

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO ASSOCIADO UEL/UEPG/UNICENTRO

APLICAÇÃO DE ANÁLISE MULTIVARIADA E VISÃO COMPUTACIONAL A
PÓLEN DE *Apis mellifera* E ABELHAS SEM FERRÃO

GUARAPUAVA

2023

LEANDRA SCHUASTZ BREDA

**APLICAÇÃO DE ANÁLISE MULTIVARIADA E VISÃO COMPUTACIONAL A
PÓLEN DE *Apis mellifera* E ABELHAS SEM FERRÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lurdes Felsner
Coorientador: Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima

GUARAPUAVA
2023


LEANDRA SCHUASTZ BREDA

APLICAÇÃO DE ANÁLISE MULTIVARIADA E VISÃO COMPUTACIONAL A PÓLEN DE *Apis mellifera* E ABELHAS SEM FERRÃO

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 06 de outubro de 2023.

Prof^ª. Dr^ª. Andressa Galli (UNICENTRO)

Documento assinado digitalmente
 SUELI PERCIO QUINAIA
Data: 09/10/2023 10:59:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. Sueli Pércio Quinaia (UNICENTRO)

Prof^ª. Dr^ª. Paula Fernandes Montanher (UTFPR)

Prof. Dr. André Roberto Ortoncelli (UTFPR)

Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima (Coorientador)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Lurdes Felsner (Orientadora)

GUARAPUAVA-PR

2023

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

B831a Breda, Leandra Schuastz
Aplicação de análise multivariada e visão computacional a pólen de *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão / Leandra Schuastz Breda. – – Guarapuava, 2023.
xv, 111 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em Associação Ampla com UEL/UEPG, Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração: Química Analítica, 2023.

Orientadora: Maria Lurdes Felsner
Coorientador: Vanderlei Aparecido de Lima
Banca Examinadora: Andressa Galli, Sueli Pércio Quináia, Paula Fernandes Montanher, André Roberto Ortoncelli

Bibliografia

1. Origem botânica. 2. Proteína bruta. 3. Coloração. 4. Espécie de abelha. 5. Sazonalidade. 6. Análise de Rede. 7. Análise polínica. 8. Processamento digital de imagens. 9. Aprendizado de máquina. 10. Metodologia ambientalmente amigável. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 543

Dedico este trabalho aos meus pais Carmen e José Elvino,
ao meu esposo Francisco e ao meu filho Ector,
com amor.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Maria Lurdes Felsner, minha querida orientadora, cuja generosidade e dedicação foram infinitamente grandes e maiores do que o esperado e quem levarei sempre no meu coração com grande admiração pela profissional de exelência e amor ao próximo. Seus valiosos ensinamentos se tornaram meu aprendizado e sou eternamente grata;

Ao Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima pela coorientação, ensinamentos, ajuda e generosidade. Admiro muito seu amor por buscar saber sempre mais e por compartilhar seu conhecimento com tanta gentileza;

À Prof.^a Dr.^a Yohandra Reyes Torres que me recebeu como aluna do programa e todos os professores com que tive algum contato no decorrer do curso, cada ensinamento foi de extrema importância;

À Prof.^a Dr.^a Eryza Guimarães de Castro que me acolheu em momentos de decisão;

A Neusa Delgado de Souza que nunca mediu esforços para que tudo corresse na perfeita ordem;

À Prof.^a Dr.^a Fabiana Martins Costa Maia pela ideia para o primeiro projeto e pelo incentivo inicial;

À Prof.^a Dr.^a Paula Montagner pela abertura e acolhimento proporcionando a execução do meu estágio de docência;

Ao Dr. José Elton Melo Nascimento e seu orientador de doutorado da Universidade Estadual de Maringá, Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo pelas amostras e toda contribuição na realização desta pesquisa;

Aos colegas de sala da UNICENTRO, principalmente ao Duvan Gil Rodrigues que me ajudou estudar quando precisei, à Patricia Cucchi companheira de viagens, à Carine Vieira e à Tatiana Lima Valério que generosamente me acolheram por um longo período em seu lar, à Fernanda Galvão, Vandressa Alves e a todos os demais que caminharam comigo;

Aos colegas da UTFPR que torceram por mim e contribuíram em algum momento como a Raquel de Almeida Rocha, Eloise Leonora Gnoatto Rizzo, Viviane Cavaler, Danieli Ghedin Sartori, Américo Wagner Júnior e sua orientanda Caliandra Bernardi, entre outros;

À UTFPR, à DIRGE e à DIRPPG por proporcionar o edital de vagas para concessão do afastamento que me possibilitou fazer este doutorado;

Aos membros da banca de qualificação Prof.^a Dr.^a Solange Teresinha Carpes e Prof.^a Dr.^a Sueli Pércio Quináia e de defesa, Prof.^a Dr.^a Andressa Galli, Prof. Dr. Andre Roberto Ortoncelli, Prof.^a Dr.^a Eryza Guimarães de Castro, Prof.^a Dr.^a Paula Fernandes Montanher, Prof.^a Dr.^a Fabiana Martins Costa Maia e Prof.^a Dr.^a Sueli Pércio Quináia por sua valiosa contribuição;

À minha primeira professora Esther Matilde Pin Nicareta, exemplo de profissional, mãe e esposa, uma das pessoas mais gentis que conheço, um verdadeiro exemplo, e ao citá-la agradeço com carinho a todos os professores da minha vida, por cada ensinamento recebido;

Ao meu esposo, Francisco Egidio Breda, meu amor que abdicou de tanto junto comigo e sempre me incentivou a seguir em frente com tanto amor;

A meu filho amado Ector Breda por seu incentivo e amor;

À minha mãe amada, Carmen Miranda Nicolodi que sempre me incentivou a estudar, torceu e rezou por minhas conquistas;

Ao meu pai amado, José Elvino de Lima Schuastz que sempre me incentivou a estudar;

À minha irmã Cristina Schuastz e a minha sobrinha Giulia Beltrame que sempre acreditaram em mim e vibraram com os meus avanços;

Aos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho;

A Deus por permitir essa caminhada e sua conclusão;

À mim, por seguir em frente.

Meu agradecimento, respeito e admiração a todos.

RESUMO

O pólen de abelhas tem se destacado devido às suas características nutricionais e funcionais, sendo considerado um excelente suplemento dietético com possível uso comercial como ingrediente, em formulações de alimentos, cosméticos e em aplicações biomédicas. No entanto, sua utilização em nível industrial ainda é escassa devido a variabilidade em sua composição botânica, geográfica e físico-química. Sendo assim, torna-se essencial conhecer os aspectos relacionados a sua obtenção para melhorar sua aplicação como ingrediente ou para simplesmente ofertar ao consumidor um produto com composição menos variável. Portanto, é essencial identificar os fatores que afetam a composição botânica, como comportamento de forrageamento de diferentes espécies de abelhas e a sazonalidade que podem influenciar na coloração e na composição química do pólen de abelha para garantir sua qualidade nutricional. Desta forma, nesta tese foram aplicadas técnicas de análise multivariada e de visão computacional a dados de análise polínica e de composição físico-química de pólen de abelhas *Apis mellifera* e sem ferrão. A análise de rede demonstrou que as abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Scaptotrigona bipunctata*, devido às variações sazonais e fatores abióticos, coletaram amostras de pólen monoflorais de plantas das famílias Myrtaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae. As abelhas *Apis mellifera* e *Tetragona clavipes* apresentaram um comportamento mais generalista de forrageamento de pólen, coletando amostras heteroflorais na maioria das estações do ano. Os resultados dos modelos lineares generalizados mostraram que os fatores 'espécie de abelha' e 'estação do ano' afetam a quantidade e os tipos de pólen coletados pelas abelhas. Para avaliar como o comportamento de forrageamento de diferentes espécies de abelhas e a sazonalidade podem afetar a coloração do pólen de abelha, uma ANOVA de fatores aninhados foi aplicada a dados de cor instrumental de amostras coletadas pelas espécies de abelha *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão ao longo de quatro estações do ano. Os resultados da ANOVA demonstraram que a coloração do pólen de abelha tem maior contribuição da espécie de abelha, mas pode ser influenciada também pela sazonalidade e flora característica da região produtora. Além disso, foram observadas correlações significativas entre as coordenadas de cor L^* , a^* e b^* que podem estar associadas a contribuição predominante de determinadas espécies vegetais em virtude da disponibilidade da flora da região produtora e do hábito de forrageamento das espécies de abelhas. Este estudo explorou também o potencial da combinação do processamento digital de imagens com o aprendizado de máquina para o desenvolvimento de uma metodologia analítica rápida, barata e ambientalmente amigável para a determinação de proteína bruta em pólen de abelha. Imagens digitais das amostras de pólen de abelha foram obtidas por uma câmera de um celular smartphone com iluminação controlada e os canais RGB e histogramas de cor foram extraídos por softwares específicos de uso livre. Os teores de proteína bruta foram determinados pelo método padrão de Kjeldahl e em combinação com as informações das imagens digitais foram utilizados para gerar o modelo preditivo a partir da aplicação do algoritmo Floresta Randômica, o qual mostrou um bom desempenho e capacidade preditiva ($R^2 = 80,93\%$; RMSE (raiz quadrada média do erro) = $1,49\%$ e MAE (erro absoluto médio) = $1,26\%$). A metodologia analítica desenvolvida para análise de proteína bruta pode ser considerada verde, sendo uma excelente alternativa aos métodos convencionais de análise pois não emprega reagentes e solventes tóxicos, apresenta eficiência energética, faz uso de instrumentação de baixo custo, é robusta e precisa. Os resultados alcançados nesta tese demonstram a importância de se reconhecer as características da região de produção (condições climáticas, plantas disponíveis para as abelhas, tipo e quantidade de flores) e o comportamento de forrageamento de pólen pelas diferentes espécies de abelha. Estas informações podem ser usadas para estabelecer as melhores práticas de manejo das abelhas para a obtenção de pólen de abelha monofloral e heterofloral e com coloração mais uniforme, contribuindo para o desenvolvimento da apicultura e meliponicultura nacional. Além disso, o desenvolvimento e a validação da metodologia para a análise de proteína bruta combinando o processamento digital de imagens e aprendizado de máquina pode ser facilmente

implementada na análise de rotina em laboratórios de controle de qualidade de produtos derivados de abelhas, contribuindo para a garantia da qualidade alimentar e conseqüentemente para as futuras aplicações comerciais do pólen de abelha.

Palavras-chave: origem botânica, proteína bruta, coloração, espécie de abelha, sazonalidade, Análise de Rede, análise polínica, processamento digital de imagens, aprendizado de máquina, metodologia ambientalmente amigável.

ABSTRACT

Bee pollen has stood out due to its nutritional and functional characteristics, being considered an excellent dietary supplement with possible commercial use as an ingredient in food formulations, cosmetics, and biomedical applications. However, its utilization on an industrial level is still limited due to variability in its botanical, geographical, and physicochemical composition. Therefore, it is essential to understand aspects related to its collection in order to enhance its application as an ingredient or simply to offer consumers a product with less variable composition. Hence, it becomes essential to identify factors affecting the botanical composition, such as foraging behavior of different bee species and seasonality, which can influence the coloration and chemical composition of bee pollen to ensure its nutritional quality. In this thesis, multivariate analysis and computer vision techniques were applied to data on pollen analysis and the physicochemical composition of *Apis mellifera* and stingless bee pollen. *Network analysis* demonstrated that stingless bees *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata*, and *Scaptotrigona bipunctata*, due to seasonal variations and abiotic factors, collected monofloral pollen samples from plants of the Myrtaceae, Euphorbiaceae, and Fabaceae families. Bees *Apis mellifera* and *Tetragona clavipes* exhibited a more generalized pollen foraging behavior, collecting heterofloral samples in most seasons of the year. Results from the Generalized Linear Models showed that the 'bee species' and 'season' factors affect the quantity and types of pollen collected by bees. To assess how the foraging behavior of different bee species and seasonality can affect the coloration of bee pollen, a nested factors ANOVA was applied to instrumental color data from samples collected by *Apis mellifera* and stingless bees throughout four seasons of the year. ANOVA results demonstrated that the coloration of bee pollen is primarily influenced by the bee species, but it can also be influenced by seasonality and the characteristic flora of the producing region. Furthermore, significant correlations were observed between the L^* , a^* , and b^* color coordinates, which could be associated with the predominant contribution of specific plant species due to the availability of flora in the producing region and foraging habits of bee species. This study also explored the potential of combining digital image processing with machine learning for the development of a rapid, cost-effective, and environmentally friendly analytical methodology for determining crude protein contents in bee pollen. Digital images of bee pollen samples were obtained using a smartphone camera with controlled lighting, and RGB channels and color histograms were extracted using specific open-source software. Crude protein content was determined using the standard Kjeldahl method, and in combination with digital image informations, it was used to generate a predictive model through the Random Forest algorithm, which exhibited good performance and predictive ability ($R^2 = 80.93\%$; RMSE (root mean squared error) = 1.49%; MAE (mean absolute error) = 1.26%). The developed analytical methodology for crude protein analysis can be considered environmentally friendly, serving as an excellent alternative to conventional analysis methods as it avoids the use of toxic reagents and solvents, is energy-efficient, employs low-cost instrumentation, and is robust and precise. The results achieved in this thesis demonstrate the importance of recognizing the characteristics of the production region (climatic conditions, available plants for bees, type and quantity of flowers) and the pollen foraging behavior of different bee species. These informations can be used to establish best bee management practices for obtaining monofloral and heterofloral bee pollen samples with more uniform coloration, contributing to the development of national beekeeping and meliponiculture. Moreover, the development and validation of the methodology for crude protein analysis combining digital image processing and machine learning can be easily implemented in routine analyses in quality control laboratories for products derived from bees, ensuring food quality and consequently supporting future commercial applications of bee pollen.

