

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos



**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO PÓLEN APÍCOLA *IN*
NATURA E DESIDRATADO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS**

Heloisa Litholdo Hervatin
Engenheira de Alimentos

Dra. Lucia Regina Durrant
Orientador

**Dissertação apresentada à faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos**

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Hervatin, Heloisa Litholdo
H445a Avaliação microbiológica e físico-química do pólen
apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas
/ Heloisa Litholdo Hervatin. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Abelha - Pólen. 2. Análise microbiológica. 3.
Físico química - Análise. 4. Controle de qualidade. I.
Durrant, Lucia Regina. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Evaluation microbiological and physico-chemical in nature the
pollen and dried

at different temperatures

Palavras-chave em inglês (Keywords): Bee pollen, Microbiological analysis,
Physico chemical –

Analysis, Quality control

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Maristela do Nascimento da Silva

Felix Guillermo Reyes Reyes

Flávio Luís Schmidt

Data de defesa: 25/08/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

Orientadora

Faculdade de Engenharia de Alimentos-DCA

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

(membro)

Faculdade de Engenharia de Alimentos-DCA

Dra. Maristela Nascimento da Silva

(membro)

Pesquisadora do Instituto Tecnologia de Alimentos-ITAL

Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt

(membro)

Faculdade de Engenharia de Alimentos-DTA

Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira

(membro-suplente)

Pesquisadora do Instituto Tecnologia de Alimentos-ITAL

***Por mais medonha e escura que seja à noite,
Sempre haverá uma manhã de esperança.***

(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

IN MEMORIA

Esta pesquisa está sendo dedicada ao homem mais importante da minha existência, ao meu Pai, Antinarbi Hervatin, este homem de perseverança e luta, como todos os dias de sua vida.

AGRADECIMENTOS

A minha ex-chefe e atual amiga Dra Neusely da Silva pelo carinho com que me acolheu no Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL no setor de Microbiologia, pelo incentivo na realização desta pesquisa.

Aos auxílios e dedicação da Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira, no acompanhamento do desenvolvimento desta pesquisa.

Aos estagiários do Setor de Microbiologia do ITAL, Leonardo, Juliana que trabalharam com amor e responsabilidade, tornando tais tarefas simples o que parecia impossível.

A pesquisadora Dra. Maristela Nascimento pelo companheirismo e colaboração com a pesquisa.

As minhas amigas Miriam Marquesini e Ivone Francisca da Silva por estarem presentes durante os anos de trabalho, pela dedicação e carinho que me impulsionaram para terminarem esta pesquisa.

A minha família que esteve presente em todos os momentos de aflição e foi a força e a razão pela qual vencemos.

A minha rainha, Maria Nice Gaspar Litholdo que com todo o seu carinho soube me compreender e me ajudar em todos os meus passos por este caminho.

As pesquisadoras do Polo de Pindamonhagaba –SP, PqC.Érica Weinstein Teixeira, PqC Maria Luísa T. M. F. Alves, PqC Renata Galhardo Borguini, pela colaboração durante as coletas do pólen, e a realizações das análises físico-químicas.

A pesquisadora do Instituto de Zootecnia, PqC Augusta Carolina C. C. Moreti, PqC Ivani Pozar Otsuk, pela realização das pesquisas polínicas e estáticas para comparação dos resultados.

E por todas as pessoas que neste tempo todo passaram e marcaram a estória deste livro que é a vida.

AGRADEÇO A DEUS PELAS BENÇÃOS RECEBIDAS POR TODA A VIDA E
PELAS VITÓRIAS CONQUISTADAS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	7
3.1 REGIÕES PRODUTORAS DE PÓLEN	7
3.2 CONCEITO SOBRE O PÓLEN APÍCOLA	9
3.3 COLMÉIAS	11
3.3.1 TIPO DE COLMÉIA.....	12
3.3.2 TIPOS DE COLETORES PARA O PÓLEN.....	14
3.3.3 MEDIDAS DE CONTROLE NA COLETA E NO TRANSPORTE DO PÓLEN.....	17
3.4 COMPOSIÇÃO QUIMÍCAS E PROPRIEDADES.....	17
3.5 FORMAS DE COMERCIALIZAÇÃO	20
3.6 BENEFÍCIOS À SAÚDE HUMANA ATRIBUIDOS AO PÓLEN	21
3.7 PADRÕES DE QUALIDADE DO PÓLEN APÍCOLA.....	22
3.8 IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS NOS ALIMENTOS	24
3.8.1 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E INDICADORES NOS ALIMENTOS	26
3.8.2 CONTROLE DE MICRORGANISMOS POR DESIDRATAÇÃO.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	31
4.2 PROCEDIMENTO PARA COLETA DAS AMOSTRAS	32
4.3 BENEFICIAMENTO DAS AMOSTRAS.....	38
4.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	41
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	42
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	44

5.1.1 PÓLEN APÍCOLA <i>IN NATURA</i>	44
5.1.2 PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO.....	47
5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	52
5.2.1 PÓLEN APÍCOLA <i>IN NATURA</i>	52
5.2.2 PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADOS	57
5.2.3 ANÁLISES DOS SWABS DOS COLETORES	65
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
6 CONCLUSÕES	74
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 3.3.1.1 Colméias.....	12
Figura 3.3.2.1 Colméia com o coletor de pólen amostra.	15
Figura 3.3.2.2 Coletor tipo Tropical Africanizado-Baiano.....	16
Figura 3.3.2.3 Coletor tipo Intermediário Interno.	16
Figura 3.3.2.5 Coletor tipo plástico injetado (teste).	16
Figura 4.2.1 Início da retirada do coletor da colméia para coleta do pólen.....	32
Figura 4.2.2 Retirada do coletor com o pólen apícola depositado.....	33
Figura 4.2.3 Coleta do pólen deixado pela abelha.	33
Figura 4.2.4 Quarto passo substituição dos coletores.....	33
Figura 4.2.5 Retirada dos coletores com o pólen.	34
Figura 4.2.6 Acondicionamento dos coletores com pólen.	34
Figura 4.2.7 Acondicionamento dos coletores para o transporte.....	34
Figura 4.2.8 Local de processamento do pólen.....	35
Figura 4.2.9 Higienização da bancada.	35
Figura 4.2.10 Higienização dos utensílios.	35
Figura 4.2.11 Higienização dos materiais.....	36
Figura 4.2.12 Higienização dos coletores.....	36
Figura 4.2.13 Coletor a ser colocado na estufa.	36
Figura 4.2.14 Estufa para colocar os coletores.	36
Figura 4.2.15 Chegada do pólen apícola para o processamento.	37
Figura 4.2.16 Retirada do pólen apícola dos coletores.	37
Figura 4.2.17 Limpeza e remoção de partícula indesejáveis do pólen.	37
Figura 4.2.18 Pólen sem sujidades.	37

Figura 4.2.19 Pólen já embalado para ser realizado a análise.	38
Figura 4.2.20 Embalagem com o pólen apícola.	38
Fluxograma 4.3.1 Beneficiamento e Comercialização do Pólen Apícola Desidratado	39
Figura 4.3.1 Desumidificador A.	40
Figura 4.3.2 Desumidificador A (Parte Posterior).	40
Figura 4.3.3 Secadora B (Parte Posterior).....	41
Figura 5.3.1 Representação gráfica da equação de regressão da contagem de bolores e leveduras em três frequências de coleta (24, 48 e 72h).	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01 Valores de Atividade de água, pH e umidade (em porcentagem) do pólen <i>IN NATURA</i> na primeira etapa de coleta (março/abril de 2007).	45
Tabela 02 Dados de Atividade de água, pH e Umidade referentes à segunda (outubro/novembro de 2007) etapa de coleta do pólen apícola <i>IN NATURA</i>	45
Tabela 03 Análises de Atividade de água, pH e Umidade do pólen apícola desidratado coletados no período de março e abril de 2007 na colméia experimental de Pindamonhangaba-SP.	47
Tabela 04 Análises de Atividade de água, pH e Umidade do pólen desidratado referente à segunda coleta, que corresponde aos meses de outubro/ novembro de 2007.	49
Tabela 05 Análises de Atividade de água, pH e Umidade do pólen desidratado referente as amostras adquiridas no comercio varejista do Estado de São Paulo.	51
Tabela 06 Análise Microbiológica do Pólen <i>IN NATURA</i> coletado na primeira (março/abril) etapa, das colméias experimentais do pólo apícola de Pindamonhangaba.	52
Tabela 07 Análise Microbiológica do Pólen <i>IN NATURA</i> referente á segunda (outubro/novembro de 2007), das colméias instaladas no Pólo de Pindamonhangaba.	53
Tabela 08 Análise Microbiológica do Pólen Apícola Desidratado, pelos processos A e B, das colméias de pólen apícola do Pólo de Pindamonhangaba referente à primeira (março/abril de 2007) etapa.....	57
Tabela 09 Análises microbiológicas do Pólen Apícola desidratados pelos processos A e B, das colméias de pólen, referentes à segunda etapa (outubro/novembro de 2007) do Pólo de Pindamonhangaba.	59
Tabela 10 Análises microbiológicas de amostras de Pólen Apícola desidratado adquiridas no comercio do Estado de São Paulo.....	64

Tabela 11 Resultados da Técnica de *Swab* dos coletores de pólen das colméias, nos períodos de 24 horas, 48horas e 72horas no Pólo de Pindamangaba-SP..... 66

Tabela 12 Resultados da Técnica de *Swab* nos coletores de pólen higienizados e não higienizados. 67

Tabela 13 Médias e análises estatísticas dos dados de pH, umidade e atividade de água do pólen apícola in natura e do pólen submetido a dois processos de desumidificação, em três frequências de coleta, na primeira fase de coleta (março/abril de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba. 68

Tabela 14 Médias e análises estatísticas dos dados de contagem de bolores e leveduras no pólen apícola *IN NATURA* e no pólen apícola submetido a dois processos de desumidificação e três frequências de coleta, na primeira fase de coleta (março/abril de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba. 69

Tabela 15 Médias e análises estatísticas dos dados de pH, umidade e atividade de água do pólen apícola *IN NATURA* e do pólen apícola submetido a dois processos de desumidificação, em três frequências de coleta, na segunda fase de coleta (outubro/novembro de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba. 71

Tabela 16 Médias e análises estatísticas dos dados de contagem de bolores e leveduras no pólen apícola in natura e do pólen apícola submetido a dois processos de desumidificação e três frequências de coleta, na segunda fase de coleta (outubro/novembro de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba. 72

RESUMO

O pólen apícola é a aglutinação do pólen presente nas flores coletados pelas abelhas operarias, e depositados na entrada da colméia. O estudo visou avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do pólen *IN NATURA* e do submetido a diferentes processos de secagem, simulando as condições de processamento do produto comercializado. Também avaliou as amostras adquiridas no comércio do estado de São Paulo. Registrou-se a escassez das pesquisas sobre a qualidade microbiológica do pólen apícola.

Primeiramente a pesquisa, analisou amostras de pólen apícola obtidas através de coletores instalados nas colméias pertencentes ao apiário experimental do Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba, localizado em Pindamonhangaba-SP, pertencente à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. A coleta ocorreu nos intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas, objetivando a presença e/ou quantidade de microrganismos patogênicos no pólen com relação ao tempo de permanência do produto no campo. As amostras foram congeladas por 48 horas, e submetidas a dois processos de secagem (circulação de ar em sistema aberto a 40-42°C e sistema de circulação de ar fechado a 30°C). Foram realizadas as análises físico-químicas para os parâmetros de pH, umidade e atividade de água e as microbiológicas com avaliação de *Bacillus cereus*, Estafilococos coagulase positiva, coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, bolores e leveduras, além de microrganismos sulfitos redutores.

Amostras de pólen apícola desidratado foram adquiridas no mercado vajeirista do Estado de São Paulo, com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), submetidas aos mesmos parâmetros. Através dos cálculos estatísticos observaram-se possíveis diferenças e/ou correlações existentes entre os parâmetros analisados (microbiológicos, físico-químicos) para os tratamentos propostos (frequência de coleta e processos de desidratação).

Verificou-se que as amostras analisadas, as *IN NATURA* e as desidratadas, mostraram-se isentas dos principais patógenos como *Salmonella sp*

e *Estafilococos* coagulase positiva, porém, a população de bolores e leveduras foi relativamente elevada. Podendo concluir que os bolores e leveduras são os parâmetros microbiológicos mais significativos para o pólen apícola, seguido por *Bacillus cereus* e por bactérias coliformes totais, sendo parâmetros que devem ser introduzidos na legislação; além do processo de desidratação normalmente utilizado para pólen, não reduzir a população fúngica. Com base na Legislação atual para padrões microbiológicos em alimentos, considerando o grupo da granola, todas as amostras analisadas, encontram-se dentro dos padrões estabelecidos. Bolores e leveduras não estão incluídos na Legislação do MAPA.

A época do ano teve influência na contaminação de Bolores e Leveduras, paralelamente com o tempo de permanência do pólen no campo, sendo indicada a coleta do material a cada 24 horas. Assim os processos de secagem devem ser otimizados para permitirem a obtenção de produto livre de contaminantes microbiológicos; juntamente com a higienização do material nas diferentes etapas de produção e processamento do pólen, com foco na busca de materiais que substituam a madeira que é extremamente porosa, de forma a permitir higienização adequada e satisfatória. Outro parâmetro a ser considerado é a embalagem para o produto que merece atenção de especialistas nesta área.

Palavras chaves: pólen apícola, análise microbiológica, análise físico-química, controle de qualidade.

ABSTRACT

The bee pollen is the agglutination of pollen present in flowers collected worker bees, and deposited at the entrance of the hive. The study aimed to evaluate the microbiological quality and physico-chemistry of the pollen in nature and subject to different processes of drying, simulating the processing conditions of the product sold. Also evaluated the samples acquired in the trade of the state. We have registered the scarcity of research on the microbiological quality of bee pollen.

First the research, analyzed samples of bee pollen obtained from collectors installed in the experimental apiary hives belonging to the Regional Technology Development Center of Agribusiness of the Paraíba Valley, located in Pindamonhangaba-SP, belonging to the Agency of Technology Agribusiness Paulista. Frequency of collection in intervals of 24 hours, 48 hours and 72 hours, to the presence and/or amount of pathogenic microorganisms in pollen with the time of product in the field. The samples were frozen by 48 hours, and subjected to two drying processes (movement of air in the open system 40-42°C and a system of closed circulation of air at 30°C). Performed the analysis for the physical-chemical parameters of pH, humidity and water activity and with the microbiological assessment of *Bacillus cereus*, Coagulase positive Staphylococci, coliforms at 45°C, *Escherichia coli*, *Salmonella*, molds and yeasts, and micro sulphites reducing.

Acquired samples of dried bee pollen market of the State of São Paulo, with registration at the Federal Inspection Service (SIF), subject to the same parameters. Through statistical calculations were observed possible differences and/or correlations between the analyzed parameters (microbiological, physico-chemical) for the proposed treatments (frequency of collection and processes of dehydration).

It was found that the samples analyzed, the *IN NATURE* and dehydrated, were free of major pathogens such as Salmonella and Coagulase positive Staphylococci, however, the population of yeasts and molds is relatively high. May

conclude that the yeasts and molds are the most significant microbiological parameters for the bee pollen, followed by *Bacillus cereus* bacteria and total coliforms, and parameters to be introduced into legislation, in addition to the dehydration process typically used for pollen, is not able to eliminate fungal its population, based on current legislation for microbiological standards in food, considering the group of granola, all the samples, are within the standards set. Yeast and molds are not included in the legislation of the MAP.

The time of year influences the contamination of molds and yeasts, along with the time of pollen in the field, being given the collection of material every 24 hours. Thus the process of drying must be optimized to allow the achievement of product free of microbiological contaminants, together with the cleaning of equipment in various stages of production and processing of pollen constantly, with a focus in the search for materials to replace the wood that is extremely porous to enable proper cleaning and satisfactory. Another parameter to be considered is the packaging for the product deserves the attention of specialists in this area.

Keywords: bee pollen, microbiological analysis, physical-chemical analysis, quality control

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Existem relatos que as abelhas produzem mel há mais de 50 milhões de anos, ou seja, muito tempo antes que o homem aparecesse sobre a terra. O mel tem sido utilizado ao longo dos anos como alimento e medicamento. Praticamente todas as civilizações antigas conheceram e utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos terapêuticos na sua medicina (LENGLER, 2007).

Comercialmente o mel pode ser considerado o principal produto das abelhas, tanto em termos de popularidade quanto em volume de produção. No entanto, outros produtos de colméia, tais como própolis, geléia real e pólen, vêm ganhando crescente importância nas últimas décadas, cada um com seu próprio mercado, constituindo-se em uma fonte de renda alternativa para os apicultores.

O pólen é um pó fino e colorido existente nas flores que, quando coletados pela abelha para sua alimentação, é umedecido com a saliva das mesmas aglutinando-os formando um grão que será transportado até a colméia. Para a coleta, utilizam-se equipamentos específicos para esse fim, recolhe este pólen para beneficiar e comercializar (WIESE, 2000; ALMEIDA-MURADIAN, 2002; BARRETO, *et al.*, 2003).

Embora se constate a inexistência de informações sobre a magnitude do mercado nacional e internacional de pólen apícola, a prática de consumo do produto, tanto na dieta humana como na dieta animal, é uma realidade. Seu maior uso, hoje, é como suplemento alimentar, sendo indicado para o equilíbrio funcional e harmônico do organismo humano, produzindo bem-estar e vigor físico (KRELL, 1996). Além de sua utilidade como suplemento alimentício, o pólen é usado em farmacologia (ingrediente em produtos apífito-aromáticos), cosmética (filtros solares, cremes, máscaras, batons, sabonetes, shampoos, etc), na atividade apícola como alimento para as abelhas, no monitoramento da poluição ambiental, etc (CASTRO, *et al.*, 2002).

Os produtos da colméia sempre foram um alimento de alto valor nutritivo para o homem, pois no início da sua história o mel era saboreado pelo doce que apresenta e também como um modo de saciar a fome. Porém, não tinham idéia

que os favos com o mel continham própolis, pólen, geléia real e larvas de abelhas, e que o veneno da picada poderia servir como remédio para problemas reumáticos e artríticos. Há 600 anos, os hindus utilizavam o mel como alimento e a própolis como medicamento para a cicatrização de feridas (LENGLER, 2007).

O interesse em termos de produção de pólen no Brasil iniciou-se no final da década de 80. A partir deste momento, observou-se um declínio com posterior retomada da produção e comercialização no final da década de 90. De acordo com BARRETO, *et al.*, (2003), atualmente o mercado está focado em consumo de produtos naturais, complementares à dieta ou com efeito terapêutico, o que estimula e promove a modalidade da cadeia produtiva apícola.

Porém, desde o fim do Século XIX, os pesquisadores se prendiam a explicar sua composição química (especialmente nos Estados Unidos, Japão, Escandinávia e França), somente depois de 1950 que foram empreendidos os estudos analíticos e experimentais mais importantes (DONADIEU, 2002).

Apesar de ser um produto totalmente natural e de grande valor nutricional são necessários cuidados de manipulação na colheita e beneficiamento dos grãos para uma maior garantia de qualidade do produto final. Com relatos de BARRETO, *et al.*, (2003) um dos primeiros países a estabelecer normas para a padronização do pólen apícola foi a Espanha, pois a falta de normativas específicas sobre a qualidade do produto espanhol resultou na comercialização de produtos de baixa qualidade e conseqüente perda do mercado europeu.

Os grãos de pólen, ou simplesmente pólen, são estruturas microscópicas contidas nas angiospermas e representam o gametófito masculino das plantas (WITHERELL, 1975). Sua função mais importante é conduzir as células sexuais masculinas, necessárias à reprodução das plantas, cada diminuto grão de pólen é formado na antera, o aparelho feminino, onde ocorre a fertilização ou fusão dos gametas dos dois sexos (BRUANT, 1990). De acordo com WITHERELL (1975), além de ser o próprio objeto da polinização, o pólen tem importância na apicultura de duas outras formas: como a principal fonte de proteínas, lipídios e minerais para as abelhas e como um possível produto excedente do apiário.

Tem-se também como definição todo organismo que se reproduz sexualmente tem um componente feminino e um componente masculino, cada um responsável por metade dos genes. Portanto, as plantas têm dois veículos para transmitir seus genes para a próxima geração: o pólen e o óvulo. O pólen é o elemento fornecido pelas estruturas masculinas da flor (MORETI, 2006). Relato de DONADIEU (2002) diz que o pólen compõe-se de uma multiplicidade de microesporos, que se encontram e são formados na antera, parte masculina da flor e representam as “sementes” da flor.

