



## **Caracterização de 5 amostras de pólen da Beira Baixa e otimização de um método de extração de Compostos Fenólicos e Flavonóides Totais em amostras de pólen.**

Carlos Alberto Lopes Antunes

### **Orientadores**

Prof. Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Prof. Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

Mestre Ana Mafalda Ferreira Romãozinho Neno de Resende

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Professor Adjunto Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, do Professor Adjunto Luís Avelino Guimarães Dias, do Instituto Politécnico de Bragança e da Mestre Ana Mafalda Ferreira Romãozinho Neno de Resende do Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar de Castelo Branco (CATAA).

Junho de 2021



## Dedicatória

Mais uma etapa concluída e difícil que foi. Este trabalho é o resultado de muito esforço e dedicação, mas não tinha sido possível sem o apoio incondicional da minha família.

Vou dedicar este trabalho, de forma muito especial, ao meu filho Lourenço. Ele que me trouxe a minha verdadeira motivação e felicidade.

Dedico, também, à minha esposa Ana Caetano, pois o seu apoio foi incansável desde o início da licenciatura até ao fim. Sempre me ajudou muito e nunca me deixou desistir.

Aos meus pais e irmãos, pois, apesar da distância sempre me incentivaram a estudar e a ser aplicado para ter um futuro melhor. Sempre presentes e prontos para me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus sogros porque nunca deixaram que o meu foco divagasse para outros assuntos, ajudando sempre que puderam nas minhas tarefas pessoais.

Aos amigos mais próximos, especialmente à Ana Barata e Vera Carmo, que não só acompanharam o processo, como me davam concelhos e prestavam apoio incondicionalmente.

Quero aproveitar o momento para dedicar este trabalho à Professora Ofélia Anjos, pois foi um suporte enorme para mim. É um ser humano inesquecível com uma sabedoria e experiência incrível.

Não existem palavras suficientes para agradecer a todos vós!

A minha vitória é vossa.

Muito obrigado!



## Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível se não contasse com o apoio e ajuda de algumas pessoas. Foram incansáveis e o nível de exigência prestado foi inigualável.

De uma forma muito especial, quero agradecer ao meu orientador Professora Ofélia Anjos por me ter desafiado e recebido com enorme profissionalismo e simpatia onde sua partilha de conhecimento e a confiança ao longo do trabalho foi fantástica. Ao Professor Luís Dias (IPB) pela partilha de conhecimento e pela ajuda ao longo de todo o trabalho. À Mestre Mafalda Resende pela ajuda, profissionalismo e pelo conforto que me transmitiu nas instalações do CATAA.

Foi mais que um privilégio trabalhar convosco, foi uma honra!

Tive o privilégio de ser ajudado por vários profissionais aos quais agradeço: Engenheira Cecília Gouveia, Engenheira Graça Diogo, Mestre Soraia Pedro, Mestre Celina Barroca, os Técnicos Paulo Mateus e Helena Beato (CATAA).

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco pela sua hospitalidade e pelo acolhimento ao longo dos três anos de licenciatura e pela oportunidade de estagiar nas respetivas instalações.

Ao Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA) pela oportunidade de efetuar uma parte do meu estágio, onde me foi garantido o máximo de comodidade.

Ao Centro de Biotecnologia das Plantas da Beira Interior pela cedência de alguns espaços para a realização de algumas análises assim como a disponibilização de alguns aparelhos.

Agradeço não só pela passagem, mas, também, pela aprendizagem que adquiri. Foi fantástico este caminho, um desafio!

Muito obrigado a todos por tudo!



# Caracterização de 5 amostras de pólen da Beira Baixa e desenvolvimento e otimização de um método de extração de Compostos Fenólicos e Flavonóides Totais em amostras de pólen

Carlos Alberto Lopes Antunes

## Resumo

O pólen coletado pelas abelhas do género *Apis mellifera* é um alimento natural, com valiosas características nutricionais e medicinais, que tem atraído cada vez mais a atenção, não apenas do consumidor em geral, como também da indústria.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: 1) a caracterização nutricional de 5 amostras de pólen proveniente da região da Beira Baixa; 2) testar um método para extração dos compostos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos), e flavonóides, recorrendo à metodologia de superfície de resposta.