Keywords: botanical origin, crude protein, coloration, bee species, seasonality, Network Analysis, pollen analysis, digital image processing, machine learning, environmentally friendly methodology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - Gráfico de rede de amostras de pólen de *Apis mellifera* coletadas em diferentes estações. A espessura das linhas ilustra a contribuição de frequências de contagem dos tipos polínicos encontrados pela análise polínica..... 38
- Figura 3.2** - Gráfico de rede de amostras de pólen de *Melipona marginata* coletadas em diferentes estações. A espessura das linhas ilustra a contribuição de frequências de contagem dos tipos polínicos encontrados pela análise polínica..... 41
- Figura 3.3** - Gráfico de rede de amostras de pólen de *Melipona quadrifasciata* coletadas em diferentes estações. A espessura das linhas ilustra a contribuição de frequências de contagem dos tipos polínicos encontrados pela análise polínica 43
- Figura 3.4** - Gráfico de rede de amostras de pólen de *Scaptotrigona bipunctata* coletadas em diferentes estações. A espessura das linhas ilustra a contribuição de frequências de contagem dos tipos polínicos encontrados pela análise polínica 45
- Figura 3.5** - Gráfico de rede de amostras de pólen de *Tetragona clavipes* coletadas em diferentes estações. A espessura das linhas ilustra a contribuição de frequências de contagem dos tipos polínicos encontrados pela análise polínica..... 47
- Figura 3.6** - Contribuição (%) de tipos polínicos nas amostras de pólen de *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão em diferentes estações do ano. Ilustração do efeito de interação entre ‘espécies de abelhas’ e ‘estações do ano’ 52
- Figura 4.1** - Influência dos fatores (a) espécie de abelha e (b) estação do ano na coordenada de cor (L*) de amostras de pólen de abelha. Am = *Apis mellifera*; Mm = *Melipona marginata*; Mq = *Melipona quadrifasciata*; Sb = *Scaptotrigona bipunctata*; Tc = *Tetragona clavipes* 67
- Figura 4.2** - Influência dos fatores (a) espécie de abelha e (b) estação do ano na coordenada de cor (a*) de amostras de pólen de abelha. Am = *Apis mellifera*; Mm = *Melipona marginata*; Mq = *Melipona quadrifasciata*; Sb = *Scaptotrigona bipunctata*; Tc = *Tetragona clavipes* 69
- Figura 4.3** - Influência dos fatores (a) espécie de abelha e (b) estação do ano na coordenada de cor (b*) de amostras de pólen de abelha. Am = *Apis mellifera*; Mm = *Melipona marginata*; Mq = *Melipona quadrifasciata*; Sb = *Scaptotrigona bipunctata*; Tc = *Tetragona clavipes* 71
- Figura 5.1** - Uma representação esquemática da abordagem realizada para o processamento digital das imagens (DIP) e geração do modelo preditivo para predição de proteína bruta pelo algoritmo de aprendizagem de máquina, Floresta Randômica (RF)..... 81

Figura 5.2 - Histograma da importância da variável dependente (teor de proteína bruta) em relação aos espaços de cor RGB e HSV	85
Figura 5.3 - Gráfico da correlação dos valores previstos e observados em relação aos teores de proteína bruta das amostras de pólen de abelha.....	87
Figura 5.4 - Resultados das métricas de verdura obtidas pelo software AGREE para as metodologias: (a) DIP-RF e (b) Kjeldahl aplicadas na análise de proteína bruta em pólen de abelha	90
Figura Ap.1 - Imagens digitais de amostras de pólen de <i>Apis mellifera</i> coletadas no período de junho/2018 a maio/2019. A esquerda ilustração do recorte da imagem digital (ROI) extraída do quadrante 6, com dimensões de 300 x 300 pixels. Codificação do ROI: Espécie de abelha (Am – <i>Apis mellifera</i>), estação do ano (A – outono; Sp – primavera; Su – verão; W – inverno) e número de entrada no laboratório (1 a 244)	107
Figura Ap.2 - Imagens digitais de amostras de pólen de <i>Melipona marginata</i> coletadas no período de junho/2018 a maio/2019. A esquerda ilustração do recorte da imagem digital (ROI) extraída do quadrante 6 com dimensões de 300 x 300 pixels. Codificação do ROI: Espécie de abelha (Mm – <i>Melipona marginata</i>), estação do ano (A – outono; Sp – primavera; Su – verão; W – inverno) e número de entrada no laboratório (1 a 244).....	108
Figura Ap.3 - Imagens digitais de amostras de pólen de <i>Melipona quadrifasciata</i> coletadas no período de junho/2018 a maio/2019. A esquerda ilustração do recorte da imagem digital (ROI) extraída do quadrante 6 com dimensões de 300 x 300 pixels. Codificação do ROI: Espécie de abelha (<i>Melipona quadrifasciata</i>), estação do ano (A – outono; Sp – primavera; Su – verão; W – inverno) e número de entrada no laboratório (1 a 244).....	109
Figura Ap.4 - Imagens digitais de amostras de pólen de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> coletadas no período de junho/2018 a maio/2019. A esquerda ilustração do recorte da imagem digital (ROI) extraída do quadrante 6 com dimensões de 300 x 300 pixels. Codificação do ROI: Espécie de abelha (Sb – <i>Scaptotrigona bipunctata</i>), estação do ano (A – outono; Sp – primavera; Su – verão; W – inverno) e número de entrada no laboratório (1 a 244).....	110
Figura Ap.5 - Imagens digitais de amostras de pólen de <i>Tetragona clavipes</i> coletadas no período de junho/2018 a maio/2019. A esquerda ilustração do recorte da imagem digital (ROI) extraída do quadrante 6 com dimensões de 300 x 300 pixels. Codificação do ROI: Espécie de abelha (Tc – <i>Tetragona clavipes</i>), estação do ano (A – outono; Sp – primavera; Su – verão; W – inverno) e número de entrada no laboratório (1 a 244).....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Testes de efeitos do modelo. Teste de Qui-quadrado de Wald e significância para os fatores estação do ano, espécie de abelha e sua interação	49
Tabela 3.2 - Variabilidade (%) de tipos polínicos em amostras de pólen de <i>Apis mellifera</i> e abelhas sem ferrão coletadas em diferentes estações do ano	50
Tabela 4.1 - Valores médios e desvios padrão de parâmetros de cor (L*, a*, b*) da escala CIELAB de amostras de pólen coletadas por diferentes espécies de abelhas e em diferentes estações do ano	66
Tabela 5.1 - Teores médios, erros padrão, intervalo e coeficiente de variação de proteína bruta (%) de amostras de pólen de <i>Apis mellifera</i> e abelhas sem ferrão coletados entre junho/2018 a maio/2019	82
Tabela An.1 - Tipos polínicos encontrados pela análise polínica realizada por Melo Nascimento (2020) em amostras de pólen de abelha coletados por <i>Apis mellifera</i> nas quatro estações do ano. (Continua).....	101
Tabela An.2 - Tipos polínicos encontrados pela análise polínica realizada por Melo Nascimento (2020) em amostras de pólen de abelha coletados por <i>Melipona marginata</i> nas quatro estações do ano	103
Tabela An.3 - Tipos polínicos encontrados pela análise polínica realizada por Melo Nascimento (2020) em amostras de pólen de abelha coletados por <i>Melipona quadrifasciata</i> nas quatro estações do ano	104
Tabela An.4 - Tipos polínicos encontrados pela análise polínica realizada por Melo Nascimento (2020) em amostras de pólen de abelha coletados por <i>Scaptotrigona bipunctata</i> nas quatro estações do ano	105
Tabela An.5 - Tipos polínicos encontrados pela análise polínica realizada por Melo Nascimento (2020) em amostras de pólen de abelha coletados por <i>Tetragona clavipes</i> nas quatro estações do ano	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGREE	Calculadora de Verdura de Métodos Analíticos (do inglês: <i>Analytical GREEnness software</i>)
ANOVA	Análise de Variância
DIP	Processamento digital de imagem (do inglês: <i>Digital Image Processing</i>)
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MAE	Erro absoluto médio (do inglês: <i>Mean Absolut Error</i>)
MLG	Modelos Lineares Generalizados
PA	Pólen Acessório
PD	Pólen Dominante
PII	Pólen Isolado Importante
PIO	Pólen Isolado Ocasional
PNG	Gráficos portáteis de rede (do inglês: <i>Portable Network Graphic</i>)
R ²	Coefficiente de Determinação
RF	Floresta Randômica (do inglês: <i>Randon Forest</i>)
RGB	Canais Vermelho, Verde e Azul (do inglês: <i>Red, Green and Blue</i>)
RMSE	Raiz quadrada média do erro (do inglês: <i>Root Mean Squared Error</i>)
ROI	Região de interesse (do inglês: <i>Region of Interest</i>)

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	16
1.1. OBJETIVOS	20
1.1.1. Objetivo geral	20
1.1.2. Objetivos específicos	20
1.2. ORGANIZAÇÃO DA TESE	21
1.3. REFERÊNCIAS	21
2. CAPÍTULO II	30
2.1. LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO PRODUTORA DE PÓLEN DE ABELHA	30
2.2. CLIMA DA REGIÃO PRODUTORA	30
2.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA	30
3. CAPÍTULO III	32
3.1. INTRODUÇÃO	32
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.2.1. Análise polínica	34
3.2.2. Análise estatística	35
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.3.1. Análises polínica e de rede de amostras de pólen de <i>Apis mellifera</i> e de abelhas sem ferrão	36
3.3.2. Influência da espécie de abelha e da estação do ano na origem botânica de pólen de abelha	48
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
3.5. REFERÊNCIAS	53
4. CAPÍTULO IV	62
4.1. INTRODUÇÃO	62
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	63
4.2.1. Análise polínica	63
4.2.2. Análise de cor instrumental	63
4.2.3. Análise estatística	64

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
5. CAPÍTULO V.....	76
5.1. INTRODUÇÃO.....	76
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
5.2.1. Determinação de proteína bruta.....	80
5.2.2. Obtenção e processamento das imagens digitais.....	80
5.2.3. Algoritmo floresta randômica (RF)	81
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
5.3.1. Estimativa dos teores de proteína bruta em pólen de abelha.....	82
5.3.2. Predição dos teores de proteína bruta em pólen de abelha por DIP-RF	83
5.3.3. Avaliação do impacto ambiental (Verdura) da metodologia de DIP-RF.....	88
5.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
5.5. REFERÊNCIAS	91
6. CAPÍTULO VI.....	100

1. CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O pólen de abelha é produzido quando as abelhas coletam grãos de pólen de plantas de interesse apícola e os aglutinam usando secreções salivares, néctar e/ou mel, criando bolotas que são armazenadas nos alvéolos da colmeia. Esse processo é essencial para o desenvolvimento e a manutenção das colônias, já que o pólen é a principal fonte de proteínas na dieta das abelhas, especialmente quando os recursos florais são escassos. Além disso, ele também serve como uma fonte de outros nutrientes que garantem o crescimento adequado da colônia (ARES et al., 2022; GIAMPIERI et al., 2022).

A composição do pólen de abelha é altamente variável e depende de fatores como a origem vegetal do pólen, a espécie de abelha, a região geográfica e a estação do ano em que ele é coletado. Mesmo com essa variabilidade, continua sendo considerado um dos melhores produtos alimentares do mundo, devido à sua riqueza em nutrientes essenciais e compostos funcionais, o que tem atraído o interesse de pesquisadores (GIAMPIERI et al., 2022; KIELISZEK et al., 2018; LI et al., 2018).

O consumo regular de pólen de abelha desidratado tem demonstrado inúmeros benefícios à saúde humana, tornando-o recomendado como um excelente suplemento dietético. Seus efeitos benéficos incluem a melhora do metabolismo celular, o fortalecimento dos músculos, a regulação de funções bioquímicas e a capacidade de combater o desgaste físico e mental extremo. Além disso, suas propriedades nutracêuticas têm sido extensivamente estudadas e têm mostrado potencial terapêutico na prevenção e tratamento de várias doenças, como proteção cardiovascular, atividades anti-inflamatórias, anticancerígenas e hepatoprotetivas. O pólen de abelha desidratado também tem sido utilizado como um suplemento alimentar para combater problemas de desnutrição e a falta de apetite em crianças, além de ser adotado como paliativo para minimizar os efeitos colaterais de tratamentos quimioterápicos e radioterápicos (HUANG et al., 2017; LI et al., 2018, SANYAL et al., 2023).

Além de suas propriedades nutricionais e terapêuticas, o pólen de abelha desidratado tem se destacado como um ingrediente bio(técnico) funcional, sendo utilizado para enriquecer a qualidade de diversos produtos alimentícios. Ele pode ser adicionado a produtos como iogurte, queijo, pão e bebidas fermentadas, melhorando suas características funcionais. Além disso, ele tem sido adotado como aditivo em formulações biomédicas, como biotintas, biopolímeros e na engenharia de tecidos, bem como na formulação de nanopartículas, explorando suas propriedades funcionais em aplicações avançadas (SANYAL et al., 2023).

Sua composição nutricional, com destaque para proteínas, carboidratos, lipídios e micronutrientes, torna-o especialmente atrativo como suplemento dietético inovador, especialmente para vegetarianos e atletas, bem como um ingrediente versátil em formulações alimentícias e biomédicas (GIAMPIERI et al., 2022; LAAROUSSI et al., 2023; SANYAL et al., 2023). As propriedades terapêuticas e nutricionais do pólen de abelha continuam sendo objeto de estudo e de interesse, tornando-o um produto de grande relevância científica e prática na atualidade (ARES et al., 2022; KIELISZEK et al., 2018; LI et al., 2018; LU et al., 2022; THAKUR; NANDA, 2020).

A produção de pólen de abelha pode ser oriunda de diversas espécies de abelhas como *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão que apresentam variadas preferências florais específicas na coleta de pólen, influenciadas por fatores como o tamanho da colônia, desenvolvimento larval, tipo de inflorescência, forma, cor e odor das flores, bem como a distância da colmeia à fonte floral e as condições climáticas da região produtora. A avaliação da flora local, preferências das abelhas e condições climáticas é essencial para padronizar e comercializar o pólen de abelha com características nutricionais e funcionais específicas.

Abelhas sem ferrão, amplamente distribuídas em várias regiões do mundo, incluindo países da América do Sul, África, Sudeste Asiático e Austrália, contribuem para o desenvolvimento da meliponicultura e a conservação da biodiversidade em diferentes biomas. No Brasil, as abelhas sem ferrão são nativas e têm grande importância como polinizadores e fontes de alimento, medicamentos e renda para as populações rurais. Apesar disso, a composição química e fitoquímica do pólen coletado por estas espécies de abelhas ainda é pouco explorada, demandando mais pesquisas sobre os fatores que levam à grande variabilidade observada nesse produto da Meliponicultura.