O apicultor pode apropriar-se de uma parte do pólen coletado pelas abelhas e para tal utiliza aparelhos denominados coletores de pólen, armadilhas de pólen ou ainda caça-pólen, que retira partes das bolotas presentes nas corbículas antes que as abelhas entrem na colméia (ALVES, *et al.*, 1997). Essas bolotas permanecem retidas em gavetas e são recolhidas pelo apicultor em intervalos pré-determinados, para serem posteriormente processadas. As etapas do processamento do pólen são: coleta, congelamento, secagem, limpeza e envase, obtendo-se, deste modo, o pólen apícola desidratado (SALOMÉ & SALOMÉ, 1998).

O pólen apícola, segundo a Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetivadas por abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido na entrada da colméia (BRASIL, 2001a). Pode ser dividido, segundo o teor de umidade em:

- Pólen apícola: produto coletado em sua forma original;
- Pólen apícola desidratado: produto submetido ao processo de desidratação em temperatura não superior a 42°C e com teor de umidade não superior a 4%.

A composição química do pólen varia entre as diferentes espécies polínicas (ALMEIDA-MURADIAN, *et al.*, 2005). Tal variação poderá ocasionar diferenças no valor nutritivo do pólen, portanto, a mistura de varias fontes é necessária para dar as abelhas uma dieta equilibrada (SALOMÉ & SALOMÉ, 1998).

Segundo SCHMIDT (1996), a composição nutricional média do pólen apícola é de 23,7% de proteínas; 27% de carboidratos; 4,8% lipídios, além de minerais, entre os quais encontram-se fósforos, potássio, cálcio, ferro, sódio, magnésio, manganês e cobre, e vitaminas, dentre as quais encontram-se a vitamina C, além de carotenóides, como o β -caroteno, que é precursor da vitamina A, e vitaminas do complexo B (tiamina, niacina, riboflavina, piridoxina, biotina, ácido pantotênico e ácido fólico).

Verifica-se, desta forma, o elevado valor nutritivo do produto. Segundo CAMPOS, *et al.*, (1996), o seu uso está associado a muitos benefícios para o organismo humano, entre os quais estão os combates ao estresse oxidativo e a atividade antibiótica.

Entre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, estão aqueles que definem as características microbiológicas. A avaliação da qualidade de um produto fornece informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e quanto ao risco à saúde da população (FRANCO, 1996a).

A segurança alimentar com ênfase nos aspectos qualitativos pode ser entendida como a aquisição pelo consumidor de alimento de boa qualidade, livres de contaminantes de natureza química (pesticidas), biológicas (organismos patogênicos), físicas (vidros, pedras), ou qualquer substância que possa acarretar problemas à saúde (SPERS & KASSOUF, 1996).

O conteúdo nutricional, uma ampla gama de microrganismos patogênicos pode proliferar no pólen apícola (GONZÁLEZ, *et al.*, 2005). Note-se que o pólen produzido no Brasil não recebe tratamento com produtos químicos para sua desinfecção, como é praticado em alguns países considerados grandes produtores de pólen, onde são utilizados epóxido de etano, brometo de metila, óxido de etileno e fósforo de alumínio (SALOMÉ & SALOMÉ, 1998).

Considerando-se a importância, em termos de saúde pública, da qualidade dos alimentos e os riscos que estes podem trazer à saúde da população, aliado ao fato do alimento em questão apresentar um alto valor nutritivo e de seu consumo pela população estar em expansão, a presente

pesquisa visa verificar as condições higiênico-sanitárias do produto. Além disso, pretende-se avaliar se os procedimentos comumente adotados pelos apicultores garantem a inocuidade do produto. Vale registrar a escassez de pesquisas científicas sobre a qualidade microbiológica do pólen apícola.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visou avaliar a qualidade microbiológica e as características físico-químicas do pólen apícola *IN NATURA* e do pólen submetido a diferentes processos de secagem, os quais simulam as condições de processamento do produto comercializado.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Tem como objetivo caracterizar físico-quimicamente as amostras de pólen apícola *IN NATURA* e desidratada referente ao pH, umidade e atividade de água.

Avaliar a presença e/ou quantidade de microrganismos patogênicos no produto, além da determinação destes parâmetros conforme o tempo de permanência no campo antes da coleta pelo apicultor.

Realizar um comparativo da qualidade microbiológica do pólen submetida aos dois métodos de desidratação proposto no item Material e Métodos, e notando a eficácia de cada um para a desidratação da matéria.

Identificar nos coletores de pólen, possíveis focos de contaminação microbiológica, além da obtenção de dados que forneçam subsídios para a solidificação de conceitos sobre a segurança na cadeia produtiva do pólen.

Analisar a qualidade das amostras de pólen apícolas desidratadas adquiridas no comercio varejista do Estado de São Paulo.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 REGIÕES PRODUTORAS DE PÓLEN

Para o estabelecimento da apicultura sustentável, é recomendável a avaliação das abelhas que habitam a região, assim como as espécies vegetais existentes na mesma, por que a produção de mel e dos derivados da colméia está diretamente ligada às flores presentes como o período de florescimento e sua abundancia (VELOSO, *et al.*, 2004).

De acordo com CERQUEIRA (2007), o Brasil é um país com clima diversificado, onde se observam o Clima Temperado, Equatorial e Tropical.

O ecossistema predominante é o Cerrado, nome regional dado às savanas brasileiras. Distribuída principalmente, pelo Planalto Central Brasileiro, nos Estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, parte de Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal, abrangendo 196.776.853ha, equivalente a 85% ou aproximadamente 20% da superfície do País. Há outras áreas de Cerrado, chamadas periféricas ou ecótonos, que são transições com biomas Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga (VELOSO, *et al.*, 2004).

O clima do Cerrado é quente, semi-úmido, sendo com verão chuvoso e inverno seco, a pluviosidade anual em torno de 800 a 1600mm, já os solos são quimicamente pobres e profundos, reconhecido devido a sua formação ecossistêmicas, já que a sua vegetação apresenta desequilíbrio na sua forma devido a escassez de micronutrientes, a exemplo do alumínio. O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas. Além dos recursos hídricos da região ressaltam em quantidade e qualidade, como nas suas chapadas encontram-se as nascentes dos principais rios das bacias Amazônica, da Prata e do São Francisco (VELOSO, *et al.*, 2004).

Várias espécies de abelhas sociais são também nativas do Brasil. A população de abelhas sociais inclui algumas espécies de “mamangavas” (Bombini), como também muitas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini). A abelha melífera (*Apis melífera*) foi introduzida no Brasil, por volta do século XIX e

tem ampla distribuição em todo o país, a qual se adaptou as condições ambientais (CERQUEIRA, 2007). Esta abelha *Apis Melífera* possui comprimento de 10 a 11mm, sendo a abelha mais conhecida e utilizada comercialmente no mundo (SCHEREN, 1986).

Comparação do clima que as principais abelhas habitam, verificou-se a existência de pólos produtivos nos Estados. De acordo com BARRETO, *et al.* (2003), existem dois pólos produtivos no país: a região do Sul, tendo Santa Catarina, e o Nordeste, tendo a Bahia como principal produtor. Verificou-se que ainda existem regiões brasileiras não produtoras de pólen, porém com alto potencial produtivo como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Ceará. Esses estados apresentaram, ao longo do ano, grande estocagem de pólen nos alvéolos das áreas de cria, levando os apicultores a instalarem coletores somente para a retirada do pólen apícola.

O número de colméias, destinado à produção de pólen nos estados analisados foi de 1737 em um estudo realizado por BARRETO, *et al.*, (2003), sendo que no estado da Bahia cerca de 600 colméias eram destinadas à produção de pólen, em Santa Catarina cerca de 480 colméias e no Paraná por volta de 300 colméias. O período de produção do pólen foi diversificado e variou entre os estados, notando-se variações entre as regiões de um mesmo estado, como na Bahia, onde foram obtidas informações sobre apiários que permaneceram produtivos durante o ano todo o ano, produzindo pólen de forma intermitente.

Assim pode-se observar que a flora polínica disponível varia entre os estados analisados e está relacionada com o clima e o solo de cada região. Entretanto, essas diferenças tornam o Brasil capaz de produzir o pólen apícola ao longo do ano. Como acontece na Bahia que possui o período de produção de janeiro a dezembro decorrente da diversidade da flora que tem Palmeiras, Camaçari, Cajá e Palmeira de dendê. No que se refere à produção média por colméia/mês, esta varia de 900gramas no Rio Grande do Sul a 48 quilogramas no município de Canavieiras/BA proporcionado pela florada de Cajá e Camaçari (BARRETO, *et al.*, 2003).

3.2 CONCEITO SOBRE O PÓLEN APÍCOLA

O pólen apícola é para as plantas o gameta masculino indispensável para fecundar os óvulos, que vão gerar as sementes responsáveis pela perpetuação da espécie vegetal. Pela designação botânica, a palavra pólen vem do latim “pollenins” que significa “pó muito fino” (CORONEL, *et al.*, 2004).

Embora CERQUEIRA (2007) tenha relatado que o pólen biologicamente é o agente de fecundação da flor (gameta masculino) formada por microscópicos grãos de diversas formas, cores e sabores, localizado nas anteras, de onde é retirado pelas abelhas e levado até a colméia e depositado nos alvéolos para o uso como alimento normal e na produção da geléia real. Desta forma, apresentando uma composição variável entre as espécies, e os outros fatores que influenciam são os meios ecológicos e geológicos. Como demonstra BARRETO *et. al.*(2003) que no final da coleta encontram-se reunidas às bolotas de grãos de coloração variável, indicando diversas comunidades botânicas colecionadas pelas abelhas, formando uma mistura conhecida como “mix” polínico, sendo esse material removido pelo apicultor para o beneficiamento, comercialização e consumo animal e humano.

Segundo definição de RISCO (2007) a palavra “pólen” deriva do grego “pale”, que designa farinha e/ou pó polínico, da mesma ordem da “palinologia” (polínico) que corresponde aos estudos científico dos grãos de pólen.

Através da anatomia vegetal, pode-se conhecer que a formação do pólen apícola na planta ocorre através do processo referente à preparação dos esporos e gametas masculinos, sendo o microesporogênese correspondente ao tubo polínico e o microgametogênese que leva a formação dos núcleos espermáticos (microgametas). No final do processo é formado o microgametófito gerando o grão de pólen (SILVEIRA, 2004).

O grão de pólen possui dois núcleos, sendo o maior denominado de macronúcleo que exerce a função vegetativa, pois realiza as funções metabólicas para a manutenção da célula. O segundo núcleo é o micronúcleo que tem a função reprodutora, sendo que este núcleo vai se dividir e originar a dois núcleos espermáticos com gametas masculinos (SILVEIRA, 2004).

O pólen é a principal fonte de alimento não líquido especialmente para as abelhas, pois este contém todos os nutrientes essenciais para a produção de geléia real, com a qual são nutridas as larvas de rainha e as larvas de jovens operárias. O pólen é a principal fonte de proteínas e lipídios para as larvas, talvez para todas as espécies de gêneros de *Apidae*, pois a quantidade de proteínas e gorduras no néctar é insignificante (MORETI, 2006).

As operárias mais velhas usam a proteína diretamente do pólen, já as larvas e os adultos de rainha e as larvas jovens de ambos os sexos recebem geléia real, produzidas pelas abelhas sendo enriquecidas com pólen. Deste modo, o pólen é essencial para o crescimento normal e o desenvolvimento de todos os indivíduos de uma colônia de abelhas, assim como para a sua reprodução (MORETI, 2006).

As abelhas, na ausência de pólen, recorrem à sua própria fonte de reserva, ao receberem material nutritivo, no caso pólen, rapidamente assimilam os principais nutrientes que haviam perdido, reintegrando-se à normalidade (MARCHINI, *et al.*, 2006).

Sabe-se que as abelhas necessitam de 10 aminoácidos essenciais como a arginina, histidina, lisina, triptofano, felinamina, metionina, treonina, leucina, isoleucina e valina, os quais são todos obtidos do pólen. Outro fator importante, experimentos de alimentação demonstram uma necessidade média de 145mg de pólen para que uma abelha operária complete o ciclo de vida (MARCHINI, *et al.*, 2006).

Segundo MORETI (2006) a quantidade de pólen carregada pelas abelhas melíferas é maior que a coletada por outras abelhas, como as dos gêneros *Apis*, *Bombus* e *Colletes* que podem carregar uma carga de pólen que varia de 100 a 120mg, sendo igual aproximadamente à metade de peso do seu corpo.

Porém existe uma relação entre a escolha da fonte de pólen coletado pelas abelhas e a disponibilidade de recursos que afetam na coloração, na morfologia, no odor do mesmo. Desta forma, nota-se que os tipos polínicos podem variar conforme a região ou época do ano em que estes estão ofertados. Sendo assim, conhecer o valor nutricional dos diferentes tipos polínicos pode, portanto

contribuir para a escolha do local de instalação de diferentes apiários e sugerir ingredientes para a produção de substitutos protéicos, em época de entressafra de pólen (EMBRAPA, 2008).

Segundo ALMEIDA–MURANDIAN, *et al.*, (2005) a caracterização nutricional do pólen apícola pode ser utilizado no controle da qualidade deste produto, principalmente para direcionar a produção comercial do pólen monofloral, ou seja, aquele que é proveniente de uma mesma planta.

3.3 COLMÉIAS

A palavra colméia vem de *colmo*, nome dado à palha trançada, matéria com que os gregos e romanos usavam para fabricar suas colméias que eram em forma de sino (SOBRAL, 2008). Segundo FREIRE (2004), o significado de colméia é o local onde se habita as abelhas.

No século XVII surgiram estudiosos como *Maraldi* e *Reaumur*, que inventaram as primeiras colméias de observação (SOBRAL, 2008). A partir deste momento a apicultura foi se modernizando, por volta do Século XIX iniciou o avanço desta cultura, com o surgimento da criação dos quadros móveis, permitindo a produção de grandes quantidades de mel, pólen e outros produtos de grande comercialização (FREIRE, 2004).

As colméias são peças fundamentais na prática de uma apicultura racional. O desenvolvimento de peças móveis (tampas, findos, quadros, etc) permitiram a exploração dos produtos apícolas de forma contínua e racional, sem dano para as abelhas. Uma colméia racional é subdividida em: tampa, sobrecaixa (melgueira ou sobreninho), ninho e fundo e os quadros (caixilhos). A manutenção das medidas padrões para cada modelo também é essencial (EMBRAPA, 2008).

As peças móveis, assim como os quadros móveis permitem que o apicultor inspecione o interior da colméia, realizando intervenções como a remoção de favos velhos, controlando o foco de pragas (como exemplo traças), mudando a posição dos quadros, prevenindo a enxameação, podendo ser usado lamina de cera alveolada que produzem enormemente o trabalho das abelhas, possibilita o emprego de alimentadores artificiais, que irão garantir o alimento á

família durante todo o período de outono e inverno, o que permite o reaproveitamento dos favos. Além dessas vantagens, as colméias dotadas de quadros móveis, podem ser fortalecidas com a introdução de um quadro de mel ou de crias de outra colméia (FREIRE, 2004).

3.3.1 TIPO DE COLMÉIA

Hoje, o apicultor tem conhecimento de mais de 300 tipos diferentes de colméia, sendo que a variável está relacionada em função da adaptação climática, manejo, entre outros. Porém, todas têm em comum a mesma constituição básica o que corresponde ao fundo, o assoalho, o ninho (compartimento reservado ao desenvolvimento da família), a melgueira (local destinado ao armazenamento do mel), os quadros (onde são moldados os favos de mel ou de cria) e a tampa (FREIRE, 2004).

Para a construção das colméias, podem ser utilizados diferentes materiais, como a madeira, fibra de vidro, amianto, concreto, isopor, etc. Entretanto, a maioria das colméias é confeccionada em madeira, pois são mais práticas e econômicas (FREIRE, 2004).

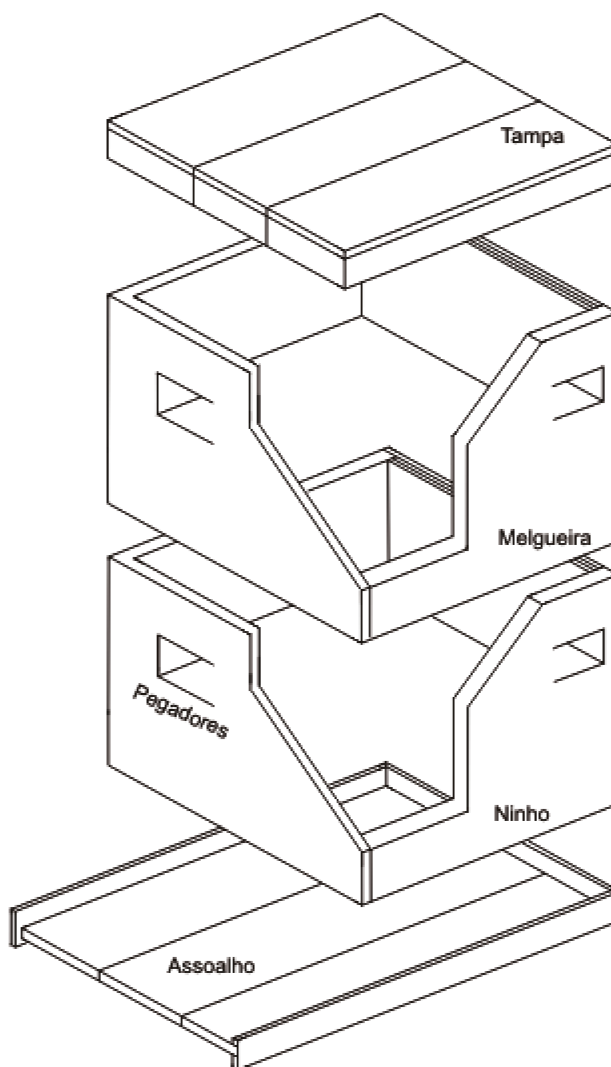


Figura 3.3.1.1 Colméias

Em 1851 o americano *Lorenzo Lorane Langstroth* definiu a colméia como o “espaço da abelha”, sendo o espaço necessário à passagem de uma abelha, como o espaço regular reduzido, a abelha une as duas partes com própolis, e a distância maior elas constroem mais um favo de cera. Desta forma, Langstroth

determinou que o espaço deve ser entre 4,7mm a 9mm, caso a medida seja menor que a indicada impedirá a circulação das abelhas, pois caso seja maior poderá ser obstruído pela construção de favos ou pelo própolis. Langstroth ficou conhecido pela revolução ocasionada na apicultura, com as primeiras colméias móveis, iniciando assim a era da colméia mobilística (FREIRE, 2004; NEUMAIER, 1998).

Como se pode observar no Esquema 3.3.1.1, o qual demonstra as partes que constituem a colméias padrão (Langstroth), para maior comodidade das abelhas e do apicultor. Este modelo de colméia é recomendado pela Confederação Brasileira de Apicultura (FREIRE, 2004; NEUMAIER, 1998; SOSNOWSKI, 2005).



Esquema 3.3.1.1 – Colméia padrão

As caixas podem ser compradas ou feitas pelo apicultor, estas devem ser pintadas com tinta de cor clara e de boa qualidade, o que ajuda na conservação do material, porém as caixas das colméias não podem ser pintadas internamente (NEUMAIER, 1998).

Desta forma, a colméia Langstroth que possuem quadros moveis, tem como vantagens (SEGEREN, 2004):

- Os favos de criação podem ser separados dos favos de mel de forma simples;
- Os favos são fixos aos quadros, tornando-se possível trabalhar com os favos de forma rápida e mais simples, e possibilitando o transporte seguro sem risco de partirem;
- Os favos podem ser utilizados durante vários anos, desde que não sejam interessados na produção de cera, mas principalmente na coleta de mel.

3.3.2 TIPOS DE COLETORES PARA O PÓLEN

Sabe-se que na apicultura existem vários tipos de coletores de pólen apícola, que são localizados entre a entrada da colméia e a câmara de cria, desenvolvido para reter uma parte ou o total do pólen recolhido pelas abelhas, sendo um obstáculo em sua estrutura por onde as abelhas são obrigadas a passar quanto retornam para a colméia.