Para a caracterização das 5 amostras de pólen (primeiro objetivo) foi efetuado a análise polínica, determinação de humidade,  $a_w$ , pH, proteína, lípidos totais e perfil de ácidos gordos, fibras, hidratos de carbono, cinzas, açúcares e energia. Foi ainda determinado o perfil de ácidos gordos por GC SSL-FID.

Para o segundo objetivo estudou-se o método de extração de compostos fenólicos e flavonóides, com recurso à extração guiada dispersiva energizada, usando um delineamento experimental central rotativo composto para aplicar a metodologia da superfície de resposta. O estudo envolveu determinar as melhores condições de maximização de eficiência do processo extrativo no que se refere a concentração de solvente (etanol/água), temperatura e tempo de extração. Como respostas determinou-se os compostos fenólicos totais e flavonóides totais, bem como, a atividade antioxidante dos diferentes extratos obtidos recorrendo ao método do DPPH.

Nas 5 amostras de pólen foram identificadas 28 espécies florais diferentes, sendo a *Cistus ladanifer*, *Rubus* spp., *Sesamoides* spp., *Erica* spp. e *Salix* spp. as espécies mais abundantes.

Deste modo, as diferentes características polínicas, associadas às diferentes regiões de recolha de pólen, influenciaram os parâmetros nutricionais obtidos, tendo sido observada a seguinte variação: humidade entre 5,77 e 15,62 %;  $a_w$  entre 0,36 e 0,69; pH entre 5,15 e 5,80; proteína entre 14,06 e 20,44 %; lípidos 2,70 e 4,44 %; fibras entre 5,88 e 7,30 %; hidratos de carbono entre 66,26 e 71,16 %; cinzas entre 1,98 e 2,36 %; glucose entre 17,95 e 21,12 g/100g; frutose entre 13,50 e 19,14 g/100g; energia entre 339,47 e 388,88 kcal/100g.

O método de extração não apresentou valores robustos para conclusão sobre as melhores condições de extração, pelo que é necessário efetuar mais ensaios (que não foram possíveis de executar no tempo disponível para este relatório), no entanto, com os resultados disponíveis foi possível verificar que o fator mais importante para maximizar o processo de extração é a razão etanol/água e as condições mais favoráveis de: para os compostos fenólicos etanol a 70/30% (v/v), temperatura de 50°C e 4 minutos de extração; para os compostos flavonóides etanol a 70/30% (v/v), temperatura de 50°C e 8 minutos de extração; para o DPPH etanol a 40/60 e 70/30% (v/v), temperatura de 30 e 40°C, 6 e 8 minutos de extração. Para estas condições foram obtidos os seguintes resultados dos parâmetros analisados: compostos fenólicos totais de  $23,88 \pm 1,37$  mg/L; flavonóides totais de  $12,42 \pm 0,36$  mg/L; DPPH acima de 65%.

## **Palavras chave**

Pólen; Características nutricionais; Extração Guiada Dispersiva Energizada; Superfícies de resposta; Compostos fenólicos e flavonóides totais.

# Characterization of 5 pollen samples from Beira Baixa and development and optimization of a method for pollen Total Phenolic and Flavonoids Content extraction.

Carlos Alberto Lopes Antunes

## Abstract

The pollen collected by bees of the *Apis mellifera* genus is a natural food, with valuable nutritional and medicinal characteristics, which has attracted more and more attention, not only from the general consumer, but also from the industry.

In this context, the present work had as objectives: 1) the nutritional characterization of 5 pollen samples from the Beira Baixa region; 2) test a method for extracting phenolic compounds (hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids), and flavonoids, using the response surface methodology.