A caracterização das origens botânica e geográfica do pólen de abelha, é importante para compreender a variabilidade de sua composição química e desenvolver práticas de manejo para a obtenção de pólen monofloral, proveniente de fontes vegetais específicas. Para alcançar esse objetivo, é necessário conhecer a flora nativa da região de produção, a estação do ano em que o pólen é produzido, as espécies de abelhas e o manejo pós-coleta (BRODSCHNEIDER et al., 2019; CASTIGLIONI et al., 2019; CHAMORRO et al., 2017; MAILULA; NOFEMELA, 2017; RAMÍREZ-ARRIAGA et al., 2016; THAKUR; NANDA, 2020). A obtenção de pólen de abelha monofloral resulta em características nutricionais e composicionais mais uniformes, tornando-o um produto mais atrativo para aplicação como ingrediente em âmbito industrial.

A pesquisa de informações sobre as espécies de plantas cultivadas em regiões produtoras e utilizadas pelas abelhas é essencial para a caracterização do pólen de abelha. O Brasil apresenta

condições climáticas e recursos florais favoráveis ao desenvolvimento da apicultura e meliponicultura, porém, devido à vasta diversidade climática e florística do país, os estudos realizados ainda são insuficientes para uma caracterização precisa dos produtos decorrentes destas atividades em cada região. No Sul do Brasil, especialmente nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, tem se concentrado a maior parte das pesquisas sobre as características do pólen de abelha (BARTH et al., 2010), enquanto que estudos sobre a composição botânica e química do pólen no Estado do Paraná ainda são pouco desenvolvidos (CARPES et al., 2008), mas despertam o interesse de pesquisadores para melhorar o desenvolvimento da apicultura e meliponicultura nessa região do país.

A literatura mostra uma tendência em avaliar o impacto de diferentes estações do ano ou de variáveis climáticas na composição do pólen de abelha produzido por diferentes espécies de abelhas (abelhas melíferas e abelhas sem ferrão) em determinadas regiões do Brasil e do mundo (ALEIXO et al., 2017; BILISIK et al., 2008; DIMOU; THRASYVOULOU, 2007; HRNCIR et al., 2019; MATTOS; SOUZA; SOARES, 2018; MELO NASCIMENTO, 2020; MILANEZE et al., 2022; NEGRÃO; BARRETO; ORSI, 2014; NEGRÃO; ORSI, 2018).

O pólen de abelha desidratado é uma valiosa fonte de nutrientes, incluindo proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, fibras, carboidratos, lipídios e ácidos graxos. Além disso, possui compostos funcionais como pigmentos (carotenoides) e polifenóis, que atuam como potentes antioxidantes. Em sua composição, predominam os carboidratos (40-85%), seguidos pelas proteínas (2,5 – 62 %) e lipídios (1-10%) além de outros componentes presentes em menor proporção. As proteínas são o segundo maior constituinte e têm papel determinante no sabor e valor nutricional do pólen, além de fornecer importantes aminoácidos essenciais (GIAMPIERI et al., 2022; LI et al., 2018).

Uma vez que os teores de proteína no pólen de abelha podem variar de 2,5 a 62 % e são influenciados principalmente pela origem botânica (ARES et al., 2018; COSTA et al., 2017; GIAMPIERI et al., 2022; ISOPESCU et al., 2020; MARTINS et al., 2011; THAKUR; NANDA, 2020; WEGLIŃSKA et al., 2020) se faz necessário desenvolver técnicas de análise composicional do pólen de abelha desidratado com relação a este parâmetro. O desenvolvimento e a validação de metodologias ambientalmente amigáveis com sensibilidade, rapidez e exatidão são essenciais para assegurar a qualidade e a segurança alimentar deste produto, bem como para ampliar sua utilização em diferentes produtos como alimentos, fármacos, cosméticos e produtos biomédicos (GIAMPIERI et al., 2022; KIELISZEK et al., 2018; KOCOT et al., 2018; LAAROUSSI et al., 2023; LI et al., 2018; SANYAL et al., 2023).

Os métodos tradicionalmente adotados para a análise de proteínas em alimentos são ainda os mais utilizados e apresentam alguns inconvenientes como a extensa manipulação do analista, alto custo, elevado consumo de reagentes e de energia, longos tempos de análise, são destrutivos e geram grandes volumes de resíduos tóxicos. Em vista disso, tem sido observado o interesse de vários pesquisadores no desenvolvimento de novas metodologias analíticas que sejam rápidas, não destrutivas e ambientalmente amigáveis (ANJOS et al., 2017; ARES et al., 2018; ASKAR et al., 2021; GONÇALVES; SOARES; ROCHA, 2023; SAHA et al., 2023; WANG; CHENG, 2018; ZHOU et al., 2022) atendendo assim aos critérios da Química Analítica Verde (LOCATELLI et al., 2023; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022).

A aplicação de técnicas espectroscópicas combinadas com ferramentas quimiométricas a análise de proteínas em pólen de abelha desidratado tem sido relatada na literatura (ANJOS et al., 2017; ARES et al., 2018; COSTA et al., 2017; ISOPESCU et al., 2020; WEGLIŃSKA et al., 2020). Outra metodologia que vem ganhando destaque na análise de proteínas é a combinação da Hiper Imagem Espectral com as espectroscopias NIR ou Raman e ferramentas quimiométricas (SAHA et al., 2023; ZHOU et al., 2022). Apesar da ampla aplicação, estas técnicas ainda apresentam custo elevado de manutenção do equipamento e normalmente exibem uma modelagem mais complexa para o tratamento dos dados espectrais do que a utilizada quando se faz uso de técnicas de visão computacional que incluem o processamento de imagens digitais (DINIZ, 2020; GONÇALVES; SOARES; ROCHA, 2023).

O uso combinado de processamento digital de imagens e técnicas quimiométricas tem se mostrado uma alternativa simples e promissora para a análise de alimentos, permitindo a extração automática de informações de amostras e a classificação eficiente de características químicas e físicas (DINIZ, 2020; WANG; CHENG, 2018). Essa abordagem não invasiva e não destrutiva é considerada segura e ecologicamente amigável, utilizando equipamentos de baixo custo, fácil coleta de dados, automação de etapas e alta frequência analítica (MEENU et al., 2021). Apesar de todas as características interessantes do processamento digital de imagens combinado a ferramentas quimiométricas e sua vasta aplicação na caracterização e análise de alimentos (MEENU et al., 2021), a classificação e/ou predição de características químicas de pólen de abelha desidratado ainda é tímida e escassa e reportada somente para a classificação de grupos de cor e para a predição do perfil de carotenóides (SALAZAR-GONZÁLEZ et al., 2018, 2020). Em função de todas estas características é importante desenvolver novos métodos de caracterização da origem botânica ou de características composicionais do pólen de abelha.

Assim, nesta tese a Análise de Rede e os modelos lineares generalizados foram aplicados a dados de análise polínica para identificar a contribuição das espécies vegetais, das diferentes

espécies de abelhas e da estação do ano na variabilidade botânica de amostras de pólen de abelha. A influência destes fatores também foi avaliada na coloração deste produto apícola pela adoção de uma ANOVA de fatores aninhados. E finalmente, foi desenvolvida e validada uma metodologia preditiva com características verdes para a análise de proteína bruta em pólen de abelha usando a combinação do processamento digital de imagens com o algoritmo de aprendizado de máquina, Floresta Randômica.

Além disso, nenhum esforço tem sido dedicado até o momento para determinar a origem botânica do pólen de abelha produzido por *Apis mellifera* e por abelhas sem ferrão (*Melipona Marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*) coletados em diferentes estações do ano, em uma região bem definida (Maringá) no estado do Paraná, Brasil ou para investigar a influência das espécies de abelhas e das estações do ano na origem botânica e na coloração do pólen de abelha, usando ferramentas estatísticas e de modelagem matemática como as adotadas nesta tese.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Aplicar técnica e análise multivariada e visão computacional a pólen de abelha de *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão.

1.1.2. Objetivos específicos

- Verificar se há influência das espécies de abelhas e da sazonalidade na composição botânica do pólen de abelha por meio da Análise de Rede, dos Modelos Lineares Generalizados (MLG) e de dados da Análise Polínica.
- Verificar se há influência da sazonalidade e da espécie de abelha na coloração de pólen de abelha por meio de análises estatísticas.
- Avaliar se há viabilidade de desenvolver e validar uma metodologia ambientalmente amigável para determinação de proteína bruta em pólen de abelha utilizando o processamento digital de imagens combinado com o aprendizado de máquina.

1.2. ORGANIZAÇÃO DA TESE

Nesta tese foram estudadas várias abordagens para a caracterização e análise de amostras de pólen de diferentes espécies de abelhas. Sendo assim, para uma melhor compreensão dos resultados, a tese foi organizada em capítulos.

O capítulo I traz uma introdução geral sobre o tema, pontuando os aspectos mais importantes da investigação, bem como os objetivos da realização do estudo em questão. Na sequência o capítulo II trata da amostragem, onde foram descritos os métodos adotados para a coleta, o processamento e o armazenamento das amostras de pólen da abelha *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão, objeto de estudo desta tese, bem como uma descrição das características da região produtora.

Nos capítulos III, IV e V, são apresentados os três temas estudados: (III) Influência da variabilidade sazonal e da espécie de abelha na origem botânica do pólen; (IV) Variabilidade sazonal na coloração de pólen de *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão e (V) Predição verde e rápida dos teores de proteína bruta em pólen de abelha com base em suas imagens digitais combinadas com o algoritmo de aprendizado de máquina, Floresta Randômica. Cada capítulo contém os elementos textuais completos fechando cada tema e suas respectivas referências.

O capítulo VI apresenta a conclusão dos resultados alcançados com a realização desta tese. Na sequência, é apresentado o Anexo contendo as tabelas descritivas dos tipos polínicos encontrados pela análise polínica realizada por Melo Nascimento (2020) em amostras de pólen das diferentes espécies de abelhas, nas quatro estações do ano, as quais complementam a interpretação dos resultados apresentados no capítulo III referentes a classificação botânica das amostras. Em seguida, o Apêndice que é ilustrado com os recortes das imagens digitais das amostras de pólen das cinco espécies de abelhas, as quais foram utilizadas no tratamento dos dados apresentados no capítulo V.

1.3. REFERÊNCIAS

AL-AJLAN, A.; EL ALLALI, A. Feature selection for gene prediction in metagenomic fragments. **BioData Mining**, v. 11, n. 1, p. 9, dez. 2018.

ALEIXO, K. P. et al. Seasonal availability of floral resources and ambient temperature shape stingless bee foraging behavior (*Scaptotrigona aff. depilis*). **Apidologie**, v. 48, n. 1, p. 117–127, 2017.

ANCONI, A. C. S. A.; BRITO, N. C. S.; NUNES, C. A. Determination of peroxide value in edible oils based on Digital Image Colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.

113, p. 104724, out. 2022.

ANJOS, O. et al. Application of FTIR-ATR spectroscopy on the bee pollen characterization. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 3, p. 210–218, 2017.

ARES, A. M. et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 110–124, 2018.

ARES, A. M. . et al. Differentiation of bee pollen samples according to the apiary of origin and harvesting period.pdf. **Food Bioscience**, v. 50, p. 8, 2022.

ARRUDA, V. A. S. et al. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 2, p. 100–105, 2013.

ASKAR, M. et al. Comparison of soil quality indexes calculated by network and principal component analysis for carbonated soils under different uses. **Ecological Indicators**, v. 17, p. 2054–2061, 2021.

BALLESTEROS-VIVAS, D. et al. Green food analysis: Current trends and perspectives. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 31, p. 100522, out. 2021.

BÁRBARA, M. F. S. et al. Caracterizações microbiológica e físico-química de pólenes armazenados por abelhas sem ferrão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 0, p. 1–9, 2018.

BARTH, O. M. et al. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: A proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 893–902, 2010.

BARTH, O. M.; DE FREITAS, A. DA S.; VANDERBORGHT, B. Pollen preference of stingless bees (*Melipona rufiventris* and *M. quadrifasciata anthidioides*) inside an urban tropical forest at Rio de Janeiro city. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1005–1010, 2020.

BILISIK, A. et al. Seasonal variation of collected pollen loads of honeybees (*Apis mellifera L. anatoliaca*). **Grana**, v. 47, n. 1, p. 70–77, 2008.

BORCHARDT, K. E. et al. Plant–pollinator conservation from the perspective of systems-ecology. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47, p. 154–161, 2021.

BORLINGHAUS, P.; JUNG, J.; ODEMER, R. Introducing Pollenzyzer: An app for automatic determination of colour diversity for corbicular pollen loads. **Smart Agricultural Technology**, v. 5, p. 100263, out. 2023.

BREIMAN, L. Random forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, out. 2001.

BRODSCHNEIDER, R. et al. A citizen science supported study on seasonal diversity and monoflorality of pollen collected by honey bees in Austria. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–

12, 2019.

CALDAS, F. R. L. et al. COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIRADICALAR E ANTIMICROBIANA DO PÓLEN APÍCOLA DE FABACEAE. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 49–56, 2019.

CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660–1664, 2008.

CARPES, S. T. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 03, p. 220–229, out. 2009.

CASTIGLIONI, S. et al. Spectroscopic Properties of Bee Pollen Loads from Different Botanical Origin. **Molecules**, v. 24, n. 3874, p. 1–13, 2019.

CASTIGLIONI, S. et al. Characterisation of Bee Pollen from the Marche Region (Italy) According to the Botanical and Geographical Origin with Analysis of Antioxidant Activity and Colour , Using a Chemometric Approach. **Molecules**, v. 27, p. 1–14, 2022.

CHAMORRO, F. J. et al. Botanical origin and geographic differentiation of bee-pollen produced in high mountains from the Colombian eastern Andes. **Grana**, v. 56, n. 5, p. 386–397, 2017.

CHICA, M.; CAMPOY, P. Discernment of bee pollen loads using computer vision and one-class classification techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 112, n. 1-2, p. 50–59, 2012.

COSTA, M. C. A. et al. Analysis of bee pollen constituents from different Brazilian regions: Quantification by NIR spectroscopy and PLS regression. **Lwt**, v. 80, p. 76–83, 2017.