Na Figura 3.3.2.1 demonstra a posição do coletor de pólen apícola, sendo que este deve ser colocado entre o compartimento da câmara de cria com a colméia, reduzindo o espaço de passagem da abelha com o pólen.



Figura 3.3.2.1 Colméia com o coletor de pólen amostra.

Hoje em dia, não existe um consenso nacional quanto ao tipo de coletor usado pelos apicultores, ou seja, o tipo de caça-pólen pode variar de acordo com o estado ou de produtor para produtor. Assim temos, equipamentos como o Tipo Tropical Africanizado, o Tropical Africano Baiano (Figura 3.3.2.2), este desenvolvido no sul da Bahia. Nestes tipos de coletores a tela de retenção no alvado, é posicionada de maneira inclinada e a caixa receptora do pólen atinge uma dimensão de três vezes maiores do que o coletor original (BARRETO, *et al.*, 2003).

Outro tipo de coletor de bolotas de pólen foi testado pelo Centro de Estudos Apícolas da Universidade Estadual de Taubaté e pelo Setor de Apicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, corresponde a um coletor de plástico (Figura 3.3.2.5) que permitirá melhor higienização do equipamento de coleta, contribuindo diretamente na qualidade do produto final a partir do pólen, além deste coletor, tem-se ainda o Tipo Frontal (modelo ICEPAL) (Figura 3.3.2.4), e o tipo intermediário interno (Figura 3.3.2.3) (BARRETO, *et al.*, 2003).



Figura 3.3.2.2 Coletor tipo Tropical Africanizado-Baiano.



Figura 3.3.2.3 Coletor tipo Intermediário Interno.



Figura 3.3.2.4 Coletor tipo frontal de pólen.



Figura 3.3.2.5 Coletor tipo plástico injetado (teste).

Depois da seleção do modelo do coletor ou caça-pólen, o apicultor deve colocar este nas colméias sem tela durante um período de 24 a 48 horas para a adaptação das abelhas com a nova entrada (LENGLER, 1999).

O coletor de pólen apresenta uma tela com orifícios por onde será a entrada das abelhas possuindo um diâmetro de 4,5mm até 5mm, medida adequada para a passagem das abelhas e também não pode apresentar rebarbas evitando causar danos físicos, como perda de asas ou patas, e possíveis ferimentos. As telas possui uma medida de 3mm de espessura, evitando o uso das telas metálicas, sendo que as gavetas devem ser higienizadas a cada coleta para amenizar o risco

de contaminação do pólen. A coleta pode ser feita diariamente ou de dois em dois dias dependendo o coletor usado pelo apicultor (LENGLER, 1999).

3.3.3 MEDIDAS DE CONTROLE NA COLETA E NO TRANSPORTE DO PÓLEN

Segundo LENGLER (2007) algumas medidas podem ajudar o controle de qualidade desta matéria, relacionado com a limpeza, transporte e o processo de congelamento, como:

- A limpeza dos coletores deve ser feita diariamente logo após a coleta do pólen;
- Para o transporte do pólen fresco deve-se usar sacos plásticos, caixas receptoras de pólen, baldes plásticos, caixas plásticas organizadoras retangulares com base larga e baixa altura até a sala de beneficiamento;
- Na sala de beneficiamento o pólen cuidadosamente deve passar por uma limpeza de material estranho;
- Seguindo para o congelamento, em bandejas plásticas com no máximo de 2,5 quilos para evitar o empelotamento do mesmo durante o processo de congelamento que pode chegar até 2 horas.

O pólen, durante a coleta pode ser contaminado com impurezas como, fragmentos de abelhas, resíduos vegetais, poeiras, própolis, etc. Essas impurezas devem ser retiradas manualmente durante a etapa de limpeza do material, recomenda-se a utilização de uma pinça, para a retirada de partículas feita com a própolis é usual estender um pano limpo sobre o pólen, desta forma, a própolis presente irá migrar para a superfície se aderindo ao pano (MORETI, 2006).

3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICAS E PROPRIEDADES

O pólen apícola consiste em uma mistura de grãos de pólen derivados de espécies de plantas de uma determinada localidade (SCHMIDT & BUCHMANN, 1992).

Tornando-se uma rica fonte de nutrientes, tendo em vista seu papel na reprodução da planta (SHUEL, 1992). Quanto à sua função na colméia, o pólen

possui uma grande importância na alimentação das abelhas, pois é a principal fonte de proteína, minerais e lipídios, sem os quais as abelhas não teriam condições de desenvolver satisfatoriamente seus órgãos e glândulas, tão importantes na produção de cera, geléia real e feromônios (COUTO & COUTO, 2002). Segundo CAMPOS, *et al.*, (1996), o pólen supre o requerimento vitamínico das abelhas melíferas, pois não existem evidências de que tais substâncias possam ser sintetizadas pelos insetos. Desse modo, o pólen supre todas as necessidades nutricionais para o desenvolvimento das larvas das abelhas adultas (SHMIDT & BUCHMANN, 1992).

O reconhecimento do pólen como um alimento de excelente qualidade para o homem abriu perspectivas favoráveis à sua exploração como mais uma fonte de renda para o apicultor.

O pólen é considerado como um alimento natural, saudável e de elevado valor nutritivo. Reconhece-se que as abelhas coletam pólen, devido ao seu alto conteúdo de proteínas. Aproximadamente metade da fração protéica está na forma de aminoácidos livres, os quais podem ser assimilados imediatamente pelo organismo (CAMPOS, *et al.*, 1996).

Na sua composição está presente grande quantidade de aminoácidos essenciais, ácidos graxos, vitaminas, oligo-elementos, fibras vegetais, minerais e moléculas protéicas como flavonóides (LENGLER, 1999). Além de possuir quantidades de resina, corante, enzimas e coenzimas (MORETI, 2006).

Com relação à composição química, existem consideráveis variações quantitativas entre as diferentes espécies de plantas, das quais abelhas coletam o pólen. De modo geral, a composição nutricional do pólen apícola revela que a proteína é o principal componente do pólen, com um valor médio de aproximadamente 24%. Os carboidratos constituem, em média, 2% do pólen coletado e consistem, principalmente, de açúcares simples como frutose e glicose. O pólen contém um teor médio de 5% de gorduras, sendo parte lipídios hidrocarbonos ou ceras, os quais dificilmente são digeridos e absorvidos pelo organismo e, portanto, contribuem com poucas calorias. Além disso, o pólen contém minerais, como potássio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, manganês e

cobre. Assim como a maioria das plantas, o pólen contém baixos níveis de sódio. O pólen apícola é rico na maior parte das vitaminas do complexo B, incluindo tiamina, niacina, riboflavina, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina. Apresenta níveis variáveis de vitamina C, devido a esta ser lábil e, portanto, facilmente degradada durante o processamento e armazenamento do produto (SHMIDT & BUCHMANN, 1992).

De acordo com LENGLER (2007), o pólen é uma fonte preciosa de oligo-minerais (cobalto, níquel, silício, titânio, entre outros) com mais de 22 elementos, que o organismo humano necessita em pequenas quantidades e que não existem na maioria dos produtos alimentícios. Estes elementos estão sendo demonstrados de importância, através da medicina ortomolecular, para o bom funcionamento do organismo.

BASTOS, *et al.*, (2003) realizou estudos em amostras de pólen desidratados comercializados na região de São Paulo e Minas Gerais, avaliando o teor de lipídio, resultando em torno de 6,1 a 14% de lipídios na base seca, com relação ao teor de proteína os valores variam entre 16 e 27,5% e o teor de aminoácidos pode chegar a cerca de 26% do teor de proteína. Em decorrência da quantidade de aminoácidos presente no pólen, listou os indispensáveis à vida, ou seja, aqueles que o organismo são incapazes de sintetizar, entre eles encontram-se: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (DONADIEU, 2002).

Todavia MORETI (2006) relatou que os principais aminoácidos encontrados em sua composição são principalmente arginina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e prolina (o mais abundante). São observados também carboidratos (cerca de 29%) que são formados por açúcares reduzidos e quantidades insignificantes de glicose, frutose, rafinose e amido.

Segundo PROST (1985) o pólen fresco apresentou a seguinte composição entre 30 a 40% de água, 11 a 35% de proteína, de 20 a 40% de glicídio, 1 a 20% de lipídeos, minerais de 1 a 7%.

O valor das substancias varia de acordo com as fontes, como exemplo o pólen de origem do Pnius é diferente do obtido da Palmácea, sendo que uma mistura de diferentes fontes botânicas propicia uma dieta balanceada e é isso que a abelha costuma fazer de modo que, em média o pólen coletado por abelhas compara-se em conteúdo protéico com o dos feijões, ervilhas e lentilhas.

Nota-se que o pólen é um complexo de componentes, pois apresenta uma composição química muito diversificada e altamente rica, que provavelmente até agora não totalmente elucidada, oferece condições ao bom funcionamento do organismo humano, devido às substâncias indispensáveis presente em sua estrutura.

Desta forma, os autores como KROYUER & HEGEDUS (2001) e BASTOS, *et al.*, (2003), relata os benefícios do consumo de pólen apícola, como fortificante extraordinário do organismo, estimulante e gerador de bem estar e vigor físico, corrigindo também a alimentação deficiente resultando no equilíbrio funcional.

3.5 FORMAS DE COMERCIALIZAÇÃO

Na atualidade, o desenvolvimento de produtos naturais voltado ao consumo cresce a cada dia e com a descoberta científica dos possíveis benefícios que os produtos apícolas, como os que o pólen possui, o mercado de naturais vem investindo em inovação.

Pode se encontrar, o pólen na forma pulverizada, esta é obtida passando as pelotas no moinho de café ou liquidificador, para a obtenção de um pó, sendo conservado em embalagem hermética (LEGLER, 1999).

Outra forma é o extrato de pólen, um creme obtido a partir do pólen granulado, sem elementos alergênicos, segundo SILVA (1994), apresentando compostos como a Vitamina E, ácidos graxos, flavonóides e hormônios esteróides.

O pólen pode ser associado a outros produtos apícolas, como o mel, o própolis e a geléia real, porém estas combinações devem ser descritas em sua rotulagem, assim como descrito no serviço DIPA nº002/04 (FARIA, 2004).

Desta maneira, pode se encontrar o pólen com diversas aplicações em produtos para o consumo, diversificando os modos para aproveitar os recursos oferecidos por este material apícola.

3.6 BENEFÍCIOS À SAÚDE HUMANA ATRIBUIDOS AO PÓLEN

O pólen é um alimento que certamente age como complemento alimentar natural, pois possui vantagem como alimentos devido a sua rica composição nutricional que pode nos ajudar sobre o plano terapêutico.

Exames clínicos realizados no Leste da Europa comprovaram a eficiência no uso do Mel com Pólen, no tratamento da ansiedade, como problemas com o sistema nervoso e endocrinológico (APACAME, 2008).

Os níveis de flavona são de 2,54gramas para 100gramas, sendo que os compostos flavonóides têm funções de prevenir as arterioscleroses, diminuir os níveis de colesterol, aliviar a dor e proteger de radiações (LENGLER, 2007).

O pólen é um alimento rico em ferro, em vitaminas do grupo B (particularmente B12), desta forma, tem capacidade de recuperar pacientes com anemia, pois tem a possibilidade de regenerar os números de glóbulos vermelhos ou aumentar a hemoglobina presentes no sangue, assim como a reestruturação dos tecidos (LENGLER, 1999).

Na China avaliaram o poder do pólen de reduzir o colesterol, sendo que pacientes com taxas de colesterol de 279mg/dl e lipídios neutros de 210mg/dl, após um período de dois meses de administração do consumo de pólen observaram que as taxas de colesterol reduziram para 158mg/dl e 102mg/dl (LENGLER, 2007).

Devido os seus componentes benéficos a saúde humana, possuindo uma vasta aplicação, assim como apresentado por LENGLER (1999) em relação à presença da vitamina A que tem um papel importante na visão noturna, na reconstituição da mucosa e da pele, no crescimento e reprodução, tendo efeito igualmente benéfico sobre o cansaço ocular. O déficit de vitamina A, por falta na alimentação pode provocar uma dificuldade para vista quando está na escuridão e aurora, pois a vitamina A é indispensável para a fabricação da retina.

Desta forma, o pólen ainda é uma matéria prima pouco estudada para determinar mais claramente a composição do pólen para que através dela se conheça os seus efeitos terapêuticos como um todo, assim como seus mecanismos de ações e indicações (DONADIEIU, 2002).

Todavia, o pólen é considerado como suplemento alimentar com o objetivo de prevenção a saúde, em grande parte dos países, porém não é considerado como um suplemento pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos (KRELL, 1996)

3.7 PADRÕES DE QUALIDADE DO PÓLEN APÍCOLA

O controle para produtos coletados nas colméias é seguido pela Instrução Normativa Nº. 3 de 19 de Janeiro de 2001, anexo V, considerando que é necessário instituir medidas que normatizem a industrialização de produtos de origem animal, garantindo condições de igualdade entre os produtores e assegurando a transparência na produção, processamento e comercialização (BRASIL, 2001a).

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola define pólen apícola como sendo o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada por abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colméia e pode ser classificado de duas maneiras, como o pólen apícola que é o produto coletado em sua forma original que deve conter no máximo 30% de umidade ou pode ser classificado como desidratado que é o produto submetido ao processo de desidratação em temperaturas superior a 42°C e com teor de umidade não superior a 4% (BRASIL, 2001a).

Desta forma, em virtude da inexistência de parâmetros microbiológicos específicos para o pólen no Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos da ANISA (BRASIL, 2001b), pode-se adotar como base de pesquisa dos microrganismos referentes ao grupo 10 que contempla farinhas, massas alimentícias, produtos para e de panificação, (industrializados e

embalados) e similares incluindo na letra N os alimentos como a granola, e mistura de cereais não compactados, com ou sem adição, e similares que:

- ***Bacillus cereus***: limite 5×10^3 UFC/g;
- **Coliformes a 45°C**: limite 5×10^2 UFC/g;
- **Estafilococos coagulase positiva**: limite 10^3 UFC/g;
- ***Salmonella***: ausência em 25g

O pólen apícola também é foco de estudos na Argentina, tendo como norma de padrão de qualidade o Código Alimentario Argentino, descrito no Artigo 785 (RES 1550) que o pólen sendo um elemento masculino das flores, recolhido por abelhas operárias e depositados na colméia e aglutinado em grãos por uma substância elaborada pelas mesmas abelhas (ARGENTINA, 2004).

Definindo que o pólen deve ser limpo, seco, sem insetos, larvas e apresentar um odor característico de acordo com a espécie da flor proveniente. Este pode ser secado artificialmente, sempre que o processo não exponha os grãos à luz direta, em temperatura de ar corrente usada para a secagem seja maior que 55°C (ARGENTINA, 2004).

O pólen deve responder as seguintes características analíticas de composição: umidade cerca de 8%, cinzas 4%, 15 a 28% de proteínas, pH de 4 a 6 e carboidratos em torno de 45 a 55% (ARGENTINA, 2004).

ARANDA (1999) utilizou esta resolução para análises investigativa nas amostras de pólen, adotando-se os seguintes microrganismos:

- **Aeróbios Mesófilos**: limite 10^4 UFC/g;
- **Coliformes totais**: ausência em 0,1g
- ***Escherichia coli***: ausência em 1g
- **Estafilococos coagulase positiva**: ausência em 0,1g
- ***Salmonella***: ausência em 30g
- **Bolores e Leveduras**: limite 3×10^2 UFC/g

Conhecendo-se os possíveis contaminantes do pólen apícola e considerando-se a inexistência de tecnologias que visem sua descontaminação durante o processamento, o presente estudo será realizado com o propósito de avançar nos padrões higiênico-sanitários do produto, visando fornecer subsídios

aos órgãos competentes, para o possível estabelecimento de padrões microbiológicos para pólen apícola. Além disso, pretende-se apontar ações preventivas, no sentido de reduzir os riscos ao consumidor. Apenas alguns países, como a Suíça e Argentina, têm o Pólen como aditivo alimentar com normas de qualidade e limites estabelecidas (KRELL, 1996).

Verificando-se que ainda não existe uma norma ou resolução nacional para controle de qualidade em nível microbiológico para esta matéria-prima, porém pode se adaptar a resolução ou artigos encontrados internacionalmente para confeccionar um possível regulamento de qualidade para os produtos apícolas já conhecidos e consumidos no Brasil.

3.8 IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS NOS ALIMENTOS

Os microrganismos presentes nos alimentos podem representar riscos à saúde. Estes microrganismos são genericamente denominados patogênicos, podendo afetar tanto o homem como os animais. As características das doenças que esses microrganismos causam, dependem de uma série de fatores inerentes ao alimento, ao microrganismo patogênico em questão e ao indivíduo a ser afetado. Os microrganismos patogênicos podem chegar até o alimento por inúmeras vias, sempre refletindo condições precárias de higiene durante a produção, processamento, armazenamento e distribuição ou manuseio em nível doméstico (FRANCO, 1996b).

Embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar no País seja bastante elevada. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doenças desta natureza é significativa e vem aumentando, apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As principais fontes de contaminação de alimentos por microrganismos normalmente estão presentes na sua própria cadeia produtiva. De maneira geral essas fontes incluem: solo e água, utensílios, trato intestinal do homem e de

animais, manipuladores de alimentos, ar e poeira, entre outros (FRANCO, 1996b; JAY, 2000).

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos que estão presentes em um alimento depende de uma série de fatores. Entre esses fatores, estão àqueles relacionados com as características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos). São considerados fatores intrínsecos a atividade de água (A_w), o pH, a composição química, a presença de fatores antimicrobianos naturais e as interações entre os microrganismos presentes nos alimentos. Entre os fatores extrínsecos, os mais importantes são umidade e temperatura ambiente e também a composição química da atmosfera que envolve o alimento (FRANCO, 1996c).

Para que a multiplicação microbiana seja possível, os seguintes nutrientes devem estar disponíveis: água, fonte de energia, fonte de nitrogênio, vitaminas e sais minerais. Como fonte de energia, os microrganismos podem utilizar açúcares, álcoois e aminoácidos. As fontes de nitrogênio mais importantes para os microrganismos são os aminoácidos, mas uma grande variedade de outros compostos nitrogenados também pode ser utilizada. As vitaminas são importantes fatores de crescimento de microrganismos, uma vez que fazem parte de diversas coenzimas envolvidas em várias reações metabólicas. Entre as vitaminas, as mais importantes são as do complexo B, como a biotina e o ácido pantotênico. Embora necessários em quantidades muito reduzidas, os minerais são indispensáveis para a multiplicação microbiana, pois estão envolvidos em muitas reações enzimáticas. Entre esses minerais, merecem destaque o sódio, o potássio, o cálcio e o magnésio. Outros, como ferro, cobre, manganês, molibdênio, zinco, cobalto, fósforo e enxofre podem ser igualmente importantes (FRANCO, 1996c). Portanto, com base na composição química do pólen apícola, é possível inferir que o produto seja um rico substrato para a proliferação de microrganismos.

O conhecimento dos fatores intrínsecos e extrínsecos que agem sobre determinado alimento permite prever sua vida útil, sua estabilidade microbiológica,

bem como conhecer a capacidade de crescimento e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes (FRANCO, 1996c).

3.8.1 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E INDICADORES NOS ALIMENTOS

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias da matéria-prima e do alimento durante o processamento, produção ou armazenamento (LANDGRAF, 1996a; JAY, 2000).

Considerando o número total de espécies bacterianas existentes na natureza, relativamente poucas são as importantes para os alimentos. No grupo das bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas está incluída a família *Enterobacteriaceae*, entre as quais se encontram os gêneros *Escherichia* e *Salmonella*, entre outros (FRANCO, 1996b).

Os microrganismos podem ser classificados como patogênicos e deteriorantes. Os patogênicos, devido à capacidade de provocar doenças no consumidor e os deteriorantes pelo fato de reduzir a vida útil dos mesmos, implicando em grandes perdas econômicas especialmente ao produtor (JAY, 2000).

No grupo das bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas, pode se destacar os gêneros *Escherichia* e *Samonella*, entre outros (FRANCO, 1996b; JAY, 2000; KUSHIDA, 2005).

No gênero *Escherichia*, a principal espécie é *E. coli*, que pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes, que são indicadores de contaminação fecal de alimentos. *E. coli* pode causar reações indesejáveis nos alimentos, além de várias linhagens serem patogênicas para o homem e os animais (FRANCO, 1996b). O uso de *Escherichia coli* como um indicador de contaminação de origem fecal presente em água foi proposto em 1892, uma vez que esse microrganismo é encontrado no trato intestinal do homem e dos animais (LANDGRAF, 1996a).