For the characterization of the 5 pollen samples (first objective) a pollen analysis, determination of moisture, aw, pH, protein, total lipids and profile of fatty acids, fibres, carbohydrates, ash, sugars and energy were performed. The fatty acid profile was further determined by GC SSL-FID.

For the second objective, the method of extraction of phenolic compounds and flavonoids was studied, using guided dispersive energized extraction, using a central rotary composite experimental design to apply the response surface methodology. The study involved determining the best conditions for maximizing the efficiency of the extractive process in terms of solvent concentration (ethanol/water), temperature and extraction time. As answers, the total phenolic compounds and total flavonoids were determined, as well as the antioxidant activity of the different extracts obtained using the DPPH method.

In the 5 pollen samples, 28 different floral species were identified, being *Cistus ladanifer*, *Rubus* spp., *Sesamoides* spp., *Erica* spp. and *Salix* spp. the most abundant species.

Thus, the different pollen characteristics, associated with the different pollen collection regions, influenced the nutritional parameters obtained, with the following variation being observed: humidity between 5.77 and 15.62 %; aw between 0.36 and 0.69; pH between 5.15 and 5.80; protein between 14.06 and 20.44 %; lipids 2.70 and 4.44 %; fibres between 5.88 and 7.30 %; carbohydrates between 66.26 and 71.16 %; ash between 1.98 and 2.36 %; glucose between 17.95 and 21.12 g/100g; fructose between 13.50 and 19.14 g/100g; energy between 339.47 and 388.88 kcal/100g.

The extraction method did not present robust values to conclude on the best extraction conditions, so it is necessary to carry out more tests (which were not

possible to perform in the time available for this report), however, with the available results it was possible to verify that the most important factor to maximize the extraction process is the ethanol/water ratio and the most favourable conditions of: for phenolic content 70/30% (v/v) ethanol, temperature of 50°C and 4 minutes of extraction; for flavonoid content ethanol at 70/30% (v/v), temperature of 50°C and 8 minutes of extraction; for DPPH ethanol at 40/60 and 70/30% (v/v), temperature of 30 and 40°C, 6 and 8 minutes of extraction. For these conditions, the following results of the analysed parameters were obtained: total phenolic compounds of  $23.88 \pm 1.37$  mg/L; total flavonoids of  $12.42 \pm 0.36$  mg/L; DPPH above 65 %.

## **Keywords**

Pollen; Nutritional characteristics; Energized Dispersive Guided Extraction; Response Surface; Total phenolic and flavonoid content.

# Índice Geral

1. Introdução.....	1
2. Pólen apícola.....	2
2.1. Composição.....	2
2.2. Propriedades biológicas.....	4
3. Compostos Fenólicos.....	5
4. Material e métodos.....	6
4.1 Amostragem.....	6
4.2 Análise polínica.....	7
4.3 Caracterização Nutricional.....	7
4.3.1 Humidade e atividade da água.....	7
4.3.2 pH.....	7
4.3.3 Cinzas.....	8
4.3.4 Lípidos totais.....	8
4.3.5 Ácidos Gordos.....	8
4.3.6 Proteína.....	9
4.3.7 Fibra.....	10
4.3.8 Hidratos de carbono.....	10
4.3.9 Açúcares.....	10
4.3.10 Energia.....	11
4.4 Atividade antioxidante.....	11
4.5 Compostos Fenólicos Totais.....	12
4.6 Compostos Flavonóides Totais.....	12
4.7 Superfícies de resposta.....	13
4.8 Preparação dos Extratos e Extração.....	14
4.9 Tratamento de dados.....	15
5. Resultados/Discussão.....	15
5.1 Análise Polínica.....	15
5.2 Caracterização Nutricional.....	17
5.2.1 Nutrientes, pH, a <sub>w</sub> e Energia.....	17
5.2.2 Ácidos gordos.....	21
5.3 Superfície de resposta.....	25