DE-MELO, A. A. M. et al. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **Lwt**, v. 65, p. 808–815, 2016.

DE-MELO, A. A. M. et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. **Food Bioscience**, v. 25, n. August, p. 91–110, 2018a.

DEVEZA, M. V. et al. Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1171–1176, 2015.

DIMOU, M.; THRASYVOULOU, A. Seasonal variation in vegetation and pollen collected by honeybees in Thessaloniki, Greece. **Grana**, v. 46, n. 4, p. 292–299, 2007.

DINIZ, M. E. DOS R.; BUSCHINI, M. L. T. Pollen analysis and interaction networks of floral visitor bees of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), in Atlantic Forest areas in southern Brazil. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 9, n. 6, p. 623–632, 2015.

DINIZ, P. H. G. D. Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems. **Journal of**

Chemometrics, v. 34, n. 12, dez. 2020.

DUARTE, A. W. F. et al. Honey and bee pollen produced by meliponini (Apidae) in alagoas, brazil: Multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 38, n. 3, p. 493–503, 2018.

DUARTE, R. S.; SOUZA, J.; SOARES, A. E. E. Nest architecture of *Tetragona clavipes* (Fabricius) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 813–818, 2016.

ENNAJI, O.; VERGÜTZ, L.; EL ALLALI, A. Machine learning in nutrient management: A review. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v. 9, p. 1–11, set. 2023.

ESTEVINHO, L. M. et al. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 429–435, 2012.

FAN, Y. et al. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, p. 108829, fev. 2021.

GIAMPIERI, F. et al. Bee Products : An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 6833–6848, 2022.

GOMES, A. DE A. et al. Pattern recognition techniques in food quality and authenticity: A guide on how to process multivariate data in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 164, p. 117105, jul. 2023.

GONÇALVES, I. C.; SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Exploiting microdistillation and smartphone-based digital-image colorimetry for determination of protein in foods. **Microchemical Journal**, v. 188, n. 108458, 2023.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 998–1003, maio 2007.

GUPTA, J. K.; SHARMA, R.; OJHA, K. N. Bee pollen as a hive product and potentials of its use in human diet. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, v. 1, n. 1, p. 39–48, 2011.

HEVEY, D. Network analysis: A brief overview and tutorial. **Health Psychology and Behavioral Medicine**, v. 6, n. 1, p. 301–328, 2018.

HILÁRIO, S. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Pollen foraging in colonies of *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponini): Effects of season, colony size and queen number. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 664–671, 2009.

HRNCIR, M. et al. Stingless bees and their adaptations to extreme environments. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v.

205, n. 3, p. 415–426, 2019.

HUANG, H. et al. Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 1765–1776, 2017.

HUMEAU-HEURTIER, A. Color Texture Analysis: A Survey. **IEEE Access**, v. 10, p. 107993–108003, 2022.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; RAMALHO, M. Pollen Harvest By Eusocial Bees In A Non-Natural Community In Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 5, n. 2, p. 239–242, 1989.

ISOPESCU, R. D. et al. Romanian bee pollen classification and property modelling. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 443–451, 2020.

KEBONYE, N. M.; AGYEMAN, P. C.; BINEY, J. K. M. Optimized modelling of countrywide soil organic carbon levels via an interpretable decision tree. **Smart Agricultural Technology**, v. 3, p. 100106, fev. 2023.

KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 170–180, 2018.

KLEINERT, A. D. M. P.; GIANNINI, T. C. Generalist bee species on Brazilian bee-plant interaction networks. **Psyche (London)**, v. 2012, p. 7, 2012.

KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Aspects of the Trophic Niche of Melipona Marginata Marginata Lepeletier (Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, v. 18, n. 1, p. 69–100, 1987.

KOCOT, J. et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 7074209, p. 29, 2018.

LAAROUSSI, H. et al. Unveiling the techno-functional and bioactive properties of bee pollen as an added-value food ingredient. **Food Chemistry**, v. 405, n. November 2022, p. 12, 2023.

LANDER, T. Network modelling, citizen science and targeted interventions to predict, monitor and reverse bee decline. **Plants People Planet**, v. 2, p. 111–120, 2020.

LANDI, P. et al. Complexity and stability of ecological networks: a review of the theory. **Population Ecology**, v. 60, p. 319–345, 2018.

LI, Q. Q. et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. **Journal of Functional Foods**, v. 49, n. August, p. 472–484, 2018.

LOCATELLI, M. et al. Green profile tools: Current status and future perspectives. **Advances in Sample Preparation**, v. 6, p. 100068, maio 2023.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v. 51, n. 3, p. 125–138, 1970.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v. 59, n. 4, p. 139–157, 1978.

LU, P. et al. NMR and HPLC profiling of bee pollen products from different countries. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, n. 100119, p. 12, 2022.

MAIA-SILVA, C. et al. Environmental windows for foraging activity in stingless bees, *Melipona subnitida* Ducke and *Melipona quadrifasciata* lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 378–385, 2014.

MAILULA, M. T.; NOFEMELA, R. S. Botanical origin of pollen collected by *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) in a suburb of Pretoria, South Africa. **African Entomology**, v. 25, n. 2, p. 417–427, 2017.

MARTINS, M. C. T.; MORGANO, M. A.; VICENTE, E.; BAGGIO, S. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states. **Journal of Apicultural Science**, v. 55, p. 107, 2011.

MARTÍN-SANZ, J. P. et al. Comparison of soil quality indexes calculated by network and principal component analysis for carbonated soils under different uses. **Ecological Indicators**, v. 143, n. July, p. 1 – 14, 2022.

MASEKO, K. H. et al. Discrimination of Musa banana genomic and sub-genomic groups based on multi-elemental fingerprints and chemometrics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, p. 104334, mar. 2022.

MATTOS, I. M.; SOUZA, J.; SOARES, A. E. E. Analysis of the effects of climate variables on *Apis mellifera* pollen foraging performance. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1301–1308, 2018.

MELO NASCIMENTO, J. E. **Caracterização botânica e físico-química do mel e pólen dos meliponíneos e pólen da *Apis***. [s.l.] UEM - Universidade Estadual de Maringá, 2020.

MONTERO, I.; TORMO, R. Análisis polínico de mieles de cuatro zonas montañosas de Extremadura. **Anales de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española**, v. 5, p. 71–78, 1990.

MORGANO, M. A. et al. A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: Geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 727–736, 2012.

MOURA, M. E. K. DE et al. Influence of some abiotic factors on the flight activity of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) in Southern Brazil. **Journal of Apicultural Research**, p. 7, 2022.

NASCIMENTO, J. E. M. et al. Temporal variation in production and nutritional value of pollen used in the diet of *Apis mellifera L.* in a seasonal semideciduous forest. **Sociobiology**, v. 66, n. 2, p. 263–273, 2019.

NEGRÃO, A. F.; BARRETO, L. M. R. C.; ORSI, R. O. Influence of the collection season on production, size, and chemical composition of bee pollen produced by *Apis mellifera L.* **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 5–10, 2014.

NEGRÃO, A. F.; ORSI, R. DE O. Harvesting season and botanical origin interferes in production and nutritional composition of bee pollen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 325–332, 2018.

NOVAIS, J. S. DE; LIMA, L. C. L. E.; SANTOS, F. DE A. R. DOS. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera L.* in a semi-arid area from Bahia, Brazil. **Grana**, v. 48, n. 3, p. 224–234, 2009.

OFORI, D. A. et al. Coletor de pólen para abelhas sem ferrão. **Molecules**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2020.

OLIVEIRA-ABREU, C. et al. Pollen and nectar foraging by *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepageletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in natural habitat. **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 441–448, 2014.

PENA-PEREIRA, F. et al. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, p. 100025, ago. 2022.

RAMALHO, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 37–47, 2004.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 469–488, 1990.

RAMÍREZ-ARRIAGA, E. et al. Análisis palinológico de mieles y cargas de polen de *Apis Mellifera* (Apidae) de la Región Centro y Norte del Estado de Guerrero, México. **Botanical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 141–156, 2016.

REBELO, K. S. et al. Nutritional composition and bioactive compounds of *Melipona seminigra* pot-pollen from Amazonas, Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 12, p. 4907–4915, 2021.

RODRIGUES DE S., B. et al. Physicochemical parameters and content of b-complex vitamins: An exploratory study of bee pollen from southern Brazilian states. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 45, n. 3, p. 232–242, 2018.

ROZMAN, A. S. et al. A Comprehensive Review of Stingless Bee Products: Phytochemical Composition and Beneficial Properties of Honey, Propolis, and Pollen. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 13, 2022.

SAHA, D. et al. Application of near-infrared hyperspectral imaging coupled with chemometrics for rapid and non-destructive prediction of protein content in single chickpea seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 115, p. 104938, jan. 2023.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, p. 123046, fev. 2022.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C. Y. et al. Analysis of Multifloral Bee Pollen Pellets by Advanced Digital Imaging Applied to Functional Food Ingredients. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 328–335, dez. 2018.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C. Y. et al. Carotenoid profile determination of bee pollen by advanced digital image analysis. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 175, p. 105601, ago. 2020.

SANYAL, A. et al. Revolutionizing the Use of Honeybee Products in Healthcare : A Focused Review on Using Bee Pollen as a Potential Adjunct Material for Biomaterial Functionalization. **Functional Biomaterials**, v. 14, n. 352, p. 30, 2023.

SILVA, C. I. DA et al. **Guia ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil**. 1. ed. São Paulo - SP: Ministério do meio ambiente, 2014.

SILVA FERNANDES, J. et al. Tea authentication and determination of chemical constituents using digital image-based fingerprint signatures and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 421, p. 136164, set. 2023.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507–511, 2006.

SIPOS, L. et al. Classification of bee pollen and prediction of sensory and colorimetric attributes—a sensometric fusion approach by e-nose, e-tongue and nir. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 23, p. 1–22, 2020.

STANLEY, R.G. & LINSKENS, H. F. **Pollen Biology Biochemistry Management**. Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1974.

STRAUMITE, E. et al. Physical and Microbiological Characteristics and Antioxidant Activity of Honey Bee Pollen. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 6, 2022.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, p. 82–106, 2020.

VENKATARAJU, A. et al. A review of machine learning techniques for identifying weeds in corn. **Smart Agricultural Technology**, v. 3, p. 100102, fev. 2023.

VIT, P. et al. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and

Scaptotrigona stingless bees from Paria Grande , Amazonas State , Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 78–84, 2016.

WANG, J. et al. A term function-aware keyword citation network method for science mapping analysis. **Information Processing and Management**, v. 60, p. 1–18, 2023.

WANG, Y.; CHENG, J. Rapid and Non-destructive Prediction of Protein Content in Peanut Varieties Using Near-infrared Hyperspectral Imaging Method. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 40–43, 2018.

WEGLIŃSKA, M. et al. Determination of nutritional parameters of bee pollen by Raman and infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 212, n. November 2019, 2020.

WILMS, W.; WIECHERS, B. Floral resource partitioning between native Melipona bees and the introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rain forest. **Apidologie**, v. 28, n. 6, p. 339–355, 1997.

WILSON, R. S. et al. Many small rather than few large sources identified in long-term bee pollen diets in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 310, p. 8, 2021.

YANG, K. et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 708–718, 2013.

ZHANG, Y. et al. Deep learning in food category recognition. **Information Fusion**, v. 98, p. 101859, out. 2023.

ZHOU, M. et al. Machine learning modeling and prediction of peanut protein content based on spectral images and stoichiometry. **Lwt**, v. 169, n. 114015, p. 10, 2022.

2. CAPÍTULO II

AMOSTRAGEM

Neste capítulo foram descritos os métodos adotados para a coleta, o processamento e o armazenamento das amostras de pólen da abelha *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão, objeto de estudo desta tese, bem como uma descrição das características da região produtora.

2.1. LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO PRODUTORA DE PÓLEN DE ABELHA

As amostras de pólen de abelha foram coletadas e processadas, no período compreendido entre junho de 2018 a maio de 2019, por Melo Nascimento (2020) no Setor de Apicultura e Meliponicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), Unidade de Ensino da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizada em Maringá, no Norte do Paraná (coordenadas 23°15'15" e 23°33'27" S e 51°50'05" e 52°05'59" W).

2.2. CLIMA DA REGIÃO PRODUTORA

O clima da região de produção das amostras de pólen de abelha é classificado como *Cfa* (h), subtropical úmido mesotérmico, com índice pluviométrico anual superior a 1.500 mm.

2.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA

As amostras de pólen de abelha ($n = 245$) foram coletadas durante o período de junho de 2018 a maio de 2019. Neste período foram obtidas 55 amostras de *Apis mellifera* e das abelhas sem ferrão, 42 amostras de *Melipona marginata*, 44 amostras de *Melipona quadrifasciata*, 58 amostras de *Scaptotrigona bipunctata* e 46 amostras de *Tetragona clavipes*.

As amostras de pólen de abelha de *Apis mellifera* foram produzidas em colmeias tipo Langstroth e coletadas em cinco colônias. A cada duas semanas, um coletor de pólen era inserido na entrada das colméias, que retinha o pólen por dois dias e ao final desse período era coletado o pólen de abelha. As duas amostras de pólen de abelha coletadas ao longo do mês foram homogeneizadas após a limpeza, a fim de obter uma única amostra mensal durante o período de coleta.

As amostras de pólen de abelhas sem ferrão foram produzidas em colmeias tipo INPA e coletadas mensalmente em cinco colônias de cada espécie de abelha sem ferrão. Com o auxílio de uma espátula, foram retirados cerca de 10 g de pólen (quando havia estoque) de cada colônia de abelhas, diretamente dos potes de pólen presentes no ninho (MELO NASCIMENTO, 2020).

Posteriormente, as amostras frescas de pólen de abelha foram limpas, removendo-se manualmente as sujidades inerentes ao processo de coleta (abelhas mortas, larvas de abelhas e própolis). Cada amostra de pólen de abelha foi acondicionada em tubos Falcon, identificada pela espécie de abelha, colônia e mês de coleta, e armazenada a -20 °C até a realização das análises.