As bactérias pertencentes ao grupo coliformes fecais e *Escherichia coli* correspondem aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44 a 45,5°C. Nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica. A pesquisa de coliformes fecais ou de *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (LANDGRAF, 1996a).

Em alimentos vegetais frescos, o único indicador válido de contaminação fecal é a *E. coli*, uma vez que os demais indicadores de contaminação fecal são encontrados naturalmente nesse tipo de alimentos. Em alimentos processados, a presença de um número considerável de coliformes ou de *Enterobacteriaceae* indica: processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, sendo as causas mais freqüentes aquelas provenientes da matéria-prima, equipamento sujo ou manipulação sem cuidados de higiene; proliferação microbiana, que poderia permitir a multiplicação de microrganismos patogênicos e toxigênicos (LANDGRAF, 1996a).

O gênero *Salmonella* compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose (exceto *S. typhi*) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. O pH ótimo para multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas (KUSHIDA, 2005). Dependendo da natureza do ácido utilizado para a acidificação, o pH mínimo pode subir para 5,5. A temperatura ideal para multiplicação de *Salmonella* é 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C. Vários estudos indicam, no entanto, que valores máximo e mínimo dependem do sorotipo (FRANCO e LANDGRAF, 1996). O habitat natural das salmonelas é o trato intestinal de seres humanos e dos animais (SIQUEIRA, 1995).

No grupo dos cocos Gram-positivos estão incluídas bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas da família *Micrococaceae* (*Micrococcus* e

Staphylococcus), entre outros. Os *Staphylococcus* são anaeróbios facultativos, sendo encontrados em muitos alimentos, mas não competem bem com os outros microrganismos presentes. Os *Staphylococcus aureus* podem ser produtores de enterotoxinas nos alimentos, causando intoxicação quando consumidos. Os *S. aureus* são encontrados em lesões de pele e nas vias aéreas superiores do homem, sendo facilmente transferidos para os alimentos (FRANCO, 1996b).

A presença de números elevados de *S. aureus* é uma indicação de perigo potencial à saúde pública, devido à enterotoxina estafilocócica, bem como à sanificação questionável, principalmente quando o processamento envolve manipulação do alimento (LANDGRAF, 1996a), considerando que seu habitat natural são cavidades nasais, garganta e trato intestinal do homem (SIQUEIRA, 1995).

Os estafilococos são bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 a 47,8°C; as enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46°C, com ótimo entre 40 e 45°C. Os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros, que devem encontrar-se em condições ótimas. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram neste intervalo de temperatura por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior será o tempo necessário para a produção de enterotoxina. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente em quatro a seis horas. Em relação ao pH, *S. aureus* cresce na faixa de 4 a 9,8, com ótimo entre 6 e 7. Considerando a *Aw*, os estafilococos são os únicos microrganismos não esporulados capazes de crescerem em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halófilas. O valor mínimo da *Aw* considerado, atualmente, é de 0,86 apesar de, sob condições ideais, esta bactéria já ter se desenvolvido em *Aw* de 0,83 (FRANCO e LANDGRAF, 1996; JAY, 2000).

O grupo de bacilos Gram-positivos produtores de esporos abriga os gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*. Este grupo abriga espécies patogênicas como *B. cereus*, que causam gastroenterites de origem alimentar (FRANCO, 1996b).

Bacillus cereus multiplica-se bem entre 10 e 48°C, apresentando um ótimo de temperatura entre 28 e 35°C. A atividade de água mínima necessária para seu crescimento é 0,95. A faixa de pH em que ocorre multiplicação varia entre 4,9 a 9,3 (FRANCO e LANDGRAF, 1996). O habitat natural do *B. cereus* é o solo, poeira e água (SIQUEIRA, 1995).

Os bolores são menos exigentes que as leveduras e que as bactérias em relação à umidade, pH, temperatura e nutrientes. Estes são, em sua absoluta maioria, aeróbios, razão pela qual seu crescimento nos alimentos limita-se à superfície em contato com o ar (FRANCO, 1996a).

Definem-se leveduras como fungos, cuja forma predominante é unicelular. De modo geral, as leveduras requerem menos umidade que a maioria das bactérias e mais umidade que a maioria dos bolores. A temperatura ideal para seu crescimento varia entre 25 e 30°C, com algumas exceções. O crescimento é favorecido pelo pH ácido. As leveduras multiplicam-se melhor quando estão em aerobiose, mas os tipos fermentativos multiplicam-se bem também em anaerobiose. Açúcares são a melhor fonte de energia, embora leveduras oxidativas sejam capazes de oxidar ácidos orgânicos e álcool (FRANCO, 1996a). A presença de bolores e leveduras pode tornar-se um perigo à saúde pública, devido à produção de micotoxinas pelos bolores.

As fontes de microrganismos presentes no pólen apícola são os do habitat natural e manipulação humana, ou seja, leveduras, fungos, bactérias formadoras de esporos e cocos (GILLIAM, 1979a, b; SERRA BONVEHÍ & LOPEZ ALEGRET, 1986, SERRA BONVEHÍ & ESCOLÀ JORDÀ, 1997). Um valor elevado de atividade de água aumenta o número de microrganismos em pólen apícola não só pelos microrganismos propriamente ditos, mas também para os seus metabólitos, especialmente aflatoxinas (GONZÁLES, *et al.*, 1995).

3.8.2 CONTROLE DE MICRORGANISMOS POR DESIDRATAÇÃO

O controle microbiano por meio da desidratação talvez seja o método mais antigo de conservação de alimentos. A observação pelo homem, já em tempos remotos, de que as sementes secas dos alimentos podiam ser armazenadas de uma estação do ano para outra é um dado da longevidade desse método, que se baseia no fato de que tanto os microrganismos como as enzimas precisam de água para sua atividade. Portanto, para se conservar um alimento por esse método, diminui-se o conteúdo de água até o ponto em que ocorra a inibição dos microrganismos deteriorantes e dos causadores de doenças de origem alimentar (LANDGRAF, 1996b).

Alimentos secos, desidratados ou com baixa umidade são os que apresentam, geralmente, teor de umidade inferior a 25% e atividade de água inferior a 0,60. Nesta categoria, estão incluídos os alimentos secos tradicionais e os alimentos liofilizados. Os alimentos que apresentam atividade de água entre 0,60 e 0,85 são denominados alimentos com umidade intermediária (LANDGRAF, 1996b).

Apesar de a primeira razão para a desidratação dos alimentos ser a prevenção do crescimento microbiano, outras razões podem ser enumeradas, entre elas: prevenção das alterações químicas ou físicas no alimento, induzidas ou auxiliadas pelo excesso de umidade; redução dos custos com embalagem, armazenamento e transporte; preparação de produtos para processos, nos quais somente produtos desidratados possam ser utilizados; remoção da umidade adicionada em operações de processamento (LANDGRAF, 1996b).

Na Legislação Brasileira não existem de padrões microbiológicos para pólen apícola. O Código Alimentar Argentino impõe limites para os microrganismos aeróbicos não patogênicos (máximo 150×10^3 UFC/g), fungos (10^2) e ausência de microrganismos patogênicos e máximo de 8% de umidade e temperatura de secagem não superior a 55°C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises físico-químicas das amostras de pólen apícola *In Natura*, Desidratado e Comercial foram realizadas no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba, localizado no município de Pindamonhangaba-SP. As análises microbiológicas das amostras do pólen apícola foram realizadas no laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos, localizado em Campinas.

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de pólen apícola foram obtidas no apiário experimental instalado na área de pesquisa em Apicultura do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba, localizado no município de Pindamonhangaba – SP (22°57'S, 45°27'W, 560m), órgão pertence a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

Para a obtenção das amostras foram instaladas seis colônias, escolhidas por sua uniformidade e com população forte de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), nas quais foram colocados equipamentos coletores de pólen. As colônias foram mantidas ao ar livre sobre cavaletes de madeira a 50cm do solo, em colméias *Langstroth*. Foi utilizado equipamento coletor de pólen do tipo de fundo e tela interceptadora de pólen constituída de chapa de acrílico com 3mm de espessura com orifícios circulares com diâmetro de 4,3 a 4,5mm.

Semanalmente cada colônia recebeu três a quatro litros de alimentos energéticos (xarope de açúcar a 60%) em alimentador Boardman. As colônias coletoras de pólen também foram suplementadas com 100gramas de substituto protéico, elaborado com pólen, farinha de soja desengordurada (1:3) e xarope de açúcar (1:1), colocado sobre os quadros de cria, em sacos plásticos com fendas, para facilitar o acesso das abelhas.

O pólen foi coletado no período da manhã, precisamente às 7 horas e 30 minutos, de modo que as coletas fossem realizadas com os seguintes intervalos

de tempo: a cada, 24 horas, a cada 48 horas e a cada 72 horas. A frequência de coleta, para cada intervalo de tempo, foi de três vezes, por exemplo, o pólen que permaneceu no coletor por 24 horas foi coletado por três dias consecutivos. Este procedimento foi adotado para os demais períodos determinados. Cada amostra consistiu do somatório do pólen presente nas seis colônias. Este procedimento foi adotado para os demais intervalos de tempo e visou aquisição de quantidade de amostra suficiente para as determinações analíticas.

Alem disso, foram adquiridas 10 (dez) amostras de pólen apícola comercializadas no mercado varejista do Estado de São Paulo, possuidoras de SIF.

4.2 PROCEDIMENTO PARA COLETA DAS AMOSTRAS

A Figura 4.2.1 mostra o equipamento necessário, utilizado pelo apicultor para a realização da coleta do pólen depósitos nos coletores.



Figura 4.2.1 Início da retirada do coletor da colméia para coleta do pólen.

Nas Figuras 4.2.2 e 4.2.3 notou-se o depósito do pólen feito pelas abelhas, pois ao entrarem pelo orifício deixam o pólen retido devido ao diâmetro da entrada ao passarem para o interior da colméia.



Figura 4.2.2 Retirada do coletor com o pólen apícola depositado.



Figura 4.2.3 Coleta do pólen deixado pela abelha.

A Figura 4.2.4 apresentou a maneira realizada para a substituição dos coletores após a retirada, sendo que os coletores foram previamente higienizados e secos, trocados para evitar resquícios de pólen que ficam presos às grades, contaminando o próximo pólen a se colhido.



Figura 4.2.4 Quarto passo substituição dos coletores.

Como se observou na seqüência as Figuras 4.2.5 e 4.2.6, demonstram a retirada dos coletores e o acondicionamento do mesmo para o transporte, feito em um suporte de plástico.



Figura 4.2.5 Retirada dos coletores com o pólen.



Figura 4.2.6 Acondicionamento dos coletores com pólen.

A Figura 4.2.7 detalha como o coletor se acondiciona para o transporte até a área de beneficiamento.



Figura 4.2.7 Acondicionamento dos coletores para o transporte

O apicultor leva a produção do pólen apícola até o local a ser processado, local este representado na Figura 4.2.8.



Figura 4.2.8 Local de processamento do pólen

Todos os equipamentos e utensílios foram higienizados com solução de hipoclorito a 200ppm por 30 minutos, e a limpeza de bancada foi feita com álcool 70%, evitando possível contaminação cruzada. Como pode-se observar nas Figuras 4.2.9, 4.2.10, 4.2.11 e 4.2.12.



Figura 4.2.9 Higienização da bancada.



Figura 4.2.10 Higienização dos utensílios.



Figura 4.2.11 Higienização dos materiais.



Figura 4.2.12 Higienização dos coletores.

Nas Figuras 4.2.13 e 4.2.14, os coletores são higienizados em tambores com a solução de hipoclorito a 200ppm, e secos na estufa, para a segurança de sua desinfecção.



Figura 4.2.13 Coletor a ser colocado na estufa.



Figura 4.2.14 Estufa para colocar os coletores.

A secagem dos coletores foi realizada evitando-se as alterações indesejáveis no pólen recolhidos pelas abelhas. Após a secagem estes coletores, foram levados até as colméias para a substituição dos coletores.

O pólen quando chega à área para o processamento, ele é despejado em bandejas para iniciar o processo de remoção das impurezas como mostra a Figura 4.2.15 e 4.2.16.



Figura 4.2.15 Chegada do pólen apícola para o processamento.



Figura 4.2.16 Retirada do pólen apícola dos coletores.

Procedimento de retirada de detritos como partes das abelhas, asas, patas, ou alguma outra sujeira, é feito através da limpeza manual antes do processo de desidratação do mesmo, este procedimento foi realizado com o auxílio da pinça como visto na Figura 4.2.17.

Na Figura 4.2.18 está o pólen sem partículas indesejáveis, ou seja, sem os possíveis contaminantes macroscópicos provenientes da colheita, pronto para o processo de desidratação.



Figura 4.2.17 Limpeza e remoção de partícula indesejáveis do pólen.



Figura 4.2.18 Pólen sem sujidades.

O pólen apícola depois de passar pelo processo de limpeza e remoção das sujidades provenientes da coleta, ainda na forma *IN NATURA* foi pesado e fracionado para a realização das análises pertinentes, como microbiológicas e físico-químicas para a avaliação da qualidade higiênico-sanitário referente ao

processo de coleta. Como pode-se observar na Figura 4.2.19 e 4.2.20, que encontra-se a embalagem individual já fracionada para as devidas análises.



Figura 4.2.19 Pólen já embalado para ser realizado a análise.



Figura 4.2.20 Embalagem com o pólen apícola.

Depois da divisão as amostras foram destinadas ao beneficiamento, sendo acondicionada em sacos plásticos (como isto nas Figuras 4.2.19 e 4.2.20).

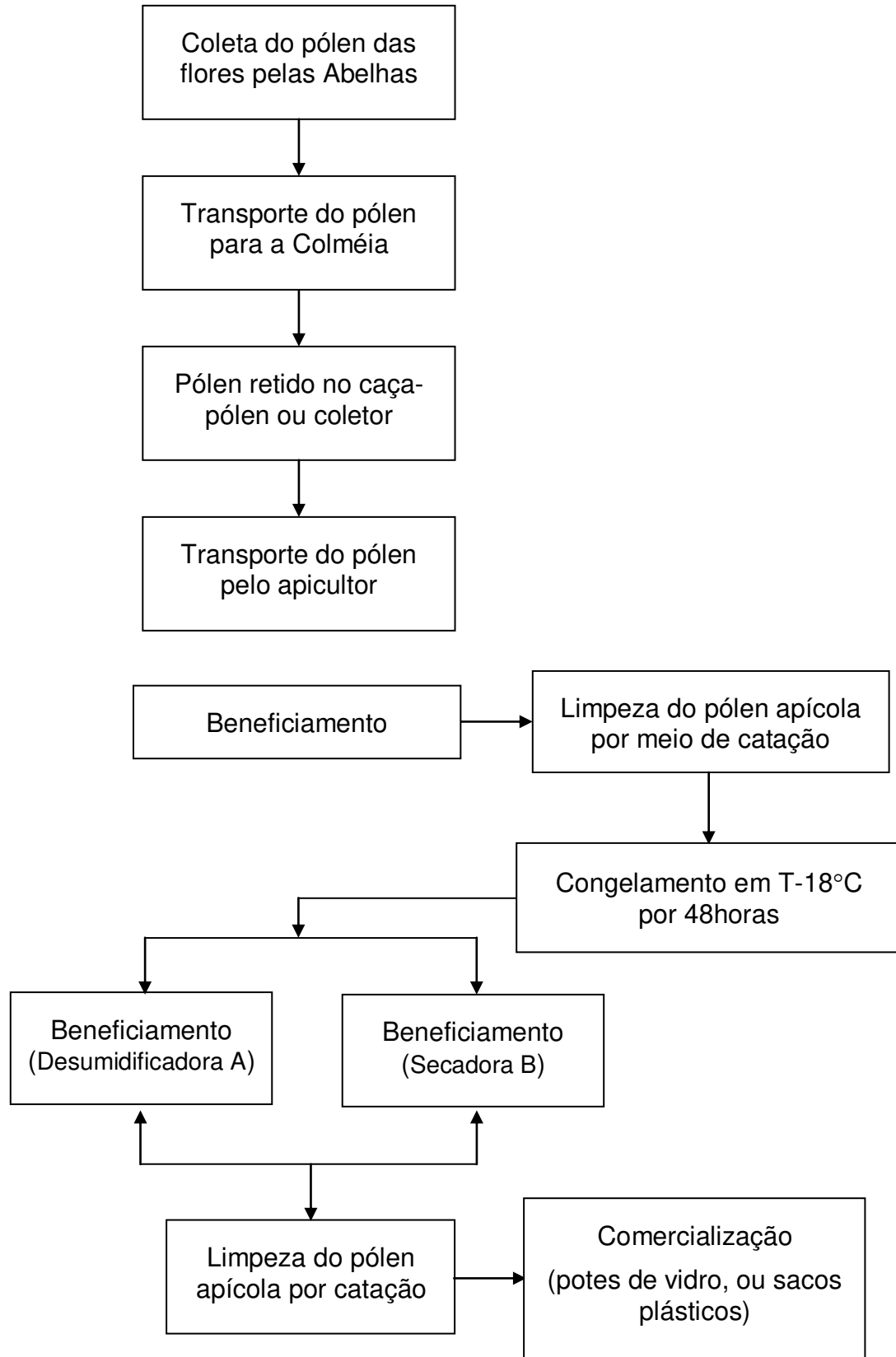
4.3 BENEFICIAMENTO DAS AMOSTRAS

Para o beneficiamento, etapa da desidratação, sendo o processo mais drástico, pois o pólen é frágil a temperatura elevadas.

Iniciou o processo com congelamento do pólen por 48 horas em temperatura em torno de -18°C , ou seja, temperatura de um equipamento de freezer, após este período as amostras foram expostas a temperatura ambiente por 3 a 4 horas.

Após este período de exposição o pólen foi distribuído nas bandejas em finas camadas para a etapa de desidratação. Realizou-se a remoção de impureza, como fragmentos de abelhas, patas, asas, resíduos de vegetais, folhas, gravetos até mesmo vestígios de própolis existentes com o uso de pinças, e também utilizou-se peneiras, destinadas a classificação do pólen.

O processamento do pólen apícola, como demonstrado no Fluxograma 4.3.1, cita as principais etapas para o beneficiamento da matéria-prima até o produto final para comercialização.



Fluxograma 4.3.1 Beneficiamento e Comercialização do Pólen Apícola Desidratado

Para a etapa da desidratação do pólen apícola foram utilizados dois equipamentos, sendo o Desumidificador A e a Secadora B.

O Desumidificador A consiste em um sistema de ar fechado, com umidade relativa controlada em torno de 0% e realiza a secagem com temperatura de 30°C. Já o segundo processo, a Secadora B, é uma estufa com circulação de ar em sistema aberto, cuja temperatura varia entre 40 a 42°C.

O Desumidificador A tem como característica a circulação de ar em sistema fechado, ou seja, o equipamento retira o ar externo para aquecer e circular entre as bandejas com a matéria, sendo uma circulação forçada para que haja a desidratação do pólen apícola. Nas Figuras 4.3.1 e 4.3.2, observaram o formato do equipamento usado para a desidratação a 30°C do pólen.



Figura 4.3.1 Desumidificador A.



Figura 4.3.2 Desumidificador A (Parte Posterior).

O tempo de desidratação através do Desumidificador A não é preciso, pois a umidade final deve ser inferior a 4%, como diz a legislação para evitar desenvolvimento de microrganismos deteriorantes ou até mesmo patógenos.

O segundo equipamento que foi usado para desidratação é Secadora B, confeccionada em metal, como pode se observar na Figura 4.3.3, reduzindo deste modo a umidade da matéria-prima através da passagem de ar quente pelas bandejas dispostas dentro do equipamento.



Figura 4.3.3 Secadora B (Parte Posterior).

A Secadora B possui uma gaveta na parte inferior do equipamento para o recolhimento das partículas de pólen que possivelmente caem no secador, a Figura 4.3.3 mostra a parte de traz, podendo observar a disposição das bandejas e da gaveta.

Estes dois processos foram escolhidos, pois são o que os apicultores produtores de pólen apícola desidratado utilizam para o beneficiamento da sua coleta, sendo assim realizando o processo mais próximo da realidade do apicultor brasileiro.

Não existem regulamentos técnicos sobre a aplicação de Boas Práticas de Fabricação, procedimentos de sanitização e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para pólen apícola.