5.3.1 Compostos Fenólicos Totais .....	25
5.3.2 Compostos Flavonóides Totais.....	27
5.3.3 DPPH.....	28
6. Considerações finais .....	30
7. Referências Bibliográficas .....	31

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Abelha a extrair pólen de uma flor. Pólen armazenado nos membros inferiores para transporte. Fonte: Wildflower Meadows, 2021- <a href="https://wildflowermeadows.com/">https://wildflowermeadows.com/</a> . .....	2
<b>Figura 2</b> - Q-cup, rede, filtros de celulose, esferas de vidro (A); Vials de âmbar para armazenamento dos extratos (B); Equipamento de extração EDGE (C). .....	15
<b>Figura 3</b> - Análise das componentes principais da determinação físico-química do grupo amostral, (P - Proteína, L - Lípidos, F - Fibra, A - Cinzas, H - Humidade, Fru - Frutose, Gluc - Glucose). .....	20
<b>Figura 4</b> - Análise das componentes principais da determinação do teor de ácidos gordos do grupo amostral. ....	24
<b>Figura 5</b> - Avaliação da qualidade do modelo obtido para a resposta concentração de compostos fenólicos totais. A) Resíduos vs valores previstos pelo modelo; B) Normalidade dos resíduos; C) Raiz quadrada dos resíduos padronizados vs valores previstos pelo modelo; D) Resíduos padronizados vs valores Leverage e linhas de distância Cook. ....	26
<b>Figura 6</b> - Avaliação da qualidade do modelo obtido para a resposta concentração de compostos flavonóides totais. A) Resíduos vs valores previstos pelo modelo; B) Normalidade dos resíduos; C) Raiz quadrada dos resíduos padronizados vs valores previstos pelo modelo; D) Resíduos padronizados vs valores Leverage e linhas de distância Cook. ....	27
<b>Figura 7</b> - Gráfico de contorno de superfície obtido para o modelo RSM da resposta concentração de compostos flavonóides totais usando as variáveis: percentagem de etanol (x1) e temperatura (x2). ....	28
<b>Figura 8</b> - Avaliação da qualidade do modelo obtido para a resposta DPPH. A) Resíduos vs valores previstos pelo modelo; B) Normalidade dos resíduos; C) Raiz quadrada dos resíduos padronizados vs valores previstos pelo modelo; D) Resíduos padronizados vs valores Leverage e linhas de distância Cook. ....	29
<b>Figura 9</b> - Gráfico de contorno do Modelo de segunda ordem de superfície obtido para o modelo RSM da resposta DPPH usando as variáveis: percentagem de etanol (x1) e temperatura (x2). ....	29



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Valores nutricionais para pólen de abelha seco. Adaptado de Thakur and Nanda 2020. ....	3
<b>Tabela 2</b> - Delineamento das extrações com design Box-Behnken, 3 fatores, 1 bloco e 15 corridas.....	14
<b>Tabela 3</b> - Resultados da contagem dos grânulos de pólen, ao microscópio, das cinco amostras. ....	16
<b>Tabela 4</b> - Valores médios e desvio padrão relativos à caracterização nutricional das diferentes amostras analisadas. ....	17
<b>Tabela 5</b> - Valores médios e desvio padrão relativos à quantificação de ácidos gordos das diferentes amostras analisadas. ....	21
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos para as diferentes condições de ensaio relativos aos 3 fatores estudados (média e desvio padrão). TPC-Compostos fenólicos totais; TFC- Compostos flavonóides totais.....	25
<b>Tabela 7</b> - Resultados do modelo RSM para a resposta concentração de compostos fenólicos totais.....	26
<b>Tabela 8</b> - Resultados do modelo RSM para a resposta concentração de compostos flavonoides totais. ....	27
<b>Tabela 9</b> - Resultados do modelo RSM para a resposta do valor de DPPH.....	28