A identificação das amostras de pólen de abelha coletadas nesse período, foi baseada em três fatores: espécie de abelha, colmeia/colônia e mês/ano da coleta como ilustrado na Figura 2.1. Para cada espécie de abelha haviam cinco colmeias proporcionando um total de cinco amostras mensais de pólen. Para o pólen obtido pela coleta da abelha *Apis mellifera* as amostras quinzenais foram homogeneizadas para a obtenção de uma amostra mensal. Como as abelhas podem coletar uma menor quantidade de pólen em determinados períodos, o que está condicionado a sua atividade forrageira ao longo do ano, a quantidade total de amostras de pólen obtidas para cada espécie de abelha foi diferente para o período de coleta investigada.

Previamente, à realização das análises polínica e de composição química (coloração e proteína bruta), as amostras de pólen de abelha foram descongeladas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 55 °C por 72 horas (MELO NASCIMENTO, 2020). Após esse período de secagem, estas foram homogeneizadas por trituração em pilão e peneiramento em peneira de 1 mm.

3. CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE SAZONAL E DA ESPÉCIE DE ABELHA NA ORIGEM BOTÂNICA DO PÓLEN

3.1. INTRODUÇÃO

O pólen de abelha é produzido pela coleta de pólen de espécies vegetais por abelhas que aglutinam esse pólen utilizando secreções salivares e/ou néctar para formar bolotas, que, por sua vez, são armazenados nas colmeias de abelhas melíferas ou em potes de pólen para as abelhas sem ferrão. A coleta de pólen pelas abelhas desempenha um papel essencial no desenvolvimento e manutenção de suas colônias; sendo também a principal fonte de proteína na dieta desses insetos (GIAMPIERI et al., 2022).

O pólen de abelha possui proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, ácidos graxos, carboidratos, fibras, minerais, esteróis, terpenos, pigmentos e fontes de polifenóis. Dada a sua diversidade composicional, este tem sido reconhecido como um alimento funcional, pois apresenta compostos biologicamente ativos (com propriedades antibacteriana, antifúngica e antioxidante) que podem ser utilizados para fins terapêuticos e profiláticos, na prevenção de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (ARRUDA et al., 2013; BÁRBARA et al., 2018; CALDAS et al., 2019; CARPES et al., 2008; CASTIGLIONI et al., 2019; CHAMORRO et al., 2017; GIAMPIERI et al., 2022; GUPTA; SHARMA; OJHA, 2011; MARTINS et al., 2011; MORGANO et al., 2012; THAKUR; NANDA, 2020).

Recentemente, vários pesquisadores ao redor do mundo demonstraram interesse em investigar as propriedades benéficas à saúde apresentadas pelo pólen de abelha e seu potencial uso como ingrediente nas indústrias farmacêutica e alimentícia. No entanto, sua aplicação comercial permanece desafiadora devido à significativa variabilidade em sua composição, que é afetada por fatores como espécies de plantas vegetais visitadas pelas abelhas, condições ambientais, estado nutricional das plantas, região de coleta, estação do ano, métodos de preservação e condições de armazenamento (GUPTA; SHARMA; OJHA, 2011; MARTINS et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2019).

Vários relatos na literatura têm se concentrado na caracterização das origens botânica e geográfica do pólen de abelha, para melhor entender a variabilidade de sua composição química e permitir um melhor desenvolvimento de práticas de manejo voltadas para a obtenção de pólen de abelha de fontes vegetais específicas, conhecidas como pólen monofloral. No entanto, para atingir

esse objetivo, é necessário conhecer a flora nativa da região de produção, a estação do ano em que esse pólen de abelha é coletado, as espécies de abelhas e o manejo pós-coleta (BRODSCHNEIDER et al., 2019; CASTIGLIONI et al., 2019; CHAMORRO et al., 2017; MAILULA; NOFEMELA, 2017; RAMÍREZ-ARRIAGA et al., 2016; THAKUR; NANDA, 2020). Considerando essas informações, é possível obter pólen classificado como monofloral, que possui características nutricionais e composicionais mais homogêneas, tornando-se um produto mais interessante para a posterior aplicação industrial.

Informações sobre espécies de plantas cultivadas em regiões produtoras e utilizadas pelas abelhas desempenham papel essencial no processo de caracterização do pólen de abelha (NOVAIS; LIMA; SANTOS, 2009). As condições climáticas e os recursos florais no Brasil são bastante favoráveis ao desenvolvimento da apicultura (MARTINS et al., 2011). No entanto, dada a vasta diversidade climática e floral, os resultados dos estudos realizados ainda são insuficientes para permitir a caracterização rápida e precisa dos produtos derivados da apicultura e meliponicultura em cada região do Brasil. As pesquisas realizadas na região Sul têm focado principalmente nas características do pólen de abelha obtido nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (BARTH et al., 2010). Estudos realizados no Estado do Paraná sobre a composição botânica e química do pólen de abelha ainda são escassos (CARPES et al., 2008) e têm despertado o interesse de pesquisadores em realizar estudos de caracterização que visem melhorar o desenvolvimento da apicultura e da meliponicultura nessa região.

A literatura mostra uma tendência em avaliar o impacto de diferentes estações do ano ou de variáveis climáticas na composição do pólen de abelha produzido por diferentes espécies de abelhas (melíferas e sem ferrão) em determinadas regiões do Brasil e do mundo (ALEIXO et al., 2017; BILISIK et al., 2008; DIMOU; THRASYVOULOU, 2007; HRNCIR et al., 2019; MATTOS; SOUZA; SOARES, 2018; MELO NASCIMENTO, 2020; NASCIMENTO et al., 2019; MILANEZE et al., 2022; NEGRÃO; BARRETO; ORSI, 2014; NEGRÃO; ORSI, 2018). É reconhecido que diferentes espécies de abelhas apresentam preferências florais específicas na época da coleta de pólen, e que essas preferências são afetadas por diversos fatores, como tamanho da colônia, desenvolvimento larval em ninhos na colméia, tipo de inflorescência da espécie vegetal, forma da flor, cor e odor e distância da colmeia à fonte floral, entre outros (ALEIXO et al., 2017; HILÁRIO; IMPERATRIZ-FONSECA, 2009).

O clima da região produtora, por sua vez, pode afetar a coleta de pólen pelas abelhas; conseqüentemente, pode influenciar tanto a composição química quanto botânica deste produto. Portanto, é fundamental estudar as relações entre a flora local, as preferências de cada espécie de abelha e as condições climáticas dentro de uma mesma região produtora para melhor caracterizar

a origem botânica e as contribuições nutricionais do pólen de abelha, de forma a ampliar sua posterior aplicação comercial. Como as variáveis descritas acima apresentam aspectos relacionais entre si é importante fazer uso de estratégias de modelagem matemática ou estatística para entender a conexão entre elas e como esta é afetada ao longo do tempo em uma dada região produtora.

Nesse sentido, a Análise de Rede tem se destacado como uma técnica de modelagem matemática amplamente usada para entender relações entre variáveis. Ela tem sido aplicada em diferentes áreas do conhecimento para revelar tendências de pesquisa em dados bibliográficos, definir tendências em tratamentos médicos, e estudos farmacológicos ou de saúde pública, em estudos de interesse ambiental e especialmente em estudos ecológicos visando entender as relações entre diferentes espécies dentro de um dado ecossistema, entre outras (ASKAR et al., 2021; BORCHARDT et al., 2021; HEVEY, 2018; LANDER, 2020; LANDI et al., 2018; MARTÍN-SANZ et al., 2022; WANG et al., 2023). Este tipo de modelagem matemática permite a construção de diferentes modelos de gráficos que apresentam mais claramente as interconexões entre as variáveis do estudo em questão e permitem identificar padrões de comportamento das variáveis e suas dinâmicas (ASKAR et al., 2021; LANDI et al., 2018).

Verificamos a literatura e nenhum esforço tem sido realizado para determinar a origem botânica do pólen de abelha produzido por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão (*Melipona Marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*) coletado em diferentes estações do ano, em uma região bem definida (cidade de Maringá) no estado do Paraná, Brasil para investigar a influência das espécies de abelhas e de estações do ano na sua origem botânica, usando diferentes ferramentas estatísticas e de modelagem matemática. Assim, este trabalho aplicou a Análise de Rede e os Modelos Lineares Generalizados a dados de análise polínica como ferramentas estatísticas e de modelagem matemática para identificar a contribuição e influência das espécies vegetais e da sazonalidade na composição botânica do pólen de abelha.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Análise polínica

Melo Nascimento (2020) realizou, a identificação da origem botânica das amostras de pólen de abelha investigadas e descritas no Capítulo 2 pela análise polínica. A metodologia adotada por este autor é descrita a seguir.

Uma massa de cerca de 2,0 g de cada amostra de pólen de abelha foi mantida em álcool 70 % (v/v) por 24 horas. Após esse período, a suspensão foi centrifugada e o álcool descartado. Foi

adicionado ao material polínico um volume de 4,0 mL de ácido acético glacial e a suspensão foi mantida em repouso por 24 horas. O material polínico foi subsequentemente acetolizado seguindo o método proposto por Erdtman (1960). Após a acetólise, o material polínico foi mantido em 50 % de glicerina. As lâminas foram preparadas para cada amostra usando gelatina Kissler e seladas com verniz transparente. Nas análises qualitativas, os tipos polínicos encontrados nas lâminas foram identificados por comparação com os tipos polínicos das lâminas de referência da área de estudo, depositadas no Laboratório de Abelhas da Universidade Estadual de Maringá-PR, Brasil e por comparação com a literatura especializada para identificação de pólenes coletados por abelhas (MIRANDA e ANDRADE, 1990; SILVA et al., 2014). Nas análises quantitativas, foram contados os primeiros 400 grãos de pólen encontrados em cada amostra de pólen de abelha (MONTERO; TORMO, 1990). Em seguida, a porcentagem e as classes de ocorrência foram determinadas de acordo com a classificação proposta por BARTH, (1970), LOUVEAUX; MAURIZIO; VORWOHL, (1970, 1978): pólen dominante (PD) (> 45 % do total de grãos de pólen presentes na lâmina), pólen acessório (PA) (de 15 a 45 %), pólen isolado importante (PII) (3 a 15 %) e pólen isolado ocasional (PIO) (< 3 %).

3.2.2. Análise estatística

Para investigar se as espécies de abelhas ou as estações do ano poderiam ter influência significativa na composição botânica de amostras de pólen de *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão, dados de análise polínica fornecidos por Melo Nascimento, (2020), incluindo espécies de plantas identificadas, bem como suas frequências de contagem e número de grãos de pólen foram analisados por meio dos Modelos Lineares Generalizados (MLG), ao nível de 95 % de confiança no software R. Para esta análise estatística, as espécies de plantas repetidas em meses diferentes foram contadas novamente a cada vez que estas eram observadas nas amostras de pólen avaliadas. A distribuição de probabilidade de Poisson com função de ligação log foi usada para analisar o '*número de grãos de pólen*', enquanto a distribuição de probabilidade Gama com função de ligação log foi usada para analisar a '*frequência de grãos de pólen*'.

Para determinar padrões relacionais representados graficamente da sazonalidade (aqui representada pelas quatro estações do ano) e das espécies de abelhas na composição botânica das amostras de pólen foi realizada a Análise de Rede no software Gephi 0.9.2. Para a Análise de Rede, a modularidade das classes para os gráficos de rede foram quatro: inverno, primavera, verão e outono, sendo que cada estação representou um nodo do gráfico de rede. A espessura da linha de ligação entre cada tipo de pólen vegetal e a estação do ano (nodo) para cada espécie de abelha está relacionada às frequências dos tipos de pólen investigados nas amostras de pólen de abelha.

Ou seja, define a relação entre a intensidade de visitação de cada espécie de abelha a determinadas espécies de planta, em uma determinada estação do ano, considerando todas as amostras de pólen de abelha coletadas no período investigado (de junho de 2018 a maio de 2019).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Análises polínica e de rede de amostras de pólen de *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão

Para melhor compreender a preferência floral das diferentes espécies de abelhas investigadas nesta tese (*Apis mellifera* e abelhas sem ferrão) nas quatro estações do ano, isto é, sua influência na origem botânica, inicialmente foram descritos os resultados da análise polínica realizada previamente por Melo Nascimento (2020), os quais são apresentados nas Tabelas An.1 a An.5 do Anexo. Em seguida foram apresentados os gráficos de rede e sua interpretação para cada espécie de abelha como uma forma de ilustrar graficamente estes resultados e demonstrar o potencial deste tipo de análise estatística para a representação gráfica dos padrões relacionais da sazonalidade e da espécie de abelha na origem botânica de amostras de pólen.

Para a realização da Análise de Rede foram utilizadas todas as frequências de contagem obtidas da análise polínica, com exceção das frequências de espécies vegetais < 3 %, referentes a classificação como pólen isolado ocasional (Tabelas An.1 a An.5 do Anexo). As frequências de pólen isolado ocasional, não foram inseridas na Análise de Rede e portanto não aparecem nos gráficos de rede por serem consideradas menos importantes na classificação da origem botânica das amostras de pólen de abelha, em comparação as demais classificações encontradas na análise polínica (PD, PA e PII).

Este tipo de modelagem matemática permite a representação gráfica dos padrões relacionais decorrentes da influência da espécie da abelha e da sazonalidade na diversidade de tipos polínicos que contribuem para a composição botânica do pólen de abelha. A espessura das linhas exibidas nos gráficos de rede (Figuras 3.1 a 3.5) indica a importância e as frequências de contagem de cada tipo polínico na composição botânica das amostras de pólen de abelha coletadas por *Apis mellifera* e pelas abelhas sem ferrão em todas as estações do ano e está diretamente relacionada as classificações como pólen dominante (PD), pólen acessório (PA) e pólen isolado importante (PII) encontradas pela análise polínica.

Apis mellifera é uma espécie de abelha exótica e amplamente distribuída em diferentes biomas. Está bem adaptada a diferentes condições climáticas e apresenta um comportamento generalista de coleta de pólen e de néctar. Isso significa que essa espécie de abelha busca explorar

sempre as fontes florais mais rentáveis da região produtora e por isso coleta pólen de diferentes origens botânicas de acordo com a qualidade e a quantidade de alimento ofertado (NEGRÃO; ORSI, 2018). Esse comportamento pode ser observado na mudança contínua dos tipos polínicos identificados em amostras de mel e de pólen dessa espécie de abelha e relatadas na literatura (KLEINERT; GIANNINI, 2012; NEGRÃO; ORSI, 2018; WILMS; WIECHERS, 1997).