As amostras foram produzidas, coletadas, pesadas e processadas no Pólo Regional do Vale do Paraíba, em Pindamonhangaba, onde foram submetidas às análises, físico-químicas. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do ITAL, em Campinas.

4.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Realizaram-se análises físico-químicas nas amostras IN NATURA e desidratada pelos dois processos de secagem. Adotaram-se os parâmetros do potencial de hidrogênio (pH), Umidade e Atividade de água.

O potencial de hidrogênio conhecido como pH, foi determinado nas amostras trituradas e colocadas no potenciômetro, equipamento responsável pela medição, expressando o resultado em unidades de pH.

O fator correspondente da umidade foi realizado através da perda de peso da amostra aquecida em uma estufa de vácuo a temperatura de 70°C, até peso constante, como metodologia aplicado pelo INSTITUTO DE ADOLFO LUTZ (1985).

O último a ser analisado foi a *Atividade de água* (*Aw*) verificada por meio do medidor automático, sendo que a atividade de água expressa a razão da pressão de vapor de água do alimento sobre a pressão de vapor da água pura.

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Em virtude da inexistência de parâmetros microbiológicos específicos para o pólen no Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos da ANVISA (BRASIL, 2001b), foram pesquisados os microrganismos referentes aos grupos de alimentos similares (granola e mistura de cereais não compactados, com ou sem adições, e similares), quais sejam: *Bacillus cereus*, Estafilococos coagulase positiva, coliformes a 45°C, *Echerichia coli* e *Salmonella sp*, além de bolores e leveduras, devido às condições ambientais necessárias para a produção do pólen apícola. Foram também pesquisados clostrídios sulfitos redutores.

Para as análises microbiológicas foram empregadas técnicas preconizadas pela *American Public Health Association* (APHA) *Compendium for Microbiological Analysis of Foods* (DOWNES & ITO, 2001) e pelo Manual Bergey de Bacteriologia (SNEATH, 1986). As análises de *Salmonella sp* foram feitas pelo método rápido de reação de polimerase em cadeia (PCR), sistema Bax.

Para uma maior investigação foi realizado swab dos coletores de pólen, por esfregaço, analisou à área total, estes swabs foram conversados em água peptonada para se avaliada nos mesmos parâmetros para que haja uma determinação de possíveis focos de contaminação microbiológica do pólen apícola.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com três repetições onde foram estudados três tratamentos, *IN NATURA*, Desumidificador A e Secadora B, com medidas repetidas no tempo (24h, 48h e 72h)

Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do procedimento MIXED, medidas repetidas no tempo (Repeated Measures) do programa SAS (*Statistical Analysis System*, 2001), a fim de determinar a estrutura matriz de variância e covariância. O nível de significância adotado foi de 5% e as interações significativas foram desdobradas de acordo com os fatores envolvidos. As interações significativas de maior grau que continham tempo foram estudadas por meio da análise de regressão sendo avaliados os efeitos lineares e quadráticos. As médias das interações em que o tempo não estava presente foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da análise físico-química e microbiológica, estão relacionados em forma de tabelas divididas de acordo com a preparação do pólen apícola, ou seja, da forma *IN NATURA* ou DESIDRATADA.

Além de demonstrar os dados obtidos referentes ao swabs feitos a partir do caça-pólen ou coletores, observando o controle higiênico-sanitário das colméias produtoras de pólen apícola.

Com as análises físico-químicas pode-se verificar as condições intrínsecas do alimento, e a microbiológica a carga microbiana presente para uma avaliação da matéria-prima até o processamento de desidratação.

Para o pólen desidratado esta análise é para verificação da eficiência dos métodos de processamento das amostras.

Desta forma, tanto as análises físico-químicas como a microbiológica possuem grande valor para a determinação da qualidade para o consumo humano desta matéria-prima processada.

Através da análise estatística levantou-se as comparações entre o pólen apícola *IN NATURA* e o desidratado, assim como qual o processo que forneceu as melhores condições e segurança para o processamento deste produto.

5.1 ANÁLISES FISICO-QUIMICAS

5.1.1 PÓLEN APÍCOLA *IN NATURA*

A seguir serão apresentados os resultados das análises físico-químicas, da primeira (março/abril de 2007) e segunda (outubro/novembro de 2007) etapa da coleta, o que incluiu as medidas de atividade de água, pH, umidade do pólen *IN NATURA*.

Estes parâmetros visaram verificar as condições que o pólen apícola é obtido na natureza, determinando o comportamento deste para o desenvolvimento microbiano.

Na Tabela 01 estão os resultados obtidos para Atividade de água, pH e Umidade das amostras de pólen *IN NATURA* da primeira época de coleta, referente aos meses de março e abril de 2007.

Tabela 01 Valores de Atividade de água, pH e umidade (em porcentagem) do pólen *IN NATURA* na primeira etapa de coleta (março/abril de 2007).

AMOSTRA	DETERMINAÇÕES ¹		
	Atividade de Água (Aw)	pH	Umidade (%)
Coleta 1 (24h)	0,683	5,10	15,29
Coleta 1 (48h)	0,668	5,09	14,65
Coleta 1 (72h)	0,684	4,91	15,30
Coleta 2 (24h)	0,803	4,58	22,57
Coleta 2 (48h)	0,741	5,12	18,32
Coleta 2 (72h)	0,775	4,64	21,41
Coleta 3 (24h)	0,774	4,85	22,59
Coleta 3 (48h)	0,818	4,83	24,65
Coleta 3 (72h)	0,755	5,12	19,80

(1) Estas análises foram realizadas em triplicata, expresso na tabela a média obtida destes valores.

Na Tabela 02 são apresentados os resultados das análises de pH e Umidade do pólen apícola *IN NATURA* da coleta do segundo semestre, que corresponde aos meses de outubro e novembro de 2007.

Tabela 02 Dados de Atividade de água, pH e Umidade referentes à segunda (outubro/novembro de 2007) etapa de coleta do pólen apícola *IN NATURA*.

AMOSTRA	DETERMINAÇÕES ¹		
	Atividade de Água (Aw)	pH	Umidade (%)
Coleta 1 (24h)	0,698	5,35	16,22
Coleta 1 (48h)	0,744	5,09	20,80
Coleta 1 (72h)	0,699	5,09	17,16
Coleta 2 (24h)	0,776	5,09	22,62
Coleta 2 (48h)	0,723	4,81	20,12
Coleta 2 (72h)	0,765	5,07	22,59
Coleta 3 (24h)	0,695	5,08	16,62
Coleta 3 (48h)	0,661	5,79	14,64
Coleta 3 (72h)	0,705	5,49	17,59

(1) Estas análises foram realizadas em triplicata, expresso na tabela a média obtida destes valores.

A determinação da umidade, que é a somatória da água livre do produto mais a água combinada, é uma das medidas mais importantes utilizadas na

análise de alimentos, uma vez que está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição. De acordo com *DEL RISCO RIOS* (2004) o conteúdo de água oscila entorno de 10-20% de umidade no pólen apícola *In Natura*. Como observou na Tabela 01, os valores obtidos para o pólen *IN NATURA* (mínimo ao máximo), na primeira etapa da coleta, variaram de 14,65 a 24,65. Na Tabela 02 os valores de umidade variam de 14,64 a 22,59. Todas as medidas se mostraram de acordo com Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola, Instrução Normativa 3/2001, para o pólen apícola *IN NATURA*, que adota o valor máximo de 30% para esse tipo de produto.

A atividade de água é o teor de água não-ligada, ou seja, disponível, definido em termos de equilíbrio termodinâmico. Desta forma, a atividade de água está diretamente relacionada com as reações de transformações que ocorrem no alimento, sendo estas microbiológicas, físicas e químicas. Através deste fator intrínseco é possível prever o potencial de deterioração do alimento, pois o crescimento dos microrganismos é absolutamente dependente da disponibilidade de água livre. Na Tabela 01 a faixa de atividade de água analisada do pólen *IN NATURA* varia de 0,818 a 0,668. O pólen apícola *In Natura* como visto na Tabela 02 está entre 0,776 a 0,661. Na faixa de 0,87 a 0,90 de atividade de água pode haver crescimento das maiorias dos fungos, *Staphylococcus aureus*, entre 0,80 a 0,75, crescimento da maioria das bactérias halófilas, e na faixa mais ampla de 0,75 a 0,60 pode haver o desenvolvimento de fungos xerofíticos e leveduras osmofílicas. Sendo assim, os valores obtidos no pólen apícola demonstram à susceptibilidade da proliferação de microrganismo principalmente os deteriorantes

Quanto ao pH, fator intrínseco do alimento que serve como medida de classificação do mesmo quanto ao teor de acidez, tem-se que alimentos que apresentem valores de pH superiores a 4,5 são considerados de baixa acidez, alvo de bactérias patogênicas e deteriorantes. Alimentos com pH entre 4,0 e 4,5 são os chamados de ácidos, alvo de fungos e bactérias lácticas no geral, e alguns deteriorantes. Alimentos, cujos valores de pH, são inferiores a 4,0 são classificados como muito ácidos, menos sujeitos às alterações microbianas, restringindo-se porém à alterações por bolores e leveduras. Como pode ser

observado nas Tabelas 01 e 02 o pH do pólen apícola nas amostras analisadas apresentou mínimo de 4,64 e máximo de 5,79 o que pode favorecer o crescimento de bactérias, bolores e leveduras. Esses valores obtidos estão de acordo com as especificações técnicas exigidas do Regulamento técnico 3/2001, que fixa valores de pH para o pólen apícola, de 4,0 a 6,0.

5.1.2 PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO

Nas Tabelas 03 e 04 estão apresentados os resultados obtidos da avaliação físico-químicas das amostras de pólen apícola desidratadas referentes à primeira (março/abril de 2007) e segunda etapa (outubro/novembro de 2007) da coleta.

Os parâmetros analisados nas amostras de pólen apícola desidratado visam verificar o comportamento da amostra no processamento de desidratação para garantir a inocuidade microbiana do pólen

Tabela 03 Análises de Atividade de água, pH e Umidade do pólen apícola desidratado coletados no período de março e abril de 2007 na colméia experimental de Pindamonhangaba-SP.

AMOSTRA		DETERMINAÇÕES ¹		
		Atividade de Água (Aw)	pH	Umidade (%)
DESUMIFICADOR A	Coleta 1 (24h)	0,308	4,90	4,33
	Coleta 1 (48h)	0,297	5,09	4,41
	Coleta 1 (72h)	0,353	4,69	3,94
	Coleta 2 (24h)	0,350	4,80	4,58
	Coleta 2 (48h)	0,327	4,82	4,52
	Coleta 2 (72h)	0,400	4,80	4,99
	Coleta 3 (24h)	0,382	4,81	4,96
	Coleta 3 (48h)	0,340	4,84	3,03
	Coleta 3 (72h)	0,372	5,37	4,53
SECADORA B	Coleta 1 (24h)	0,314	4,95	4,55
	Coleta 1 (48h)	0,303	5,18	3,87
	Coleta 1 (72h)	0,304	4,61	4,66
	Coleta 2 (24h)	0,321	4,89	5,18
	Coleta 2 (48h)	0,312	4,79	4,87
	Coleta 2 (72h)	0,334	4,78	6,10
	Coleta 3 (24h)	0,344	4,89	5,40
	Coleta 3 (48h)	0,285	4,87	5,25
	Coleta 3 (72h)	0,328	5,08	6,16

(1) Estas análises foram realizadas em triplicata, expresso na tabela a média obtida destes valores.

Na Tabela 03 estão demonstrados os valores de atividade de água, pH e umidade nos dois processos de desidratação.

A atividade de água no processo do Desumidificador A está entre 0,297 a 0,400, com esta A_w (atividade de água) reduz a probabilidade de crescimento microbiano, pois em atividade abaixo de 0,5 não há indícios de proliferação microbiana. O mesmo observado na Tabela 03 referente ao processo da Secadora B cuja faixa está entre 0,285 a 0,344. Desta forma, os métodos usados reduziram significativamente a atividade de água do produto para assegurar a qualidade microbiológica, porém pode-se verificar a presença de microrganismos deteriorantes neste alimento desidratado, como mostrado nas tabelas de avaliação microbiológica.

Para a análise de pH observado na Tabela 03 nota-se a variação entre 4,80 a 5,37 no processo do Desumidificador A, já no processo da Secadora B a variação foi de 4,61 a 5,18 sendo o permitido pelo Regulamento Técnico Normativa N°03 de 2001 entre 4 a 6, portanto este parâmetro analisado pelos dois métodos encontra-se de acordo com o estabelecido, sendo que o pH não sofre a interferência pelo o processo de desidratação.

Em relação ao fator umidade sabe-se que o Regulamento Técnico Normativa N°03 de 2001 confere a este produto desidratado 4% desta maneira. Para o Desumidificador A obteve-se umidade na faixa de 3,03 a 4,99 é um ponto que deve ser avaliado com maior cuidado, pois apresenta cerca de 22% das amostras abaixo do permitido no Regulamento. A faixa de variação 3,87 a 6,16 na Secadora B, é muito extensa para a desidratação deste tipo de produto, o que demonstra que 56% das amostras analisadas estão acima do valor permitido de 4% de umidade, e 11% das amostras analisadas estão abaixo do limite, neste processamento do pólen apícola o processo de desidratação A se mostrou mais satisfatório para os parâmetros analisados.

Tabela 04 Análises de Atividade de água, pH e Umidade do pólen desidratado referente à segunda coleta, que corresponde aos meses de outubro/novembro de 2007.

AMOSTRA		DETERMINAÇÕES ¹		
		Atividade de Água (Aw)	pH	Umidade (%)
DESUMIDIFICADOR A	Coleta 1 (24h)	0,286	5,35	2,89
	Coleta 1 (48h)	0,418	4,79	3,20
	Coleta 1 (72h)	0,287	5,38	3,70
	Coleta 2 (24h)	0,351	5,10	3,51
	Coleta 2 (48h)	0,364	5,28	3,46
	Coleta 2 (72h)	0,462	5,08	3,13
	Coleta 3 (24h)	0,337	5,83	3,30
	Coleta 3 (48h)	0,327	5,66	3,14
	Coleta 3 (72h)	0,404	5,63	2,42
SECADORA B	Coleta 1 (24h)	0,286	5,09	2,95
	Coleta 1 (48h)	0,312	4,81	3,29
	Coleta 1 (72h)	0,297	5,35	3,33
	Coleta 2 (24h)	0,420	5,12	3,25
	Coleta 2 (48h)	0,327	5,37	2,64
	Coleta 2 (72h)	0,359	5,09	2,86
	Coleta 3 (24h)	0,270	5,67	2,72
	Coleta 3 (48h)	0,415	5,90	2,74
	Coleta 3 (72h)	0,322	5,61	2,77

(1) Estas análises foram realizadas em triplicata, expresso na tabela a média obtida destes valores.

Na Tabela 04 estão relatados os resultados da segunda etapa da colheita do pólen apícola. Pode-se observar que no processo referente ao Desumidificador A, a atividade de água variou de 0,286 a 0,462, pH 4,79 a 5,83. E também para a umidade de 2,42 a 3,70.

Referente ao processo de secagem B a atividade água está entre 0,286 e 0,420, o pH entre 4,81 e 5,90 e a umidade entre 2,86 e 3,33.

Quanto ao pólen desidratado, os valores obtidos discordam daqueles preconizados pelo Regulamento Técnico Normativa N°03 de 2001, que adota o valor máximo de 4% para o pólen desidratado. Os valores de umidade obtidos para o pólen desidratado pelo método A, que emprega temperatura mais baixa (30°C), variaram do mínimo, de 2,42% ao máximo de 3,70%; enquanto os obtidos pelo método de desidratação B, variaram de 2,64%(mínimo), a 3,33%(máximo) Pode ser observado, que o método que utiliza temperaturas mais baixas de operação, sendo este o processo A, apresentou uma media de umidade um pouco

mais elevada, que seria de 5,15% em relação a obtida pelo processo B (4,42%). Em ambos os métodos utilizados, a grande maioria das amostras, isto é, 88%, obtidas através do Desumidificador A e 76% das amostras obtidas pelo método da Secadora B, ultrapassaram o índice de 4%, embora medições individuais mostrassem que a maioria das amostras obtidas pelo método B, chegaram mais próximas a esse valor.

Os valores obtidos para atividade de água (A_w) para ambos os métodos, mostrou que o produto desidratado tem uma atividade de água bastante reduzida, com um mínimo de 0,285 e máximo de 0,4. Sabe-se que abaixo de A_w de 0,6 não há na literatura menção de crescimento microbiano em alimentos. Se fosse considerado apenas esse parâmetro, o pólen apícola seria considerado um produto estável, quanto ao aspecto microbiológico. No entanto, foram observados crescimentos bacterianos e fúngicos com intensidade maior que as bactérias e constante, nas amostras de pólen desidratadas, como pode ser visto nas próximas tabelas de avaliação microbiológica.

Em comparação das duas etapas de processamento pode-se verificar que o método A, a temperatura de 30°C, reduziu a atividade de água inicial do pólen apícola *IN NATURA*, como visto na Tabela 01 e Tabela 02, de 0,818 a 0,661 para 0,297 a 0,462 no pólen desidratado, como visto na Tabela 03 e Tabela 04, com esta diminuição pode-se garantir a estabilidade do pólen como produto final. O pH se manteve praticamente estável e pela Resolução Normativa N°03 de 2001 que dita o pH 4 a 6 para o pólen apícola.

Para umidade, a qual, a Resolução Normativa N°03 de 2001 relata a umidade máxima de 30% para o pólen apícola *IN NATURA* e para o pólen apícola desidratado a umidade máxima de 4%. Desta forma, o pólen apícola *IN NATURA*, (Tabela 01 e Tabela 02) apresentou umidade entre 14,64 a 24,65 com o emprego da desidratação obteve a faixa de 2,42 a 4,99. Este é o parâmetro mais crítico para o método de desidratação empregado, sendo que das amostras analisadas referente a este fator 61% alcançaram a umidade desejada, apenas 39% ficaram acima do limite máximo determinado.

O método de desidratação B que utiliza a temperatura de 40 a 42°C, reduziu a atividade água para 0,285 a 0,420. O pH por este método foi de 4,61 a 5,90 e a umidade de 2,64 a 6,16, ou seja, cerca de 56% das amostras analisadas estão acima do limite máximo determinado para a umidade, somente 44% das amostras atingiram a umidade desejada, segundo o padrão da Resolução Normativa N°3.

Para a comparação dos dois métodos de desidratação, A e B, pode-se adotar a umidade como parâmetro, sendo assim, o processo A obteve-se 61% das amostras com umidade desejada, porém processo B somente 44% com umidade dentro do limite de máxima. Desta forma, o processo A pode ser considerado de maior eficiência na desidratação do pólen apícola.

Na Tabela 05 estão demonstrados os resultados obtidos das dez amostras de pólen apícola comercial adquiridas no mercado, análises de Atividade de Água (Aw), potencial de hidrogênio (pH) e umidade.

Tabela 05 Análises de Atividade de água, pH e Umidade do pólen desidratado referente as amostras adquiridas no comercio varejista do Estado de São Paulo.

AMOSTRA ¹	DETERMINAÇÕES ²		
	Atividade de Água (Aw)	pH	Umidade (%)
Comercial 01	0,333	4,31	5,92
Comercial 02	0350	4,30	5,20
Comercial 03	0,336	4,30	5,43
Comercial 04	0,362	4,62	7,02
Comercial 05	0,379	4,35	4,75
Comercial 06	0,542	3,67	9,18
Comercial 07	0,394	4,31	5,70
Comercial 08	0,410	4,67	5,36
Comercial 09	0,442	4,91	2,57
Comercial 10	0,465	4,64	3,46

(1) Amostras de Pólen Apícola desidratado Comercial, (2) Estas análises foram realizadas em triplicata, exposto na tabela a média obtida destes valores.

A Tabela 05 observa-se os valores de atividade de água inferiores a 0,5, sendo assim, com este fator abaixo indica que este pólen comercial apresenta condições adversas para o crescimento microbiano. Apenas 1% das amostras analisadas está abaixo da faixa permitida para o pH pelo Regulamento Técnico Normativa N°03 de 2001, já o outro fator contemplado sendo a umidade que corresponde a 4%, nenhuma das amostras comerciais do estado de São Paulo

apresentaram esta umidade, ou seja, 20% das amostras ficaram abaixo deste limite e 80% ficaram acima deste limite de umidade.

