rutks I, Stark G Cernilton for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2000 **2**:CD001042

Wójcicki J, Kósmider K, Samochowiec L, Woyke M Clinical evaluation of Cerniton as lipid-lowering agent. *Herba Polon* 1983 **29**: 55

Wójcicki J, Samochowiec L Further studies in Cernitins: screening of the hypolipidemic activity in rats. *Herba Polon* 1984 **30**: 115

Wójcicki J, Samochowiec L, Bartłomowicz B, Hinek A, Jaworska M, Gawronska-Szklarz B Effect of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1986 **62**: 39

Wu Y. and Lou Y A Steroid Fraction of Chloroform Extract from Bee Pollen of *Brassica campestris* Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Phytoter Res* 2007 **21** 1087–1091

Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K Anabolic effects of Bee Pollen Cistus ladaniferus extract on bone components in the femoral-diaphyseal and -metaphyseal tissues of rats in vitro and in vivo. *Journal of Health Science* 2006 **52**(1) 43-49

Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K Preventive effects of bee pollen Cistus ladaniferus extract on bone loss in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Journal of Health Science* 2007a **53** (2) 190-195

Yamaguchi M, Uchiyama S, Nakagawa T Preventive effects of bee pollen Cistus ladaniferus extract on bone loss in ovariectomized rats in vivo. *Journal of Health Science* 2007b **53** (5) 571-575

Yamaguchi M, Uchiyama S, Nakagawa T Anabolic effects of bee pollen Cistus ladaniferus extract in osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *Journal of Health Science* 2007c **53** (5) 625-629

Yang X, Guo D, Zhang J, Wu M Characterization and antitumor activity of pollen polysaccharide. *Internat Immunopharm* 2007 **7** 427–434

Yasumoto R, Kawanishi H, Tsujino T, Tsujita M, Nishisaka N, Horii A, Kishimoto T Clinical evaluation of long term treatment using cernitin pollen extract in patients with benign prostatic hyperplasia. *Clin Ther* 1995 **17**(1): 82-87

Zhang X, Habib FK, Ross M, Burger U, Lewenstein A, Rose K, Jatton JC Isolation and characterisation of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth in vitro. *J Med Chem* 1995 **38**(4): 735-738