Apesar de apresentar um comportamento generalista em relação à coleta de alimentos, a abelha *Apis mellifera* pode intensificar o forrageamento de pólen de certas plantas em determinados períodos devido às condições climáticas adequadas e a disponibilidade de recursos florais na área de estudo (ALEIXO et al., 2017). Pesquisadores relataram que essas abelhas concentraram seus esforços de coleta de pólen em plantas das famílias Myrtaceae e Melastomaceae (WILMS; WIECHERS, 1997), Myrtaceae e Asteraceae (NEGRÃO e ORSI, 2018) e Amaranthaceae, Araliaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Poaceae e Rutaceae (MATTOS, SOUZA e SOARES, 2018).

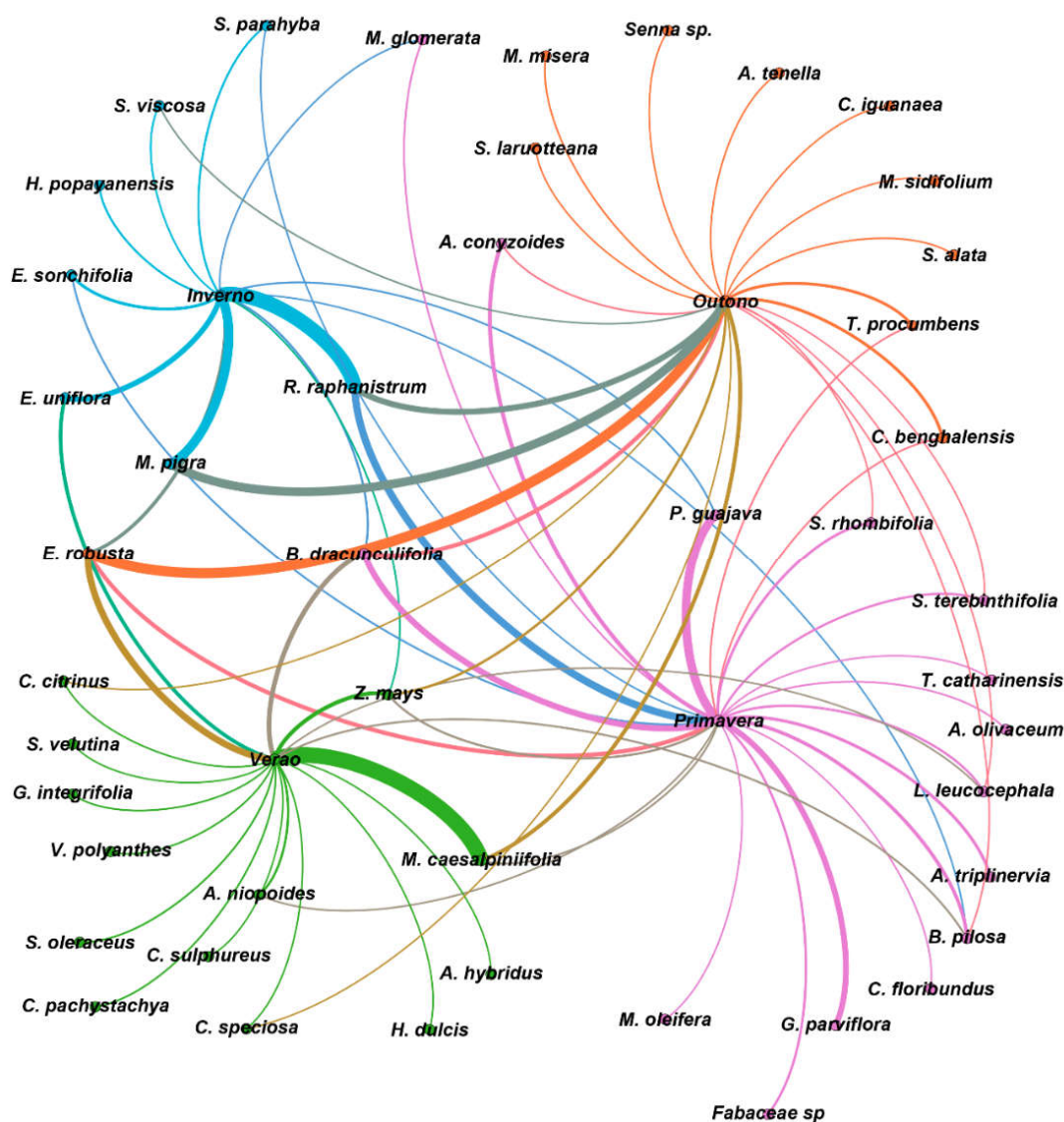
De acordo com a análise polínica realizada por Melo Nascimento (2020) das amostras de pólen de abelha investigadas nessa tese foi observado um comportamento da abelha *Apis mellifera* semelhante ao relatado na literatura em relação à coleta de tipos polínicos de Myrtaceae, que foram classificados como PD no inverno e PA em todas as estações (Tabela An.1, Anexo). Os tipos polínicos mais frequentemente encontrados em amostras de pólen de abelha *Apis mellifera* foram *Eucalyptus robusta*, *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava*. Também foi observada a predominância de tipos polínicos das famílias Brassicaceae no inverno e de Fabaceae no verão e no outono, sendo todos classificados como PD (Tabela An.1, Anexo). Acredita-se que a preferência da abelha *Apis mellifera* ao longo do ano por espécies vegetais das famílias citadas acima se deva ao fato de a região produtora estar localizada em uma fazenda experimental, onde essas plantas são normalmente cultivadas, sendo assim abundantes em recursos florais. A Asteraceae foi outra família importante identificada nas amostras de pólen dessa espécie de abelha, que esteve presente nas amostras em menor frequência em quase todas as estações do ano, exceto no inverno (Tabela An.1, Anexo).

As amostras de pólen de abelha *Apis mellifera* apresentaram diferentes frequências de contagem para os tipos polínicos identificados pela análise polínica em todas as estações como descrito acima. Essas diferenças podem ser melhor visualizadas por variações na espessura das linhas exibidas no gráfico de rede ilustrado na Figura 3.1.

As linhas de maior espessura (Figura 3.1) que indicam frequências de contagem > 45 %, foram observadas para os tipos polínicos de *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) (76,3 %) e de *Mimosa pigra* (Fabaceae) (76,9 %) no inverno, para *Mimosa casealpiniifolia* (Fabaceae) (59,2 %)

e *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (50,7 %) no verão e para *Mimosa pigra* (Fabaceae) (64,9 %) no outono. Esses resultados foram concordantes com a classificação como PD realizada pela análise palinológica (Tabela An.1, Anexo).

FIGURA 3.1 - GRÁFICO DE REDE DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Apis mellifera* COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES. A ESPESSURA DAS LINHAS ILUSTRA A CONTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE CONTAGEM DOS TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA



Fonte: a autora, (2023).

As linhas de espessura intermediária (Figura 3.1), que indicam frequências de contagem entre 15 e 45 %, foram observadas para os tipos polínicos *Psidium guajava* (Myrtaceae) (42,7 %), *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) (44,6 %), *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (35,5%), *Galinsoga parviflora* (Asteraceae) (33,8%), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) (22,1%) e *Bidens pilosa* (Asteraceae) (18,1%) na primavera; para *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) (37,1%) e

Eucalyptus robusta (Myrtaceae) (18,4%) no inverno; para *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (27,5 %), *Mimosa casealpiniifolia* (Fabaceae) (24,1 %) e *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) (20,6 %) no verão; para *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) (23,0 %), *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (24,5 %), *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (24,1 %), *Mimosa casealpiniifolia* (Fabaceae) (19,0 %) e *Commelina benghalensis* (Commelinaceae) (19,1 %) no outono. Esses resultados foram concordantes com a classificação como PA realizada pela análise polínica (Tabela An.1; Anexo). Por fim, as linhas de menor espessura, ilustradas na Figura 3.1, apresentaram, em todas as estações, uma correlação direta com os tipos polínicos classificados como pólen isolado importante (PII) pela análise polínica.

As abelhas sem ferrão (*Apidae, Meliponini*) são abelhas eussociais, que compreendem mais de 510 espécies que vivem em habitats predominantemente tropicais ao redor do globo. São importantes polinizadores que contribuem para a conservação ecológica das florestas e o desenvolvimento de plantas de interesse agrícola (HRNCIR et al., 2019; MOURA et al., 2022).

No Brasil, podem ser encontradas mais de 80 espécies de abelhas sem ferrão. Caracterizam-se pela necessidade de manter um fornecimento constante de alimento para os indivíduos adultos e para a sustentação do ninho, além de apresentarem características morfológicas e biológicas diferentes em relação às abelhas melíferas como a *Apis mellifera* (OLIVEIRA-ABREU et al., 2014).

Diferentemente do comportamento exibido pela *Apis mellifera*, as abelhas sem ferrão não migram para outros locais em busca de fontes mais rentáveis quando os recursos florais são escassos (HRNCIR et al., 2019). Assim, quando as condições climáticas e a oferta de alimentos são favoráveis, essas espécies de abelhas intensificam a coleta de néctar e de pólen, além de estocar alimentos em suas colméias para sobreviver aos períodos de escassez de recursos florais. Como resultado desse comportamento, vários pesquisadores observaram que as abelhas sem ferrão, apesar de serem insetos poliléticos, apresentam certas preferências florais durante a coleta de néctar e de pólen, principalmente por se aglomerar em árvores com florescimento em massa ou em plantas que apresentem flores com anteras poricidas (BARTH; DE FREITAS; VANDERBORGHT, 2020; HRNCIR et al., 2019; MAIA-SILVA et al., 2014; RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1990). Outra estratégia adotada pelas abelhas sem ferrão para maximizar a coleta de alimentos é realizar a chamada “polinização por vibração” e, portanto, podem aproveitar para explorar fontes de pólen lucrativas que não estão disponíveis para outras abelhas, como as abelhas melíferas (OLIVEIRA-ABREU et al., 2014).

Considerando os relatos encontrados na literatura, as principais fontes de pólen para as espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* foram os tipos polínicos das famílias

Myrtaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Solanaceae, Leguminosae, Palmae, Rubiaceae e Melastomataceae (BARTH; DE FREITAS; VANDERBORGHT, 2020; HRNCIR et al., 2019; RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; WILMS; WIECHERS, 1997).

Para a abelha *Melipona marginata*, poucos estudos relatam suas preferências florais na coleta de néctar e de pólen (KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1987). Esta espécie de abelha sem ferrão apresentou preferência por tipos polínicos das famílias Myrtaceae, Euphorbiaceae e Solanaceae, mas também foram encontrados outros tipos polínicos apresentados em menor frequência das famílias Leguminosae, Melastomaceae, Moraceae e Liliaceae.

A análise polínica, realizada por Melo Nascimento (2020) (Tabela An.2, Anexo) das amostras investigadas nessa tese demonstrou um comportamento semelhante ao relatado na literatura para a abelha *Melipona marginata*, na escolha de plantas para coleta de pólen. Nas amostras de pólen desta espécie de abelha sem ferrão foi identificada a predominância de tipos polínicos de diferentes famílias de acordo com sua abundância em cada estação do ano: Euphorbiaceae no inverno, Fabaceae no inverno e no verão, Myrtaceae na primavera, no verão e no outono, todos classificados como PD. Outros tipos polínicos das famílias Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Meliaceae, Myrtaceae e Sapindaceae também foram encontrados em frequências intermediárias de contagem, sendo classificados como PA.

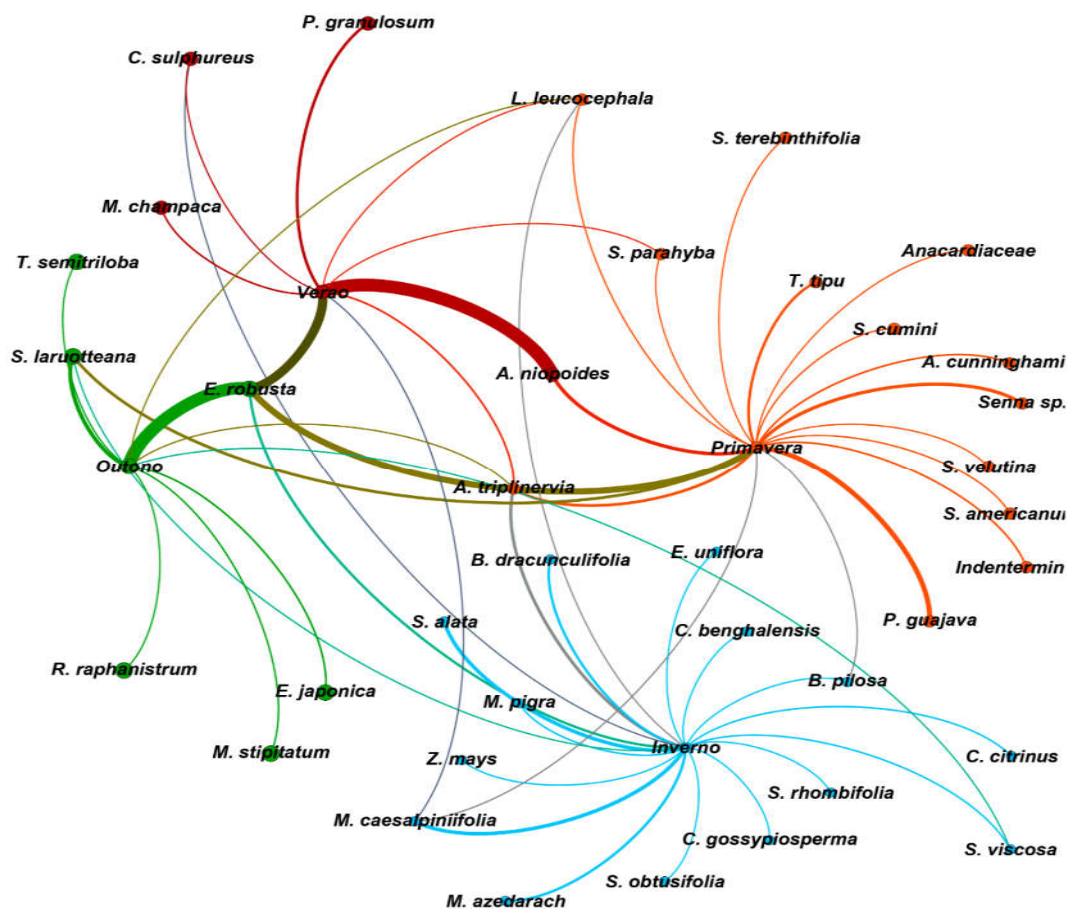
Em relação às espécies vegetais, a abelha *Melipona marginata* apresentou preferência pelo *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), que esteve presente nas amostras de pólen de abelha em frequências > 50 % na maioria das estações do ano. Comportamento semelhante foi observado por Kleinert-Giovannini, Imperatriz-Fonseca, (1987). Embora as abelhas sem ferrão apresentem comportamento generalista de coleta de pólen e de néctar, elas podem ser temporariamente seletivas e explorar as fontes florais mais lucrativas e disponíveis na região ao redor de suas colméias (ALEIXO et al., 2017; WILSON et al., 2021).