5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.2.1 PÓLEN APÍCOLA *IN NATURA*

Na Tabela 06 encontra-se os valores da população microbiana estudada, para o pólen *IN NATURA*, da primeira etapa, em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

Tabela 06 Análise Microbiológica do Pólen *IN NATURA* coletado na primeira (março/abril) etapa, das colméias experimentais do pólo apícola de Pindamonhangaba.

AMOSTRA	DETERMINAÇÕES (UFC/g) ¹			
	<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e Levedura	Clostrídios Sulfito Redutores	Coliformes Totais
Coleta 1 (24h)	2×10^2	8×10^4	<10	$2,5 \times 10^3$
Coleta 1 (48h)	3×10^2	8×10^4	<10	$1,4 \times 10^3$
Coleta 1 (72h)	9×10^2	$7,3 \times 10^4$	<10	$2,9 \times 10^3$
Coleta 2 (24h)	$2,3 \times 10^2$	$3,5 \times 10^4$	$3,4 \times 10^2$	$3,5 \times 10^4$
Coleta 2 (48h)	$2,0 \times 10^2$	$7,9 \times 10^5$	<10	$4,6 \times 10^3$
Coleta 2 (72h)	<10 ²	$8,2 \times 10^5$	<10	$3,7 \times 10^3$
Coleta 3 (24h)	<10 ²	$1,8 \times 10^6$	6×10	$1,4 \times 10^4$
Coleta 3 (48h)	4×10^2	$3,9 \times 10^5$	<10	$2,3 \times 10^3$
Coleta 3 (72h)	6×10^2	$3,9 \times 10^5$	1×10	$6,9 \times 10^3$

(1) Unidade Formadora de Colônia por gramas

De acordo com a Tabela 06, não se observou contagens para os microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e Estafilococos coagulase positiva, em todas as amostras de pólen *IN NATURA*, dessa etapa de coleta. Quanto ao grupo bacteriano dos coliformes totais, 100% das amostras analisadas se mostraram contaminadas. Pode-se encontrar presença destes microrganismos em todas as amostras analisadas, por VALDES (1993), apesar das medidas higiênico-sanitárias aplicadas para a coleta, o que demonstra uma carga microbiana vinda da colméia.

Para os fungos (bolores e leveduras), todas as amostras se mostraram contaminadas (100%). Quanto à bactéria esporulada, *Bacillus cereus*, patógeno relevante em saúde pública observou-se que 77% das amostras estavam

contaminadas, embora a população esteja em um nível baixo (10^2 UFC/g). Em relação ao Clostrídios Sulfito Redutores notou-se estes 33% das amostras com nível de contaminação abaixo de 10^2 UFC/gramas. De acordo com GILLIAM (1979b) que analisou amostras de pólen apícola armazenados nas colméias pelo período de uma, três e seis semanas, observando o crescimento de 41 bactérias do gênero *Bacillus*, 113 de leveduras e 148 de bolores (fungos).

Como essas amostras são *IN NATURA*, ou seja, não sofreram ainda nenhum processamento, essas contagens obtidas podem significar que uma melhoria nas práticas de obtenção do pólen se faz necessárias. Embora o crescimento bacteriano não seja favorecido com esses valores de atividade de água, como observado na Tabela 01. Essas bactérias que se desenvolveram, provavelmente podem ter vindo tanto do próprio campo, sendo parte da microbiota original do pólen vegetal, e/ou terem aumentado seu numero durante alguma operação de obtenção do produto *IN NATURA*, multiplicando-se devido à riqueza nutricional do substrato.

Na Tabela 07, encontram-se os resultados obtidos para o pólen *IN NATURA*, das coletas realizadas na etapa segunda, o que corresponde ao segundo semestre referente aos meses de outubro/novembro de 2007.

Tabela 07 Análise Microbiológica do Pólen *IN NATURA* referente á segunda (outubro/novembro de 2007), das colméias instaladas no Pólo de Pindamonhangaba.

AMOSTRA	DETERMINAÇÕES (UFC/g) ¹			
	<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e Leveduras	Clostrídios Sulfito Redutores	Coliformes Totais
Coleta 1 (24h)	$1,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10$	$1,1 \times 10^3$
Coleta 1 (48h)	$<10^2$	$4,3 \times 10^5$	<10	$2,4 \times 10^2$
Coleta 1 (72h)	$<10^2$	$9,4 \times 10^5$	<10	$\geq 2,4 \times 10^3$
Coleta 2 (24h)	$5,6 \times 10^2$	$3,3 \times 10^5$	<10	$1,1 \times 10^3$
Coleta 2 (48h)	$2,0 \times 10^2$	$7,7 \times 10^5$	<10	$\geq 2,4 \times 10^3$
Coleta 2 (72h)	$1,0 \times 10^2$	$9,7 \times 10^5$	<10	$1,1 \times 10^3$
Coleta 3 (24h)	$1,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^6$	<10	$1,1 \times 10^3$
Coleta 3 (48h)	$<10^2$	$6,8 \times 10^5$	<10	$\geq 2,4 \times 10^3$
Coleta 3 (72h)	$<10^2$	$5,1 \times 10^5$	<10	$\geq 2,4 \times 10^3$

(1) Unidade Formadora de Colônia por gramas

Quanto à pesquisa de *Salmonella sp.* e Estafilococos coagulase positiva, para as amostras do pólen *IN NATURA*, da segunda etapa, obteve-se resultados

de ausência para a *Salmonella sp.* e de $<10^2$ UFC/g, para o Estafilococos coagulase positiva, limite de detecção do método.

Nesta segunda etapa, de coleta do pólen *IN NATURA*, conforme pode ser visto na Tabela 07, observou-se uma contagem mais elevada de bolores e leveduras, de um ciclo logarítmico a mais, do que foi observado na primeira etapa de coleta desse mesmo produto, como descrito na Tabela 05. Todas as amostras mostraram uma população com níveis ao redor de 10^5 UFC/gramas até 10^6 UFC/gramas para essa determinação microbiológica. Quanto ao resultado para Coliformes Totais, a grande maioria das amostras mostrou contaminação por essas bactérias no nível de 10^3 UFC/gramas, na prática esses resultados indicam contaminação, porém, não necessariamente de origem fecal, pois o resultado para a determinação de *Escherichia coli* está abaixo do nível de 10UFC/gramas, proveniente de alguma etapa do processo de obtenção do pólen *IN NATURA*. Convém mencionar que esses microrganismos provavelmente fazem parte da microbiota natural do pólen ainda na natureza. Quanto às bactérias esporuladas como o *Bacillus cereus* e Clostrídios Sulfito Redutores, observou-se que em 60% das amostras de pólen *IN NATURA analisadas* estão contaminadas com *Bacillus cereus*, já o Clostrídios Sulfito Redutores encontram-se em 11% das amostras analisadas, porém a quantidade detectada está no nível <10 UFC/gramas. Os tempos de coletas, não tiveram influência no crescimento deste microrganismo.

Em comparação das coletas de 24horas, notou-se que a contaminação de Bolores e Leveduras é pertinente com contagem acima de 10^4 UFC/gramas. Referente à contaminação de Coliformes Totais presente em 100% das amostras coletadas em 24horas, com níveis superiores a 10^3 UFC/gramas, porém em nenhuma das amostras analisadas detectou-se a presença de *Escherichia coli*, pois esta contaminação pode ser proveniente de pós-colheita, o que evidência falhas no processo de boas práticas. Para *Bacillus cereus* foi detectado em 67% das amostras para a primeira coleta, para a segunda etapa 100% das amostras está contaminadas, este microrganismo possui seu habitat preferencial o ar, o solo e a água. Os Clostrídios Sulfito Redutores presente em 33% das amostras da primeira etapa e 11% das amostras referente a segunda, porém este

microrganismo é encontrado na flora normal do trato intestinal de animais domésticos e selvagens, também pertencem ao trato humano, mas os manipuladores de alimentos não constituem fonte significativa de contaminação.

Para a coleta de 48 horas tanto da primeira como na segunda etapa, não houve evidência de Clostrídios Sulfito Redutores. Os níveis de Bolores e Leveduras e também de Coliformes Totais estão acima de 10^4 UFC/gramas e 10^2 UFC/gramas, respectivamente. Para *Bacillus cereus* está presente em 100% das amostras da primeira etapa, e 11% das amostras correspondentes a segunda parte, esta bactéria se apresentou de forma variável da primeira para a segunda etapa.

As amostras coletadas com 72 horas, para a primeira etapa o quadro de contaminação permaneceu com 10% das amostras contaminadas com Bolores e Leveduras e Coliformes Totais, o mesmo acontece com a segunda etapa, sendo que 100% das amostras estão contaminadas com estes dois microrganismos, Bolores e Leveduras, e também Coliformes Totais. Apresentando porcentagem variável para *Bacillus cereus* e Clostrídios Sulfito Redutores da primeira para a segunda, a primeira etapa teve 67% de amostras contaminadas com *Bacillus cereus*, e na segunda etapa 100% das amostras não tiveram contagem para Clostrídios Sulfito Redutores.

Em relação à contaminação de pólen apícola por bolores e leveduras, assim RODRIGUES, *et al.*, (2007), analisou amostras de pólen vindas de um criadouro localizado no Município de Ilha Grande, a determinação de bolores realizada por meio de diluições e contagem, obteve-se a identificação dos fungos do gênero *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* como os mais freqüentes na microflora isolada, outros gêneros isolados em menor frequência foram o *Mucor spp.*, *Fusarium spp.*, *Curvularia spp.* Estes resultados apontam que a microbiota encontrada no pólen das abelhas incluem os principais gêneros dos fungos toxígenicos, e que em alguns casos, podem ser também patogênicos para os seres humanos.

Desta forma, observou-se a frequência contínua da contaminação de Bolores e Leveduras, assim como, para Coliformes Totais, ou seja,

microrganismos freqüentes na microbiota do pólen apícola *IN NATURA* referentes aos meses de março e abril como primeiro semestre e também aos meses de outubro e novembro como segundo semestre de 2007.

5.2.2 PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADOS

Na Tabela 08 se encontram os valores da população microbiana obtidos do pólen apícola desidratado por dois processos, sendo o Desumidificador A que corresponde um sistema fechado com umidade zero e temperatura de 30°C e a Secadora B que corresponde um sistema de circulação de ar fechado e com temperatura entre 40°C a 42°C, na primeira etapa da coleta, sendo março/abril de 2007.

Tabela 08 Análise Microbiológica do Pólen Apícola Desidratado, pelos processos A e B, das colméias de pólen apícola do Pólo de Pindamonhangaba referente à primeira (março/abril de 2007) etapa.

AMOSTRA		DETERMINAÇÕES (UFC/g) ¹				
		<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e Leveduras	Clostrídios Sulfito Redutores	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>
Desumidificador A	Coleta 1 (24h)	<10 ²	1,9 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	Coleta 1 (48h)	<10 ²	2,3 x 10 ⁴	4,8 x 10	6x10	<10
	Coleta 1 (72h)	2,7 x 10 ²	2,8 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	Coleta 2 (24h)	<10 ²	4,9 x 10 ⁴	<10	4,0 x 10	<10
	Coleta 2 (48h)	<10 ²	7,5 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	4,0 x 10	<10
	Coleta 2 (72h)	<10 ²	1,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ²	4,0 x 10	<10
	Coleta 3 (24h)	<10 ²	2,6 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	Coleta 3 (48h)	1,0 x 10 ²	5,7 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	Coleta 3 (72h)	<10 ²	2,2 x 10 ⁴	<10	9,0 x 10	<10
Secadora B	Coleta 1 (24h)	<10 ²	3,1 x 10 ⁴	7,0 x 10	<10	<10
	Coleta 1 (48h)	<10 ²	1,5 x 10 ⁴	4,0 x 10	<10	<10
	Coleta 1 (72h)	2,0 x 10 ²	5,2 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	Coleta 2 (24h)	<10 ²	7,8 x 10 ⁴	3,2 x 10 ²	4,0 x 10	<10
	Coleta 2 (48h)	<10 ²	5,9 x 10 ⁴	<10	1,5 x 10	<10
	Coleta 2 (72h)	<10 ²	2,9 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	Coleta 3 (24h)	<10 ²	4,0 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	Coleta 3 (48h)	<10 ²	6,3 x 10 ⁴	1,0 x 10	4,0 x 10	<10
	Coleta 3 (72h)	<10 ²	7,8 x 10 ⁴	3,6 x 10	<10	<10

(1) Unidade Formadora de Colônia por gramas

Detalhando, quanto aos resultados das determinações microbiológicas para o pólen desidratado, embora não tabelados os resultados, não foi observado crescimento de *Salmonella sp.* e Estafilococos coagulase positiva em nenhuma amostra processada pelos dois métodos empregados. Quanto às demais determinações, pode-se observar que todas as amostras, referentes aos dois métodos de desidratação estudados, nesta primeira etapa da coleta,

demonstraram uma elevada contaminação por bolores e leveduras (10^4 UFC/gramas). O tempo diferenciado de coleta (24horas, 48horas e 72horas), parece não ter influído na redução ou aumento de microrganismos presentes nas amostras uma vez que todas mostraram desenvolvimento microbiano, em qualquer um dos tempos adotados, especialmente os fungos. Quanto à concordância com o padrão microbiológico da ANVISA (2001) adotado como referencia para esse estudo, pode-se dizer que todas as amostras se encontraram dentro do mesmo.

Especificamente, em relação às amostras obtidas pelo método de desidratação do Desumidificador A, não observou o crescimento do microrganismo *Escherichia coli*, pois outro indicativo foi o crescimento do coliforme termotolerante, sendo uma bactéria indicadora de contaminação fecal, podendo indicar alguma falha nas operações de higiene nas operações de obtenção do produto. Ainda em relação a esse método ou processo, obteve-se amostras com contaminação pelas bactérias esporuladas *Bacillus cereus*, na coleta 1 de 72 horas, e na coleta 3 de 72 horas presença Clostrídios Sulfito Redutores.

No processamento tipo Secadora B, que emprega temperaturas de secagem na faixa de temperatura de 40 e 42⁰C, apenas uma amostra apresentou contagem para a bactéria esporulada *Bacillus cereus*, sendo a coleta 1 (72horas). As amostras referentes à coleta 1 (24horas e 48horas), coleta 2 (24horas) e 2 amostras da coleta 3 (48horas e 72horas) apresentaram contagens Clostrídios Sulfito Redutores. Quanto ao grupo bacteriano dos Coliformes Totais, apenas 3 amostras, referentes às coletas 2 (24horas e 48horas) e 3 (48 horas), apresentaram alguma contagem significativa para este microrganismo.

A Tabela 09, contem os resultados de análises microbiológicas do pólen apícola desidratado pelos processos do Desumidificador A e da Secadora B, as amostras são referentes às coletas dos meses de outubro e novembro do ano de 2007.

Tabela 09 Análises microbiológicas do Pólen Apícola desidratados pelos processos A e B, das colméias de pólen, referentes à segunda etapa (outubro/novembro de 2007) do Pólo de Pindamonhangaba.

		DETERMINAÇÕES (UFC/g) ¹			
AMOSTRAS		<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e Leveduras	Clostrídios Sulfito Redutores	Coliformes Totais
Desumidificador A	Coleta 1 (24h)	1x10 ²	3,4x10 ⁵	<10	2,3x10
	Coleta 1 (48h)	1x10 ²	4x10 ⁵	<10	4,3x10
	Coleta 1 (72h)	3x10 ²	2,5x10 ⁵	<10	4,3x10
	Coleta 2 (24h)	1,4x10 ²	8,5x10 ⁵	<10	1,1x10 ³
	Coleta 2 (48h)	2x10 ²	1,2x10 ⁶	<10	1,5x10 ²
	Coleta 2 (72h)	1,8x10 ²	4,6x10 ⁵	<10	2,3x10
	Coleta 3 (24h)	1x10 ²	2,5x10 ⁵	<10	2,8x10
	Coleta 3 (48h)	<10 ²	1,3x10 ⁵	<10	2,1x10
	Coleta 3 (72h)	2x10 ²	1,9x10 ⁵	<10	1,1x10 ³
Secadora B	Coleta 1 (24h)	<10 ²	1,1x10 ⁵	<10	4x10
	Coleta 1 (48h)	<10 ²	3,1x10 ⁵	1x10	2,4x10 ²
	Coleta 1 (72h)	<10 ²	4,5x10 ⁵	1x10	9,3x10
	Coleta 2 (24h)	<10 ²	6,2x10 ⁵	<10	4,3x10
	Coleta 2 (48h)	<10 ²	1,1x10 ⁶	<10	2,4x10 ²
	Coleta 2 (72h)	<10 ²	3,8x10 ⁵	<10	4,3x10
	Coleta 3 (24h)	<10 ²	1,2x10 ⁶	<10	1,1x10 ³
	Coleta 3 (48h)	<10 ²	2,3x10 ⁵	<10	4,6x10 ²
	Coleta 3 (72h)	<10 ²	9x10 ⁴	<10	1,5x10

(1) Unidade Formadora de Colônia por gramas

O resultado para pesquisa da maioria dos patógenos, para esta segunda (outubro/ novembro de 2007) etapa do processo, foi semelhante ao encontrado para a primeira (março/abril de 2007) etapa de coleta após desidratação por ambos os métodos. Não foi encontrada a bactéria *Salmonella sp* em 25 g do produto, para todas as amostras. Também não foi observado, crescimento para *Escherichia coli* (<10UFC/g) nessas amostras, para a determinação de Estafilococos coagulase positiva notou-se a ausência do crescimento deste microrganismo, ou seja, o contagem dos Estafilococos coagulase positivo apresentou-se abaixo do limite de <10²UFC/g utilizada para o método de análise. Quanto aos outros parâmetros estudados, pode se dizer que não foram encontradas bactérias esporuladas do grupo dos Clostrídios Sulfito Redutores, na grande maioria das amostras, nesta segunda etapa de coleta; sendo apenas

detectadas, e em população muito baixa (ordem de 10^1 UFC/g), em duas amostras, correspondentes às coletas 1(48horas) e 1(72horas) submetidas à desidratação pelo Secadora B. Diferente do que foi observado na primeira (março/abril de 2007) etapa, a grande maioria das amostras, desidratadas pelo Desumidificador A, se mostraram contaminadas com a bactéria esporulada *Bacillus cereus*. Este dado está de acordo com a literatura (FRANCO, 1996a), que relata que processamentos térmicos com temperaturas abaixo de 100°C , dificilmente eliminam esporos bacterianos da matéria prima, especialmente se esta já estiver muito contaminada.

Em relação à população de bolores e leveduras, pode ser observado, que de maneira semelhante ao que se obteve na primeira (março/abril de 2007) etapa, o pólen desidratado se mostrou contaminado em 100% das amostras, independente do processo de secagem adotado, e dos tempos de coleta estabelecidos. Na prática existem várias hipóteses que podem justificar esses dados. Uma delas é a matéria prima, que estava contaminada com esses microrganismos, e a temperatura de processamento, em ambos os métodos, sendo considerada baixa para eliminação desses microrganismos, podem até ter contribuído para seu desenvolvimento no produto durante as operações de desidratação. Outra hipótese, seria que a embalagem, após processo, pode ter permitido alguma troca de gases com o meio ambiente e a umidade pode ter aumentado e permitido o crescimento microbiano.

Para esta pesquisa foram analisadas cerca de 36 amostras desidratadas por dois métodos, que envolveram temperaturas diferentes.

Pode-se observar que o parâmetro crítico para este produto é a presença de contagem elevada de bolores e leveduras, apresentando contagem superiores a 10^4 UFC/g em 100% das amostras. De acordo com o do Código Alimentario Argentino no Artigo 785 (RES1550, 12.12.90) esta contagem não pode ser superior a 10^2 UFC/grama do produto. CORONEL, *et al.*,(2004) observou que 100% das amostras analisadas apresentaram contaminação por fungos, sendo identificado 20 espécies, esta contaminação por bolores é considerada crítica, pois encontrou espécies toxigênicas como *A.flavus*, *F.graminearum*, *P.citrinum*,

P.funiculosum e *A. alternata*. Em condições deficientes no armazenamento como o envase não hermético, elevada atividade de água, temperatura e permanência prolongada em contato com o ar ambiente pode propiciar à proliferação dos fungos e podendo haver a produção das micotoxinas.

De acordo com MÁRTINEZ (2006), o ar geralmente é impulsionado por um ventilador, sendo que em nenhum caso analisado foi observado um sistema de limpeza para este ar, ao contrario em muitos dos casos o ar utilizado se encontra no ambiente com grande propensão a contaminação. Assim, as amostras de pólen analisadas na sua grande maioria apresentaram contaminação devido a falha no controle da manipulação, todas as 23 amostras de pólen analisadas em 2005 apresentaram uma alta contagem de bolores e leveduras identificando o gênero de *Aspergillus sp*.

De acordo com a Tabela 08 e 09, 25% das amostras analisadas estão contaminadas por *Bacillus cereus*, com contagem superior a 10^2 UFC/grama. Para a detecção de *Bacillus cereus*, sendo uma bactéria patogênica e esporulada, o regulamento técnico 12 de 2001 da ANVISA pelo grupo 10 item N, indica o limite máximo de 10^3 (UFC/g), enquanto o Código Alimentario Argentino de 1990 no Artigo 785 recomenda a ausência para todos os microrganismos patogênicos.

Segundo DEL RISCO (2004), os microrganismos do gênero *Bacillus* são associados as abelhas operarias. Já VALDES (1991) testou o pólen desidratado durante 24horas a temperatura de 42°C, o que contribuiu para reduzir a carga microbiana, evitando a rápida deterioração do produto, porém um ponto essencial foi à detecção microbiana do gênero *Bacillus*, sendo que este é capaz de produzir esporos que são resistentes ao tratamento de secagem, desta forma, os esporos resistem às condições adversas.

No pólen apícola desidratado pelos dois processos térmico, como demonstrado na Tabela 08 e 09, não apresentaram contaminação por *Salmonella sp* em 25gramas da amostra, podendo ser considerada ausência para este parâmetro. A detecção da bactéria *Salmonella sp* tanto para o Código Alimentário Argentino de 1990, como pela Resolução 12 de Janeiro de 2001 indicam ausência para este microrganismo patogênico.

Outro parâmetro analisado que não apresentou crescimento foi para *Estafilococos* coagulase positiva, ou seja, contagem inferior a 10^2 UFC/grama, que é o limite de detecção usado no método de análise.

Como comparação a resposta desta avaliação, o Código Alimentario Argentino no Artigo 785 (RES 1550, 12.12.90) indica ausência de microrganismos patogênicos, o que pode incluir o *Estafilococos* coagulase positiva, porém a RDC 12 de 2001 referente ao grupo 10 item N recomenda o limite maior para a contagem de *Estafilococos* coagulase positiva, sendo 10^3 UFC/grama.

MÁRTINEZ (2006) analisou amostras de pólen desidratado e notou a presença do *Estafilococos* coagulase positiva, contaminação indicada pelo contato do produto com a pele sem proteção como luvas, touca e mascaras para boca, ou seja, contaminação por manipulador.

Para a avaliação do Clostrídios Sulfito Redutores das amostras analisadas, em torno de 28% obtiveram crescimento desse microrganismo com contagem superior a 10UFC/grama, é uma bactéria patogênica, que tem a capacidade de esporular no intestino humano.

De acordo com pesquisa realizada por MÁRTINEZ (2006) em torno de 30% das amostras analisadas apresentaram contaminação por bactéria do gênero *Clostridium sp*, indicando contaminação ambiental, ou seja, fonte de contaminação como a terra.

Assim como o Código Alimentario Argentino no Artigo 785 (RES 1550, 12.12.90) indica ausência de microrganismo patogênico, isto significa ausência de Clostrídios Sulfito Redutores. Sendo assim, na avaliação do pólen apícola desidratado pelos dois métodos, 8% das amostras positivas ou contaminadas correspondem ao Desumidificador A e 20% corresponde ao processo realizado pela Secadora B, o processo de desidratação indicado pela Secadora B apresentou um nível maior de contaminação das amostras analisadas, por estes microrganismos.

Os Coliformes Totais e *Escherichia coli* são indicadores de condições higiênico-sanitárias do processamento. Desta maneira, nas Tabelas 08 e 09 demonstram contaminação de *E.coli*, bactéria patogênica que deve ser ausente

em 100% das amostras analisadas como é mencionado no Código Alimentario Argentino no Artigo 785 (RES 1550, 12.12.90), porém estas amostras estão de acordo com a RDC 12 de Janeiro de 2001 que indica 5×10^2 UFC/grama para o grupo 10 item N. Mas esta contaminação só foi detectada na amostra desidratada pelo processo do Desumidificador A, o outro processamento avaliado, Secadora B, não apresentou nenhuma amostras com contaminação por *Escherichia coli*.

Para a contagem de Coliformes Totais pode-se observar que 39% e 31% das amostras desidratadas pelos métodos de Desumidificador A e Secador B respectivamente, apresentando contagem superior a 10UFC/grama.

Desta forma, a contaminação por coliformes é uma indicação das condições higiênicas dos processos de fabricação, pois são facilmente inativados por sanitizantes e tem uma ampla capacidade de colonizar-se em vários pontos da planta de processamento, quando existe falha na sanitização. Também são indicadores de falha de processo ou de contaminação pós-processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não sobrevivem ao tratamento térmico.

Segundo MÁRTINEZ (2006) que analisou amostras de pólen apícola e observou que 65% das amostras foram positivas para Coliformes totais, já CORONEL, *et al.*, (2004) detectaram presença de Coliformes Totais na maioria das amostras, porém ao efetuar em as provas bioquímicas não detectaram presença de *Escherichia coli* nas amostras. Assim, estas bactérias são indicadores de contaminação demonstrando as condições higiênico-sanitárias em que se encontram o pólen. Neste estudo, não foram tão eficiente devido à baixa frequência, porém sugere que haja um maior controle das condições dos manipuladores e também em relação ao fracionamento por parte do comerciante.

Na Tabela 10 estão relacionadas às análises realizadas em dez amostras adquiridas em lojas do comercio varejista do estado de São Paulo.

Tabela 10 Análises microbiológicas de amostras de Pólen Apícola desidratado adquiridas no comércio do Estado de São Paulo.

AMOSTRA ¹	DETERMINAÇÕES (UFC/g) ²			
	<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e Leveduras	Clostrídios Sulfito Redutores	Coliformes Totais
Comercial 01	<10 ²	9,7x10 ³	<10	<10
Comercial 02	1x10 ²	7x10 ²	<10	<10
Comercial 03	1x10 ²	3x10 ²	<10	<10
Comercial 04	<10 ²	4,5x10 ³	1x10 ²	<10
Comercial 05	1x10 ²	9,5x10 ³	1x10 ²	4x10
Comercial 06	1x10 ²	<10 ²	<10	<10
Comercial 07	1x10 ²	7,6x10 ³	<10	<10
Comercial 08	5x10 ²	9,5x10 ³	4x10	<10
Comercial 09	5x10 ²	8,6x10 ³	3x10	<10
Comercial 10	<10 ²	6x10 ²	<10	<10

(1) Amostras de Pólen Apícola desidratado Comercial, (2) Unidade Formadora de Colônia por gramas

Conforme observado na Tabela 10, todas as amostras comerciais analisadas quanto aos parâmetros microbiológicos estão de acordo com os padrões estabelecidos pela Resolução Técnico Normativa nº 3 de 2001 para o produto para este produto. Bolores e leveduras não são contemplados pelo citado padrão, e pode-se observar que a população deste grupo microbiano, se encontra acima de 10³UFC/g, o que corresponde a cerca de 60% das amostras, sendo que apenas 10% das estão abaixo do nível de detecção desse microrganismo para este tipo de produto.

A baixa atividade de água (ver Tabela 05) observada nas amostras, deveria não permitir o crescimento microbiano, porém notou-se o crescimento de bolores e leveduras em 90% das amostras, *Bacillus cereus* em 70% das amostras. Uma hipótese a ser considerada seria a temperatura branda, normalmente utilizada para desidratar o pólen apícola que não elimina os esporos de bactérias mesófilas, nem os esporos de fungos. De acordo com FRANCO (2005), o alimento com tratamento térmico brando, não é suficiente para eliminar bactérias esporuladas do gênero *Bacillus*.

Um paralelo pode ser feito com as amostras *IN NATURA* e processadas no pólo de Pindamonhangaba, estudado anteriormente pelos dois métodos de desidratação. Nesta avaliação, o processo de desidratação A emprega

temperatura ao redor de 30°C, e o processo de desidratação B utiliza a temperatura ao redor de 40°C, observou-se nas amostras desidratadas por ambos os métodos o crescimento elevado da população fúngica de maneira constante, sem ser influenciada pela desidratação e outras injúrias sofridas por outras operações como o congelamento (ver Fluxograma 01) inerente ao processo estudado. As amostras *IN NATURA* examinadas verificaram-se o desenvolvimento de bolores e leveduras (ver Tabelas 06 e 07). Com base nestas informações, pode-se concluir que os tratamentos térmicos normalmente empregados para a obtenção de pólen apícola desidratado não reduzem a população de fungos, tornando-o um parâmetro importante a ser considerado em futuras legislações, uma vez que podem ser produtores de micotoxinas.

Outro fato a ser considerado, é o tipo de embalagem utilizada para o armazenamento do pólen desidratado, podendo ter permitido uma troca de umidade com o meio ambiente, propiciando o desenvolvimento microbiano, especialmente de bolores e leveduras.

Resumindo, em relação aos resultados microbiológicos observados nas amostras comerciais, pode-se levar em consideração que o pólen apícola não possui compostos antifúngicos, que o processamento usual não é uma barreira suficiente para reduzir a maioria dos contaminantes, especialmente os bolores e leveduras e bactéria esporuladas. O processo de higienização poderia ser adotado antes da ativação da colméia, uma vez que visa à redução da contaminação, evitando que seja um ponto crítico na cadeia produtiva do pólen apícola. A embalagem deste produto, também pode ser considerado um ponto crítico, pois facilita a troca de umidade com o ambiente, o que deve ser amenizado através do uso desta barreira.

5.2.3 ANÁLISES DOS SWABS DOS COLETORES

Nas Tabelas 11 e 12, estão expressos os resultados coletados através da técnica de Swab realizada nos coletores de pólen apícola das colméias experimentais do Pólo de Pindamonhangaba-SP. A finalidade desse teste é a verificação da eficiência do processo de higiene das colméias, realizado de acordo com a técnica preconizada por SALOMÉ & SALOMÉ (1998). Para este teste foram

adotadas as mesmas determinações microbiológicas utilizadas para o pólen apícola, a amostragem dos coletores ocorreu de forma aleatória das 6 colméias experimentais, utilizadas no estudo. Adotou-se a análise dos coletores no períodos de coleta do pólen apícola e antes e depois da sanitização dos mesmos.

Na Tabela 11, estão presente os resultados da Técnica de *Swab* realizada nos coletores de pólen, nos períodos de 24horas, 48horas e 72 horas, referentes às Colméias 1, 3 e 6 do apiário.

Tabela 11 Resultados da Técnica de *Swab* dos coletores de pólen das colméias, nos períodos de 24 horas, 48horas e 72horas no Pólo de Pindamangaba-SP.

AMOSTRA	DETERMINAÇÕES (UFC/g) ¹	
	<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e Levedura
Coletor 1, 24horas	<10	<10
Coletor 1, 48horas	<10	1x10
Coletor 1, 72horas	<10	9x10
Coletor 3, 24horas	<10	1x10
Coletor 3, 48horas	<10	3,3x10 ²
Coletor 3, 72horas	<10	3x10
Coletor 6, 24horas	<10	<10
Coletor 6, 48horas	<10	4x10
Coletor 6, 72horas	<10	2,2x10 ²

(1)Unidade Formadora de Colônia por Coletor.

De acordo com a Tabela 11, observou-se que os resultados do *Swab* dos coletores não apresentaram indicativos críticos para uma contaminação cruzada do pólen apícola coletado a partir destes coletores das colméias analisadas. Sendo assim no Coletor 1, no período de 24horas de exposição não apresentou nenhum crescimento microbiano, nos períodos de exposição de 48 e 72horas apresentaram contagem de bolores e leveduras. Verificou-se que não houve crescimento de Clostrídios Sulfito Redutores, Coliformes totais ate *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e Estafilococos coagulase positiva.

Para o Coletor 3 o nível de contaminação surgiu no primeiro período de 24horas, e assim permaneceu até o período de 72horas, este é um possível fator de contaminação por bolores e leveduras no pólen apícola.

Para o Coletor 6, o período de 24horas de exposição não apresentou contagem de nenhum microrganismo analisado. Nos períodos de 48 e 72horas apresentou contagem de 4×10 e $2,2 \times 10^2$ UFC/coletor, sendo um indicativo de contaminação do produto final.

Na Tabela 12, estão demonstrados os resultados dos coletores de pólen apícola antes e depois da higienização.

Tabela 12 Resultados da Técnica de Swab nos coletores de pólen higienizados e não higienizados.

AMOSTRA	DETERMINAÇÕES (UFC/g) ¹	
	<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e Levedura
Coletor 01, higienizado	<10	1×10
Coletor 01, não higienizado	<10	$4,7 \times 10^2$
Coletor 03, higienizado	<10	<10
Coletor 03, não higienizado	1×10	$1,7 \times 10^3$
Coletor 06, higienizado	<10	<10
Coletor 06, não higienizado	<10	$1,3 \times 10^2$

(1) Unidade Formadora de Colônia por Coletor.

Nesta etapa também não verificou o desenvolvimento dos microrganismos como Clostrídios Sulfito Redutores, Coliformes totais até *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e Estafilococos coagulase positiva.

Foram analisados os coletores de pólen apícola de numero 01, 03 e 06 das Colméias, quando higienizados e não higienizados, notou-se que os coletores não higienizados apresentaram contagens de bolores e leveduras e até mesmo *Bacillus cereus*, acarretando para a matéria-prima uma contaminação o que pode persistir durante o processo e aparecer no produto final.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, no Coletores 1 e 6 o nível de contaminação de bolores e leveduras chega a 10^2 UFC/coletor, porém o Coletor 3 apresentou um nível de contaminação de 10^3 UFC/coletor. Sendo apenas 3 coletores não higienizados apresentarem níveis relativamente elevados

de microrganismo deteriorante, não apresentando características dos microrganismos alvos, ou seja, os patógenos a saúde humana, indica o uso adequado das boas praticas de manuseio.

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As médias e análises estatísticas dos dados de pH, umidade e atividade de água para as três frequências de coleta efetuadas em março/abril de 2007 podem ser observadas na Tabela 13.

Tabela 13 Médias e análises estatísticas dos dados de pH, umidade e atividade de água do pólen apícola in natura e do pólen submetido a dois processos de desumidificação, em três frequências de coleta, na primeira fase de coleta (março/abril de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba.

	Frequência de coleta	TRATAMENTO			Média
		<i>IN NATURA</i>	Desumidificador A	Secadora B	
pH	24 horas	4,93±0,116 ^a	4,95±0,116 ^a	5,01±0,116 ^a	4,96±0,067
	48 horas	4,78±0,116 ^a	4,82±0,116 ^a	4,81±0,116 ^a	4,80±0,067
	72 horas	5,03±0,116 ^a	4,91±0,116 ^a	4,89±0,116 ^a	4,94±0,067
	Média	4,91±0,041 ^a	4,89±0,041 ^a	4,90±0,041 ^a	
	Pr>t Linear	0,604	0,849	0,558	
	Quadrática	0,235	0,518	0,396	
UMIDADE	24 horas	22,35±0,69 ^a	5,60±0,69 ^b	4,17±0,69 ^b	10,71±0,399
	48 horas	20,77±0,69 ^a	5,38±0,69 ^b	4,70±0,69 ^b	10,28±0,399
	72 horas	15,08±0,69 ^a	4,36±0,69 ^b	4,23±0,69 ^b	7,89±0,399
	Média	19,39±0,30	5,11±0,30	4,37±0,30	
	Pr>t Linear	<0,0001	0,271	0,961	
	Quadrática	0,088	0,674	0,602	
ATIVIDADE DE ÁGUA	24 horas	0,78±0,015 ^a	0,36±0,015 ^b	0,32±0,015 ^b	0,49±0,008
	48 horas	0,77±0,015 ^a	0,35±0,015 ^b	0,32±0,015 ^b	0,48±0,008
	72 horas	0,68±0,015 ^a	0,32±0,015 ^b	0,31±0,015 ^b	0,43±0,008
	Média	0,74±0,01	0,35±0,01	0,32±0,01	
	Pr>t Linear	<0,0001	0,028	0,522	
	Quadrática	0,078	0,302	0,565	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na horizontal diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05)

Não houve diferença estatística entre o pólen *IN NATURA* e o pólen que foi submetido aos dois processos de desidratação. Já a atividade de água e a umidade foram significativamente reduzidas pelos dois processos de desidratação

quando comparados aos resultados obtidos para o pólen *IN NATURA*, não havendo, no entanto, diferença estatística entre os dois processos de secagem (ver Tabela 13).

Na Tabela 14 são apresentadas a média e as análises estatísticas dos dados referentes à contagem de bolores e leveduras para o período de março/abril de 2007.

Tabela 14 Médias e análises estatísticas dos dados de contagem de bolores e leveduras no pólen apícola *IN NATURA* e no pólen apícola submetido a dois processos de desumidificação e três frequências de coleta, na primeira fase de coleta (março/abril de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba.

Frequência de coleta	TRATAMENTO			
	IN NATURA	Desumidificador A	Secadora B	Média
24 horas	32000±11602 ^a	35000±11602 ^a	60333±11602 ^a	42444±6698
48 horas	65333±11602 ^a	44667±11602 ^a	55333±11602 ^a	55111±6698
72 horas	77667±11602 ^a	23333±11602 ^a	32667±11602 ^a	44556±6698
Média	58333±6813	34333±6813	49444±6813	
Pr>t Linear	0,016	0,487	0,115	
Quadrática	0,470	0,293	0,542	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P>0,05)

Em análises estatísticas de contagem de bolores e leveduras verificou que o pólen apícola *IN NATURA* apresentou a média mais elevada do que o pólen apícola processado, em comparação dos dois processos, o Desumidificador A foi estatisticamente mais eficiente do que o processo da Secadora B.

A Figura 5.3.1 apresenta o crescimento de bolores e leveduras pelo tempo de exposição do pólen no campo.

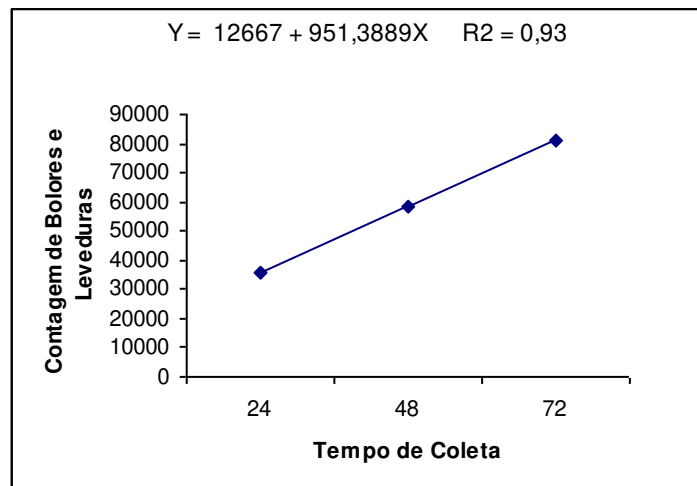


Figura 5.3.1 Representação gráfica da equação de regressão da contagem de bolores e leveduras em três frequências de coleta (24, 48 e 72h).

A comparação dos dados de bolores e leveduras obtidos no presente trabalho com a legislação vigente não é possível, pois a mesma não os inclui.

Três amostras do pólen *IN NATURA* que corresponde a porcentagem de 33,3% (ver Tabela 6) e quatro de cada um dos processos de desidratação do pólen (44,4%, ver Tabela 8) apresentaram contaminação por Clostrídios Sulfito Redutores. Quanto aos coliformes totais, todas as amostras *IN NATURA* apresentaram contagem superiores ao limite estabelecido pela legislação, 5×10^2 (BRASIL, 2001b) (ver Tabela 6), enquanto nenhuma amostra que passou pelos tratamentos de desidratação, apresentou tal contaminação.

Uma amostra do Desumidificador A de 72h e outra da Secadora B, de 48h, apresentaram contaminação por *Escherichia coli*, que é bactéria indicadora de contaminação fecal, enquanto as amostras *in natura* não apresentaram esta bactéria. Isso pode indicar uma falha nas operações de higiene durante o processamento do pólen.

Observou-se, portanto que, para o período de março/abril a umidade e a atividade de água foram reduzidas significativamente nos dois processos de desidratação, não havendo, no entanto, diferença estatística entre os tipos de desidratação (ver Tabela 15).