No gráfico de rede das amostras de pólen de *Melipona marginata* (Figura 3.2), a maior frequência de contagem (linhas de maior espessura) de tipos polínicos foi observada no inverno, no verão e no outono, enquanto contribuições menores e mais diversificadas de tipos polínicos (linhas mais finas) foram registradas na primavera.

As linhas de maior espessura no gráfico de rede (Figura 3.2), que indicam frequências de contagem > 45 %, foram observadas para os tipos polínicos de *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) (97,5 %) e *Senna alata* (Fabaceae) (63,9 %) no inverno; para *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (57,0%) na primavera; para *Albizia niopoides* (Fabaceae) (85,3 %) e para *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (86,9 %) no verão e para *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (74,9 %) no outono.

Esses resultados foram concordantes com a classificação como PD realizada pela análise polínica (Tabela An.2, Anexo).

FIGURA 3.2 - GRÁFICO DE REDE DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Melipona marginata* COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES. A ESPESSURA DAS LINHAS ILUSTRA A CONTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE CONTAGEM DOS TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA



Fonte: a autora, (2023).

As linhas de espessura intermediária no gráfico de rede (Figura 3.2), que indicam frequência de contagem entre 15 e 45 %, foram observadas para os tipos polínicos de *Psidium guajava* (Myrtaceae) (20,5 %), *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) (16,1%), *Albizia niopoides* (Fabaceae) (29,0 %), *Senna sp* (Fabaceae) (41,3%) e *Serjania laruotheana* (Sapindaceae) (25,0 %) na primavera; de *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (20,9%), *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (20,0%), *Mimosa casealpinifolia* (Fabaceae) (43,6%) e *Melia azedarach* (Meliaceae) (23,1%) no inverno e de *Serjania laruotheana* (Sapindaceae) (30,5%) no outono. Esses resultados também concordaram com a classificação como PA realizada pela análise polínica (Tabela An.2; Anexo). Finalmente, as linhas mais finas ilustradas no gráfico de rede da Figura 3.2

mostraram, em todas as estações, uma relação direta com os tipos polínicos classificados como pólen isolado importante (PII) pela análise polínica.

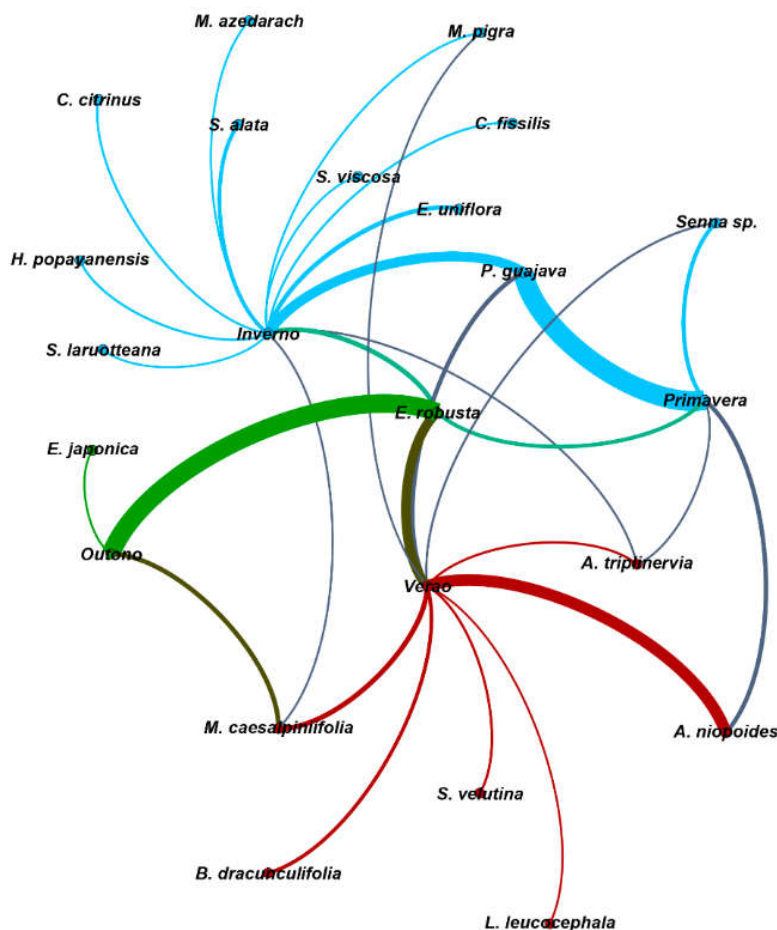
Em relação às espécies de abelhas do gênero *Melipona*, estudadas nessa tese, observou-se um maior interesse da literatura em elucidar o comportamento de forrageamento da abelha *Melipona quadrifasciata*, em relação ao demonstrado para a abelha *Melipona marginata*. De acordo com vários pesquisadores, algumas espécies de plantas das famílias Asteraceae, Fabaceae, Melastomataceae, Myrtaceae e Solanaceae são preferidas pela abelha *Melipona quadrifasciata* (BARTH; DE FREITAS; VANDERBORGHT, 2020; HRNCIR et al., 2019; IMPERATRIZ-FONSECA; KLEINERT-GIOVANNINI; RAMALHO, 1989; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1987; MAIA-SILVA et al., 2014; OLIVEIRA-ABREU et al., 2014). Considerando essas famílias vegetais, as espécies de plantas com florescimento em massa foram as mais atrativas para essa espécie de abelha sem ferrão. Portanto, são importantes fontes de néctar e de pólen e responsáveis por até 90 % da ingestão alimentar anual das colônias (IMPERATRIZ-FONSECA; KLEINERT-GIOVANNINI; RAMALHO, 1989; RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1990).

À semelhança do que é relatado na literatura, Melo Nascimento, (2020) identificou a predominância de tipos polínicos de Myrtaceae em todas as estações do ano para as amostras dessa espécie de abelha investigadas nesta tese (Tabela An.3; Anexo). *Melipona quadrifasciata* mostrou preferência pela coleta de pólen de *Eucalyptus robusta* durante o verão e o outono, de *Eugenia uniflora* no inverno e de *Psidium guajava* no inverno e na primavera. Tipos polínicos de Fabaceae também foram encontrados em altas frequências de contagem no inverno e no verão.

Para as amostras de pólen da abelha *Melipona quadrifasciata* o gráfico de rede apresentado na Figura 3.3, ilustrou as maiores frequências de contagem (linhas mais espessas) de tipos polínicos em todas as estações em comparação ao observado para as demais espécies de abelha investigadas. Fica evidente pelo padrão mostrado na Figura 3.3 que a *Melipona quadrifasciata* tem preferência na coleta de alguns tipos polínicos específicos, das famílias Fabaceae e Myrtaceae, o que se repete em todas as estações.

As linhas de maior espessura (Figura 3.3), que indicam frequências de contagem > 45 %, foram observadas para os tipos polínicos de *Senna alata* (Fabaceae) (52,1 %) e *Albizia niopoides* (Fabaceae) (69,4 %) no inverno e no verão, respectivamente; de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) (54,9 %) e *Psidium guajava* (Myrtaceae) (89,4 %) no inverno; de *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (86,9 % e 88,4 %) no verão e no outono, respectivamente. Esses resultados foram concordantes com a classificação como PD realizada pela análise polínica (Tabela An.3; Anexo).

FIGURA 3.3 - GRÁFICO DE REDE DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Melipona quadrifasciata* COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES. A ESPESSURA DAS LINHAS ILUSTRA A CONTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE CONTAGEM DOS TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA



Fonte: a autora, (2023).

As linhas de espessura intermediária (Figura 3.3), que indicam frequências de contagem entre 15 e 45 %, foram observadas para os tipos polínicos de *Psidium guajava* (Myrtaceae) (44,5 %) e *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (17,9 %) e de *Albizia niopoides* (Fabaceae) (23,9%) na primavera; de *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (38,9%) no inverno; de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (19,2 %), de *Albizia niopoides* (Fabaceae) (41,9 %) e de *Psidium guajava* (Myrtaceae) (25,7 %) no verão e de *Mimosa caesalpinifolia* (Fabaceae) (17,1 %) no outono. Esses resultados também concordaram com a classificação como PA realizada pela análise polínica (Tabela An.3; Anexo). Por fim, as linhas mais finas, ilustradas na Figura 3.3, mostraram, em todas as estações, uma menor contribuição de tipos polínicos das famílias Euphorbiaceae, Myrtaceae e Fabaceae, que foram classificadas como pólen isolado importante pela análise polínica. Em comparação com as outras espécies de abelhas investigadas neste trabalho, as amostras de pólen

da abelha *Melipona quadrifasciata* têm uma contribuição menor para os tipos polínicos classificados como pólen isolado importante.

A comparação do comportamento de forrageamento de tipos polínicos das abelhas sem ferrão *Melipona marginata* e *Melipona quadrifasciata* mostrou semelhanças na maioria das estações (Figuras 3.2 e 3.3). *Senna alata* (Fabaceae) foi encontrada em altas frequências de contagem no inverno para ambas as espécies de abelhas sem ferrão. O mesmo padrão foi observado para *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) na primavera e no verão e para *Albizia niopoides* (Fabaceae) no verão. Esses resultados indicaram que esses recursos florais podem sustentar ambas as espécies de abelhas sem ferrão.

Poucas informações sobre as espécies vegetais (plantas) utilizadas pelas abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes* para produção de pólen podem ser encontradas na literatura. Segundo Diniz e Buschini, (2015) e Ramalho, (2004) *Scaptotrigona bipunctata* apresentou preferência por coletar pólen de árvores que apresentam florescimento em massa, comportamento que pode estar associado à necessidade de grandes quantidades de recursos alimentares como forma de garantir a sobrevivência de suas numerosas colônias. Relatos do comportamento de forrageamento de pólen pela abelha *Tetragona clavipes* são escassos. Essa abelha sem ferrão apresenta um comportamento de forrageamento de recursos alimentares mais generalista, geralmente visitando flores de espécies vegetais de interesse econômico, da família Myrtaceae e espécies nativas da região produtora (DUARTE; SOUZA; SOARES, 2016).

A análise polínica das amostras de pólen coletadas pela abelha *Scaptotrigona bipunctata* de acordo com Melo Nascimento, (2020) indicou que os tipos polínicos das famílias Myrtaceae, Fabaceae e Euphorbiaceae foram as fontes florais primárias e mais atrativas para esta espécie de abelha sem ferrão. Os tipos polínicos de *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) foram predominantes no inverno, no verão e no outono; *Psidium guajava* (Myrtaceae) na primavera; *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) no inverno e *Albizia niopoides* (Fabaceae) no verão. Amostras de pólen coletadas por essa espécie de abelha sem ferrão também apresentaram importantes contribuições de tipos polínicos das famílias Sapindaceae, Moringaceae e Rhamnaceae.

As amostras de pólen da abelha *Scaptotrigona bipunctata* apresentaram maior variação de tipos polínicos no inverno e na primavera em relação aos observados nas estações do verão e do outono. Essas diferenças podem ser melhor visualizadas pelas variações na espessura das linhas do gráfico de rede ilustradas na Figura 3.4.

As linhas mais espessas (Figura 3.4), que indicam frequências de contagem > 45 %, foram observadas para os tipos polínicos de *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) (75,0 %) e de *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (70,6 %) no inverno, para *Albizia niopoides* (Fabaceae) (83,3 %)

(21,3%) na primavera; de *Tipuana tipu* (Fabaceae) (32,5 %) e *Moringa oleifera* (Moringaceae) (17,1 %) no verão. Esses resultados também concordaram com a classificação como PA realizada pela análise polínica (Tabela An.4; Anexo). Por fim, as linhas mais finas, ilustradas na Figura 3.4, mostraram, em todas as estações, os mesmos tipos polínicos classificados como pólen isolado importante pela análise polínica.

Scaptotrigona bipunctata apresentou um comportamento de forrageamento de pólen muito semelhante ao observado para as abelhas sem ferrão *Melipona marginata* e *Melipona quadrifasciata*, principalmente na primavera, no verão e no outono. Fica evidente, na análise polínica realizada por Melo Nascimento, (2020), que a *Scaptotrigona bipunctata* preferiu coletar pólen das mesmas fontes florais das abelhas *Melipona marginata* e *Melipona quadrifasciata*. Esses resultados sugerem que as espécies de plantas das famílias Myrtaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae possuem quantidade e qualidade de pólen suficientes para sustentar várias espécies de abelhas sem ferrão, sem competição significativa entre elas. Comportamento semelhante foi observado por Hilgert-Moreira et al., (2014) na coleta de pólen de espécies de *Eucalyptus* por abelhas sem ferrão. Essa sobreposição de recursos florais durante o forrageamento de pólen por abelhas sem ferrão é uma estratégia comum adotada por abelhas do gênero *Melipona* (RAMALHO,1990).