A Tabela 15 demonstra os dados coletados estatisticamente das avaliações físico-químicas das amostras do pólen apícola coletado nos meses de outubro e novembro de 2007.

Tabela 15 Médias e análises estatísticas dos dados de pH, umidade e atividade de água do pólen apícola *IN NATURA* e do pólen apícola submetido a dois processos de desumidificação, em três frequências de coleta, na segunda fase de coleta (outubro/novembro de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba.

	Frequência de coleta	TRATAMENTO			Média
		<i>IN NATURA</i>	Desumificador A	Secadora B	
pH	24 horas	5,46±0,128 ^a	5,71±0,128 ^a	5,73±0,128 ^a	5,63±0,074
	48 horas	4,99±0,128 ^a	5,19±0,128 ^a	5,19±0,128 ^a	5,12±0,074
	72 horas	5,18±0,128 ^a	5,18±0,128 ^a	5,08±0,128 ^a	5,14±0,074
	Média	5,21±0,029	5,36±0,029	5,33±0,029	
	Pr>t Linear	0,221	0,031	0,012	
	Quadrática	0,108	0,205	0,282	
UMIDADE	24 horas	16,28±0,628 ^a	2,87±0,628 ^b	2,74±0,628 ^b	7,30±0,363
	48 horas	21,78±0,628 ^a	3,37±0,628 ^b	2,92±0,628 ^b	9,35±0,363
	72 horas	18,06±0,628 ^a	3,27±0,628 ^b	3,19±0,628 ^b	8,17±0,363
	Média	18,71±0,123	3,17±0,123	2,95±0,123	
	Pr>t Linear	0,122	0,719	0,683	
	Quadrática	0,094	0,754	0,958	
ATIVIDADE DE ÁGUA	24 horas	0,69±0,028 ^a	0,33±0,028 ^b	0,37±0,028 ^b	0,46±0,016
	48 horas	0,75±0,028 ^a	0,39±0,028 ^b	0,37±0,028 ^b	0,50±0,016
	72 horas	0,71±0,028 ^a	0,33±0,028 ^b	0,30±0,028 ^b	0,45±0,016
	Média	0,72±0,009	0,35±0,009	0,34±0,009	
	Pr>t Linear	0,564	1,000	0,154	
	Quadrática	0,188	0,137	0,371	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05)

Em relação à população de bolores e leveduras, o pólen desidratado não diferiu significativamente do pólen *IN NATURA* (ver Tabela 15). Desta forma nenhum dos processos de desidratação empregados foram eficientes na redução destes microrganismos.

Pode-se supor que as temperaturas usadas nos dois processos (30°C e 40-42°C), os quais baseiam-se em valores que visam evitar a degradação das proteínas do pólen, podem ter contribuído para a multiplicação e desenvolvimento de colônias desses microrganismos. Outra hipótese é que a embalagem pode ter

permitido troca de gases com o meio ambiente e a umidade pode ter aumentado, permitindo o crescimento microbiano. Desta forma, a embalagem para acondicionamento e venda é mais um item que merece atenção e estudos futuros específicos.

Tabela 16 Médias e análises estatísticas dos dados de contagem de bolores e leveduras no pólen apícola in natura e do pólen apícola submetido a dois processos de desumidificação e três frequências de coleta, na segunda fase de coleta (outubro/novembro de 2007), em colméias experimentais do Pólo Regional de Pindamonhangaba.

Frequência de coleta	TRATAMENTO			Média
	<i>IN NATURA</i>	Desumidificador A	Secadora B	
24 horas	830000±209718	126700±209718	506667±209718	487789±121081
48 horas	3666853±209718	836667±209718	700000±209718	634507±121081
72 horas	516667±209718	228000±209718	290000±209718	344889±121081
Média	571173±94657 ^a	397122±94657 ^a	498889±94657 ^a	
Pr>tLinear	0,353	0,760	0,516	
Quadrática	0,298	0,078	0,304	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P>0,05)

Apenas duas amostras que passaram pelo processo de desumidificação na Secadora B apresentaram Clostrídios Sulfito Redutores e nenhuma amostra apresentou *E. coli* (ver Tabela 09).

Os coliformes totais estão presentes em todas as amostras *IN NATURA* de outubro/novembro (ver Tabela 07), indicando contaminação, mas não necessariamente de origem fecal. Em alguma etapa do processo de obtenção do pólen ocorreu esta contaminação, podendo inclusive, fazer parte da microbiota natural do pólen na natureza.

De maneira diferente do que ocorreu na coleta de março/abril de 2007 (ver Tabela 8), no período de outubro/novembro do mesmo ano, não houve diferença na contaminação das amostras considerando-se o tempo em que permaneceram no campo (ver Tabela 09).

A baixa atividade de água observada nas amostras, após a realização de ambos os processos de desumidificação (desidratação), nas duas fases de coleta, seria teoricamente capaz de não permitir o crescimento microbiano nesses produtos, no entanto, a população de fungos foi alta, mesmo após o processamento, permitindo também um crescimento bacteriano, menos evidente e

não tão constante. Pode-se tentar explicar o ocorrido por meio de algumas hipóteses:

- Como a temperatura de secagem é baixa pode ter permitido que fungos e algumas bactérias que são mesófilas tenham se desenvolvido no produto durante o processo de secagem;
- Após a amostra ter sido embalada, a embalagem pode ter permitido a condensação de água em alguma parte da amostra, mesmo imperceptível.
- A amostra pode ter sido contaminada ainda no campo e o processo de desumidificação com temperaturas até no máximo 42°C não é suficiente para eliminá-los, uma vez que há citações na literatura que processamento com temperaturas inferiores a 100°C, podem não ser eficientes para destruição de esporos bacterianos (FRANCO, 1996a).

Para GONZÁLES, *et al.*, (1995) o pólen apícola desidratado com valores de A_w extremamente baixos dificulta o desenvolvimento e multiplicação de contaminantes da microbiota, que poderão ocorrer no período entre a formação das bolotas pelas abelhas e ou a secagem do produto. A secagem deve ser feita apenas em ambiente fechado, rapidamente, com cuidados de higiene e, principalmente, de forma a evitar que patógenos não contaminem o produto (SERRA BOVEHI & ESCOLÀ JORDÀ, 1997). PANDEY, *et al.*, (1983), citado por Gonzáles informa que grãos de pólen de flores podem secretar substâncias que inibem germinação de esporos microbianos.

6 CONCLUSÕES

A partir de todos os resultados obtidos através de análises físico-químicas e microbiológicas, com complementação a análise estatísticas dos comportamentos do pólen na forma *IN NATURA* e desidratado, além das amostras comerciais do Estado de São Paulo, pode-se concluir que a microbiota natural do pólen é composta por fungos, coliformes totais e bactérias esporulantes mesófilas como o *Bacillus cereus*.

Apresentando parâmetros microbiológicos significativo de Bolores e Leveduras, seguido por *Bacillus cereus* e por bactérias coliformes totais, sendo fatores relevantes, pois a alta contagem fúngica pode produzir o metabólico como as micotoxinas, assim como a toxina desenvolvida pelos *Bacillus*.

O processo de desidratação utilizado para a remoção de água do pólen apícola não atinge temperatura suficiente para reduzir a população de bolores e leveduras da microbiota natural deste produto, este é o único processo no decorrer da produção do pólen desidratado que emprega o binômio tempo e temperatura, não sendo aplicado de forma correta e nem a aplicação de algum tipo de antifúngico, como visto em outros países.

A higienização do material e utensílios usados deve ser realizada de forma constante e rigorosa, pois a maioria destes são de madeira que se torna um foco de contaminação durante as etapas de processamento.

A época do ano em que o pólen é produzido também é um dos interferentes para contaminação principalmente por bolores e leveduras, pois quanto mais tempo este alimento fica exposto maior a probabilidade de contaminação estes microrganismos.

Desta maneira, com base na Legislação atual para padrões microbiológicos em alimentos, considerando-se a comparação com o grupo da granola, todas as amostras de pólen desidratado, tanto experimentais como comerciais, encontram-se dentro dos padrões estabelecidos. Bolores e leveduras não estão incluídos na Legislação do MAPA específica para o produto e deveriam ser considerados.

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em base neste estudo, que visa à garantia da qualidade do pólen apícola desidratado, notou-se que:

- O parâmetro microbiológico notório desta pesquisa foram Bolores e Leveduras, que devem ser introduzidos na Legislação;
- O processo de desumidificação deve ser otimizado, para que haja uma diminuição na contagem fúngica deste produto;
- A coleta do pólen apícola não deve ultrapassar 24 horas de exposição, evitando assim a contaminação por Bolores e Leveduras;
- Em relação aos materiais e utensílios de madeira utilizados deve-se focar na substituição por outro material mais apropriado para esta linha de processo;
- Outro ponto chave a ver avaliado é a embalagem usada para este produto.

Desta forma, com a ampla explanação das etapas do processo, e o levantamento das principais melhorias, com isto garantindo a qualidade do produto de origem apícola comercializado, não só no Estado de São Paulo e sim em todo País.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-MURADIAN, L.B. **Qualidades nutritivas dos produtos das abelhas.**
In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14.Campo Grande/MS, p.289-291, 2002.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M.
Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets.
Journal of Food Composition and Analysis, v. 18, p. 105-111, 2005.
- ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C.; SILVA, E.C.A.; SILVA, R.M.B.; TEIXEIRA, E.W. Quantidade diária de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) usando diferentes modelos de coletores. **Boletim da Indústria Animal**, v. 54, n.1, p.97-102, 1997.
- APACAME. **Associação Paulista de Apicultores.** Disponível em:
<<http://www.bichoonline.com.br/artifgos/apa0004.htm>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2008
- ARANDA, E.M.L. **El pólen, controles sanitários, norma legales.** Vida Apícola (94): 56-58,1999.
- ARGENTINA. **Código Alimentario Argentino, 18 de Julho de 1969.**
Regulamentação. Capitulo X, Artigos 767 a 818 dos *Alimentos Azucarados* da Secratária do Estado da Saúde. Buenos Aires, 2004. Art 785, p.16-17.
- BARRETO, L.M.R. C, FUNARI, S.R.C, ORSI, R.O. **Pólen Apícola: perfil da Produção no Brasil.** Universidade de Taubaté, 2003, 21p.
- BASTOS, D.H.M. , *et al.*,. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos Estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 62(3): 239-244, 2003.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº. 3, de 19 de Janeiro de 2001.** Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola do Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Brasília, 23 de jan. 2001a. Seção 1, p.18-23.

- BRASIL. **Resolução RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001.** Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 10 de jan. 2001b.
- BRUANT Jr, W.M. **Pollen nature's fingerprints of plants.** Yarkbook of Science and future, Encyclopedia Britannica, Chicago, Illinois, p.92-111,1990.
- CAMPOS, M.G.; CUNHA, A.; MARKHAM, K.R. **Bee-Pollen: composition, properties, and applications.** In: MIZHAHI, A.; LENSKY, Y. (ed) Bee Products: properties, applications and apitherapy. New York: Plenum Press, 1996. chap. 12, p. 93-100.
- CASTRO, R.N. , *et al.,.* **Aplicação da presença de vitaminas C, D e E por cromatografia líquida de alta eficiência, em amostras no estado do Rio de Janeiro, após análise palinológica.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14, 2002. Campo Grande/ MS, p.69.
- CERQUEIRA, J.E.M. **Importância das Abelhas para o Planeta Terra.** Monografia do Curso de Apiterapia. Associação Germânica de Apiterapia, 2007.
- CORONEL. B.B.;GRASSO, D.; PEREIRA, S.C.; FERNADEZ, G.. **Caracterización Bromatológica Del Pólen Apícola Argentino.** Ciência, Docência y Tecnologia, Universidade Nacional de Entre Rios. Concepción del Uruguay, Argentina, 2004, p.145 - 181
- COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura:** manejo e produtos. 2ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191p.
- DEL RISCO RIOS, C., **Polen-Pan de Abejas: Composición, Nutrición, Acción En La Salud Humana Y Microbiología,** Cuba: 2004.
- DONADIEU, Y.. **Le pollen-Therapeutique naturelle,** 1983. Tradução de Silvio Lengler. Rio Grande do Sul, 2002.
- DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of food.** 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA). 2001. 80p.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção – Equipamentos (Colméias)**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/equipamentos.htm>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2008

ETEC. **Atividade de água**. Disponível em: <<http://www.etec.com.br/ref323.html>>. Acesso em: 06 de junho de 2008.

FARIA, R.N. **Instrução de serviço DIPA nº002/04**, Instituto Mineiro de Agropecuária vinculada à Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belo Horizonte, 2004.

FRANCO, B.D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.p27-171.

FRANCO, B.D.G.M. Critérios microbiológicos para avaliação da qualidade de alimentos. In: FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996a. cap. 8, p. 149-154.

FRANCO, B.D.G.M. Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996c. cap. 2, p. 13-26.

FRANCO, B.D.G.M. Importância dos microrganismos nos alimentos. In: FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996b. cap. 1, p. 1-12.

FREIRE, L.C. Abelhas (Um Mel Necessário), 2004. Disponível em: <https://loja.tray.com.br/loja/produto-32653-69709-Abelhas_Um_Mel_Necessario__Luiza_Freire>. Acesso em: 24 de abril de 2008.

GETT, R., 2003. **Appendix 2 – Most Probable Number from Serial Dilutions**. In: US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*, Revision July 2003. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/êbam/bam-toc.html>>. Acesso em: 20 de março de 2008

- GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. **Apidologie**, v. 10, n. 1, p.43-53, 1979a.
- GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. **Apidologie**, v. 10, n.3, 269-274, 1979b.
- GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 1-9, 2005.
- HERBERT JR., E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidology**, v.9, n.1, p.33-40, 1978.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Vol. 1. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p.
- JAY, J.M./trad.: Tondo, E.C., et.al. **Microbiologia de Alimentos**. 6ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KRELL, R. Pollen In: KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. Roma, FAO Fiat Panis, 1996, cap.3, p.87-115 (FAO Agricultural Services Bulletin, 124).
- KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovate Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, p. 171-174, 2001.
- KUSHIDA, M.M. Validação de métodos laboratoriais: avaliação do sistema bax de análise de *Salmonella* sp em alimentos por reação de polimerase em cadeia (PCR). Campinas, 2005. 168p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996b. cap. 7, p. 109-148.
- LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996a. cap. 3, p. 27-32.

- LENGLER, S. **Os Produtos das Abelhas e seus Efeitos na Saúde Humana.** Artigo Técnico - CBA. Departamento de Zootecnia. Rio Grande do Sul, 2007.
- LENGLER, S. **Pólen Apícola.** Universidade de Santa Catarina. Rio Grande do Sul, 1ed., 1999.
- MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C. **Composição físico- química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.3, p949-953, 2006.
- MARTÍNEZ, A.T., **Cotribución a La Optimización Del Sistema Productiva Del Pólen en los Bosques Altoandinos de Colombia,** Veterinaria Y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, 2006.
- MORETI, A.C.de C.C. **Pólen: alimento protéico para as abelhas – Complemento alimentar para o homem.** Instituto de Zootecnia de São Paulo, 2006. Disponível em:<http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1178193451.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2008.
- NEUMAIER, R. **Efeitos de dois modelos de caça-pólen no desenvolvimento intrínseco e produção de mel em colméia de abelhas africanizadas.** 72p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1998.
- PANDEY, D.K., TRIPATHI, P.M., TRIPATHI, R.D., DIXIT, S.N., 1983. FUNGITOXICITY IN POLLEN GRAINS. **Grana**, v. 22, p.31– 32. In GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 1-9, 2005.
- PROST, J.P. **Apicultura.** Ediciones Mundi-Prensa, Espanha, 1985, p.306-315.
- RIBEIRO, J.G & SILVA, A.R. **Estudo Comparativo da Qualidade de Pólen Apícola Fresco, Recém Processado, Não Processado e Armazenado em Freezer e Pólen de Marca Comercial através de Análises Físico-Químico.** Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, Natal – RN, 2006.

- RISCO, C.A. **Pólen – Pan de Abejas: Composición, Nutrición, Acción en la Salud Humana y Microbiología**. Cuba, 2007.
- SALOMÉ, J.A.; SALOMÉ, L.G. **Manual práctico de produção de pólen apícola**. Santa Catarina: EPAGRI, 1998, 54 p.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 8.02. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 1167p.
- SCHEREN, D.L.B. *Apicultura racional*. Rural, São Paulo, 1986, 109 p.
- SCHMIDT, J.O. Bee Products: chemical composition and application. In: MIZHAHI, A.; LENSKY, Y. (ed) **Bee Products**: properties, applications and apitherapy. New York: Plenum Press, 1996. chap. 3, p. 15-26.
- SCHMIDT, J.O.; BUCHMANN, S.L. **Other products of the hive**. In: GRAHAM; J.M. The hive and the honey bee. Part A. Hamilton, Illinois: Dadant & Sons, Inc., 1992. chap. 22, p. 928-988.
- SCOTT, W.J. **Water relations of food spoilage microorganismos**. *Adv. Food Res.* 1: 83-127, 1957.
- SEGEREN, P. A Apicultura nas Regiões Tropicais. **Fundação Agromisa**, Wangeningin, 2004.
- SERRA BONVEHI, J., LOPEZ ALEGRET, P., **Estudes microbiologiques du pollen d'abeilles**. *Revue Française d'Apiculture*, v. 79, p. 259 – 266, 1986
- SERRA BONVEHI, J.; ESCOLÀ JORDÀ, E. Nutrient composition and microbial quality of honeybee collected pollen in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 725 – 732, 1997.
- SHUEL, R.W. The production of nectar and pollen. In: GRAHAM, J.M. **The hive and the honey bee**. Part A. Hamilton, Illinois: Dadant & Sons, Inc., 1992. chap. 10, p. 401-436.
- SILVA, C.H.M. **Novos Fatores contribuindo para longevidade humana**. 119p, 1994

- SILVA, N.; JUNQUEIRA V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológicas de Alimentos**, edição 2ªAmpliada, São Paulo: Livraria Varela, 2001
- SILVA, N.; JUNQUEIRA V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.;GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológicas de Alimentos**, 3 ed., São Paulo: Livraria Varela, 2007.
- SILVA, N.; NETO, R.C.;JUNQUEIRA V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.. **Manual de Métodos de Análise Microbiológicas da Água**, São Paulo: Livraria Varela, 2005.
- SILVEIRA, F.A.O. *Anatomia Vegetal*. Faculdade de Ciências de Curvelo – Departamento de Ciências Biológicas, Curvelo, 2004, 26p.
- SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. 159p.
- SNEATH, P.H.A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, 1986.
- SNEATH, P.H.A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, 1986.
- SOBRAL. **Projeto pra Implantação do Setor Apícola no Município de Sobral**. Disponível em: <<http://www.sobral.ce.gov.br/sec/srh/apicultura/apicultura.htm>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2008
- SOSNOWSKI,L.A. Pólen, **Água Mornas**, 2005, p3-14
- SPERS, E.E.; KASSOUF, A.L. A abertura de mercado e a preocupação com a segurança dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.10, n.46, p.16-26, 1996.
- TANIWAKI, M.H. **Meios de Cultura para Contagem de Fungos em Alimentos**. Artigo Técnico Revisado, SBCTA, (30)2:132:141, 1996.
- TRÍBOLI, E.**Doenças Bacterianas Transmitidas por Alimentos**. DAL 071-Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, São Caetano do Sul: 1995.

UFSC. Universidade Federal de Santa Catarina. **Salmonella's Bar**. Departamento de Química, Florianópolis, 1999. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/exemplar13.html>>. Acesso em: 24 de abril de 2008.

UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas. **Microbiologia Média - VALDÉS, G., Evaluación de La calidad microbiológica Del pólen apícola y pólen acidificado**, XXXV Congreso Internacional Apicultura, Apimondia, 1993.

VALDÉS, G.; GARCIA, O.; MARTIN, M.; GIRAL, T., **Evaluación de Las condiciones higiénicas Del pólen**. I Taller Internacional sobre Apiterapéuticos. II Simpósio sobre propóleos. La Habana, Cuba, 1991.

VELOSO, E.S., et.al. **Levantamento e produção de espécies apícolas em área de cerrado no município de Cassilândia**, Estado do Mato Grosso do Sul. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Brasil, 2004.

WIESE, H. **Apicultura novos tempos**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p.265-282

WITHERELL, P.C. Otros productos de la colmena. In: DADANT E HIJOS, ed. **La colmena y la abeja melífera**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1975. p. 684em: 07 de abril de 2008.