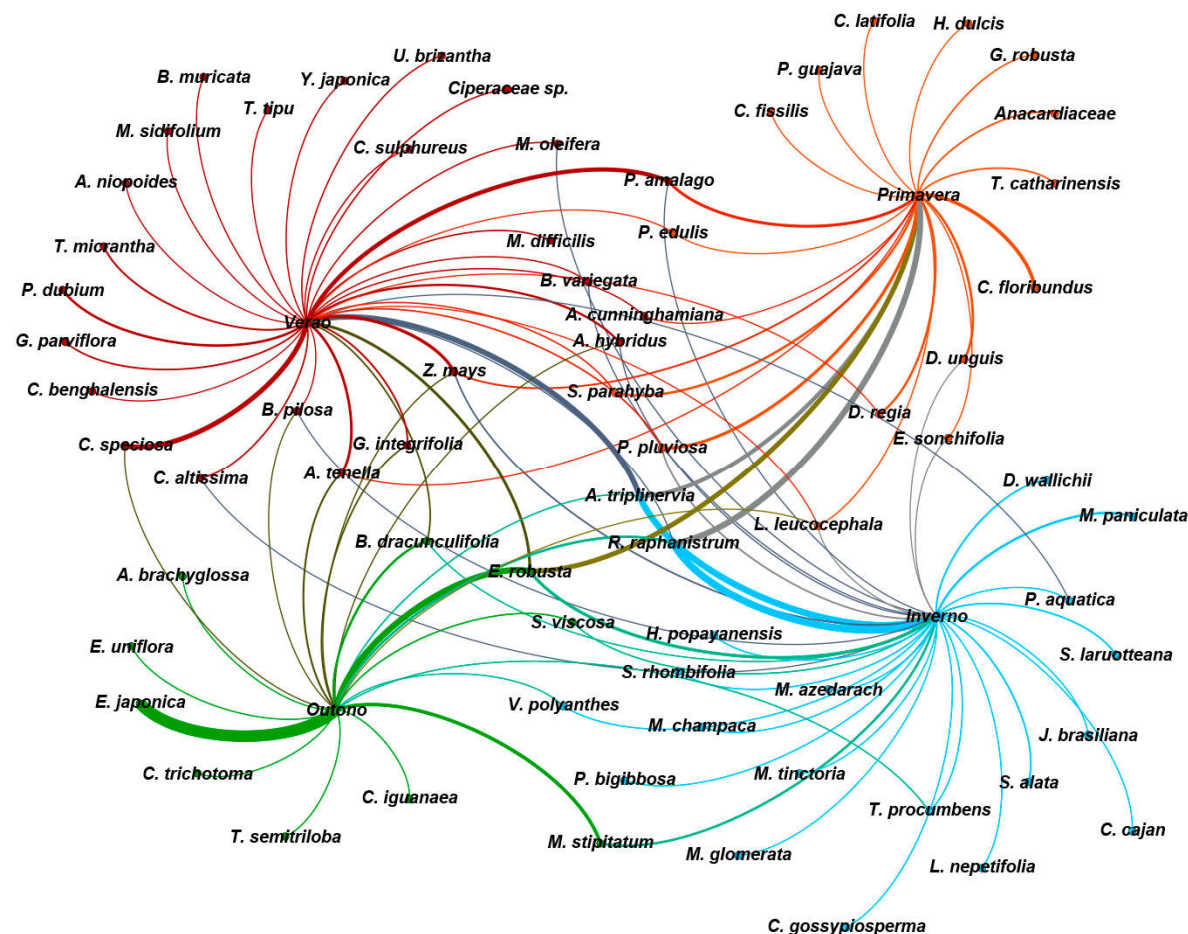
Para a abelha *Tetragona clavipes*, como já mencionado anteriormente, muito pouco se sabe sobre seu comportamento de forrageamento de pólen, em comparação com o relatado para outras espécies de abelhas sem ferrão. Duarte, (2012) identificou 17 famílias botânicas e 38 tipos polínicos em amostras de pólen de abelha dessa espécie de abelha sem ferrão na região sudeste do Brasil. Dentre as famílias relatadas, Fabaceae foi a que apresentou maior número de tipos polínicos seguida por Asteraceae, Euphorbiaceae, Malvaceae, Piperaceae e Poaceae.

Os resultados descritos por Melo Nascimento, (2020) para a abelha *Tetragona clavipes* sugerem um comportamento de forrageamento de pólen semelhante, mostrando a mesma preferência por algumas das famílias descritas por Duarte, (2012). Foi observada a predominância de *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) e *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) no inverno e de *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) no outono com frequências de contagem > 45 %. Os tipos polínicos de Myrtaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Brassicaceae e Rosaceae foram encontrados na maioria das estações em frequências de contagem entre 15 a 45 %. Em comparação com a análise polínica de amostras de pólen de *Apis mellifera* e das outras espécies de abelhas sem ferrão descritas anteriormente, as amostras de *Tetragona clavipes* apresentaram uma maior contribuição de diferentes famílias e tipos polínicos em menores frequências em todas as estações, indicando a adoção de um padrão de forrageamento de pólen mais generalista por esta espécie de abelha.

As amostras de pólen de *Tetragona clavipes* apresentaram a maior variação de tipos polínicos em todas as estações do ano, sendo caracterizada por uma maior contribuição de tipos polínicos em frequências < 45 %. Essas diferenças podem ser melhor visualizadas por variações na espessura das linhas do gráfico de rede ilustradas na Figura 3.5.

As linhas mais espessas (Figura 3.5), que indicam frequências de contagem > 45 %, foram observadas para os tipos polínicos de *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) (58,0 %) e *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) (57,0 %) no inverno e de *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) (60,0%) no outono. Esses resultados foram concordantes com a classificação como PD realizada pela análise polínica (Tabela An.5; Anexo).

FIGURA 3.5 - GRÁFICO DE REDE DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *TETRAGONA CLAVIPES* COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES. A ESPESSURA DAS LINHAS ILUSTRA A CONTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE CONTAGEM DOS TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA



Fonte: a autora, (2023).

As linhas de espessura intermediária (Figura 3.5), que indicam frequências de contagem entre 15 e 45 % foram observadas para os tipos polínicos *Raphanus raphanistrum* (Euphorbiaceae) (17,0 %), *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (22,0%), *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) (45,0

%), *Macherium stipitatum* (Fabaceae) (18,0 %) e *Murraya paniculata* (Rutaceae) (17,0 %) no inverno; *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) (33,0 %), *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) (25,5 %), *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) (33,0 %) e *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) (30,0 %) na primavera; *Alternanthera tenella* (Amaranthaceae) (18,0 %), *Ceiba speciosa* (Bombacaceae) (23,0 %), *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) (38,0 %) e *Piper amalago* (Piperaceae) (26,0%) no verão. Esses resultados também concordaram com a classificação como PA realizada pela análise polínica (Tabela An.5; Anexo). Por fim, observou-se a prevalência das linhas mais finas, conforme ilustrado na Figura 5, em todas as estações, indicando a presença dos mesmos tipos polínicos classificados como pólen isolado importante pela análise polínica. *Tetragona clavipes* também foi a espécie de abelha que apresentou a maior contribuição de tipos polínicos em menor frequência (< 15 %) em comparação com as amostras de pólen observadas para outras espécies de abelhas (Figuras 3.2 e 3.3).

Algumas semelhanças podem ser observadas no comportamento de forrageamento das abelhas *Tetragona clavipes* e *Apis mellifera*, que compartilharam as mesmas preferências florais por tipos polínicos de *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) no inverno e na primavera e de *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae) no inverno e no outono. O compartilhamento de recursos florais entre essas espécies de abelhas também foi observado por Pedro e Camargo, (1991) na região sudeste do Brasil.

3.3.2. Influência da espécie de abelha e da estação do ano na origem botânica de pólen de abelha

É reconhecido na literatura que a composição botânica do pólen de abelha é influenciada por vários fatores, incluindo condições climáticas, espécies de plantas, estações do ano e espécies de abelhas (ALEIXO et al., 2017; HILÁRIO; IMPERATRIZ-FONSECA, 2009; HRNCIR et al., 2019; MATTOS; SOUZA; SOARES, 2018; NEGRÃO; ORSI, 2018). Tal comportamento também foi observado nas amostras de pólen investigadas nesta tese (Tabelas An.1 a An.5 do Anexo; Figuras 3.1 a 3.5). Sendo assim, a influência de dois fatores (estação do ano e espécie de abelha) na origem botânica do pólen foi investigada pela Análise de Modelos Lineares Generalizados (MLG) no nível de de 95 % confiança. Foi demonstrado que ambos os fatores são importantes ($p < 0,05$), além de terem efeito de interação significativo sobre eles ($p < 0,05$), sugerindo que não podem ser analisados separadamente em estudos univariados (Tabela 3.1). A porcentagem de distribuição de cada tipo polínico encontrada para as diferentes espécies de abelhas e estações do ano foi calculada para entender melhor como cada um destes fatores afeta a composição botânica das amostras de pólen de abelha investigadas (Tabela 3.2.).

Dos fatores estudados, o fator ‘espécie de abelha’ apresentou a maior influência sobre o número de tipos polínicos identificados nas amostras de pólen de abelha. As amostras de pólen de *Tetragona clavipes* apresentaram a maior diversidade no número de tipos polínicos (36,2 %), seguida por *Apis mellifera* (22,6 %), *Melipona Marginata* (16,9 %), *Scaptotrigona bipunctata* (14,8 %) e *Melipona quadrifasciata* (9,6 %). Esses resultados concordam com os exibidos nos gráficos de rede e pela análise polínica (Figuras 3.1 a 3.5; Tabelas An.1 a An.5 do Anexo), que mostraram que *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata* e *Scaptotrigona bipunctata* têm padrões de forrageamento menos generalistas em relação aos tipos polínicos do que os observados para as espécies de abelhas *Apis mellifera* e *Tetragona clavipes*.

TABELA 3.1 - TESTES DE EFEITOS DO MODELO. TESTE DE QUI-QUADRADO DE WALD E SIGNIFICÂNCIA PARA OS FATORES ESTAÇÃO DO ANO, ESPÉCIE DE ABELHA E SUA INTERAÇÃO

Fontes de Variação	Tipo III		
	Qui-quadrado de Wald	gl	p-valor
(Intercepto)	2.626.900	1	0,000
Estação do ano	2.393	3	0,000
Espécie de Abelha	23.658	4	0,000
Estação do Ano * Espécie de Abelha	9.296	12	0,000

Modelo: (Intercepto), estação do ano, espécies de abelhas, estação do ano * espécie de abelha

Fonte: a autora, (2023).

A influência do fator 'espécie de abelha' pode ser melhor explicada quando as diferenças nos padrões de forrageamento de pólen de *Apis mellifera* e de espécies de abelhas sem ferrão são comparadas. Conforme descrito anteriormente, *Apis mellifera* e *Tetragona clavipes* apresentaram um comportamento de coleta de pólen mais generalista, buscando as fontes florais mais rentáveis na região de produção ao longo do ano, coletando então um maior número de tipos polínicos, enquanto que as abelhas sem ferrão *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata* e *Scaptotrigona bipunctata* apresentaram um padrão de forrageamento de pólen mais especializado, concentrando seus esforços em seus recursos florais preferidos, sendo estes os tipos polínicos das famílias Myrtaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae.

Como as abelhas sem ferrão não podem deslocar suas colméias de um local para outro, elas coletam maiores quantidades de pólen e néctar e estocam alimentos sempre que há grande disponibilidade de fontes atrativas de plantas no ambiente, com o objetivo de manter suas colônias em épocas de escassez floral. Consequentemente, concentram seu processo de coleta de alimentos em espécies de plantas capazes de fornecer maiores fontes de pólen e de néctar, como árvores com florescimento em massa ou plantas com flores com anteras poricidas (HRNCIR et al., 2019; OLIVEIRA-ABREU et al., 2014; WILSON et al., 2021).

O fator ‘estação do ano’ (Tabela 3.2) mostrou uma distribuição equilibrada dos tipos polínicos durante todas as estações. Uma porcentagem um pouco maior foi observada na primavera (28,7%) e indicou que esta estação apresentou a maior diversidade de tipos polínicos observada em amostras de pólen coletadas ao longo de 12 meses para as cinco espécies de abelhas. O outono, por sua vez, registrou a menor diversidade de tipos polínicos (20,7%) em relação às demais estações. Esse comportamento pode estar associado ao clima predominante na região de produção, que interfere na disponibilidade de recursos florais em cada estação e conseqüentemente nos padrões de forrageamento de pólen de cada espécie de abelha.

TABELA 3.2 - VARIABILIDADE (%) DE TIPOS POLÍNICOS EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Apis mellifera* E ABELHAS SEM FERRÃO COLETADAS EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO

		N	Porcentagem (%)
Fatores	Estação do Ano	Inverno	25,6
		Outono	20,7
		Primavera	28,7
		Verão	25,0
		Total	492
Fatores	Espécie de Abelha	<i>Apis mellifera</i>	22,6
		<i>Melipona marginata</i>	16,9
		<i>Melipona quadrifasciata</i>	9,6
		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	14,8
		<i>Tetragona clavipes</i>	36,2
		Total	492

N = número de grãos de pólen que corresponde a soma da contagem mensal de tipos polínicos encontrados pela análise polínica. Fonte: a autora, (2023).

O fator ‘estação do ano’ pode explicar as mudanças observadas no padrão de coleta de pólen das fontes florais preferidas de *Apis mellifera* e das abelhas sem ferrão em cada estação. A abelha *Apis mellifera* concentra seus esforços na coleta de pólen das espécies vegetais Fabaceae e Brassicaceae no inverno, Fabaceae e Myrtaceae no verão e Myrtaceae no outono, enquanto na primavera apresentou a maior diversificação de tipos polínicos de diferentes famílias. De forma semelhante, as abelhas sem ferrão estudadas neste trabalho também mudaram seu padrão de coleta de pólen, buscando fontes florais mais rentáveis em cada estação do ano.

Esse comportamento apresentado por diferentes espécies de abelhas pode estar associado às variações das condições climáticas, que incluem mudanças de temperatura, umidade e índices pluviométricos nas regiões produtoras em cada estação do ano. Altos níveis de chuva e temperaturas extremas afetam a atividade de voo das abelhas durante a coleta de pólen, enquanto altas temperaturas exigem que diferentes espécies de abelhas adotem mecanismos específicos de dissipação de calor durante o voo. Então, variações nas taxas de precipitação e de temperaturas

durante o dia podem afetar o padrão de coleta de pólen exibido por diferentes espécies de abelhas (ALEIXO et al., 2017).

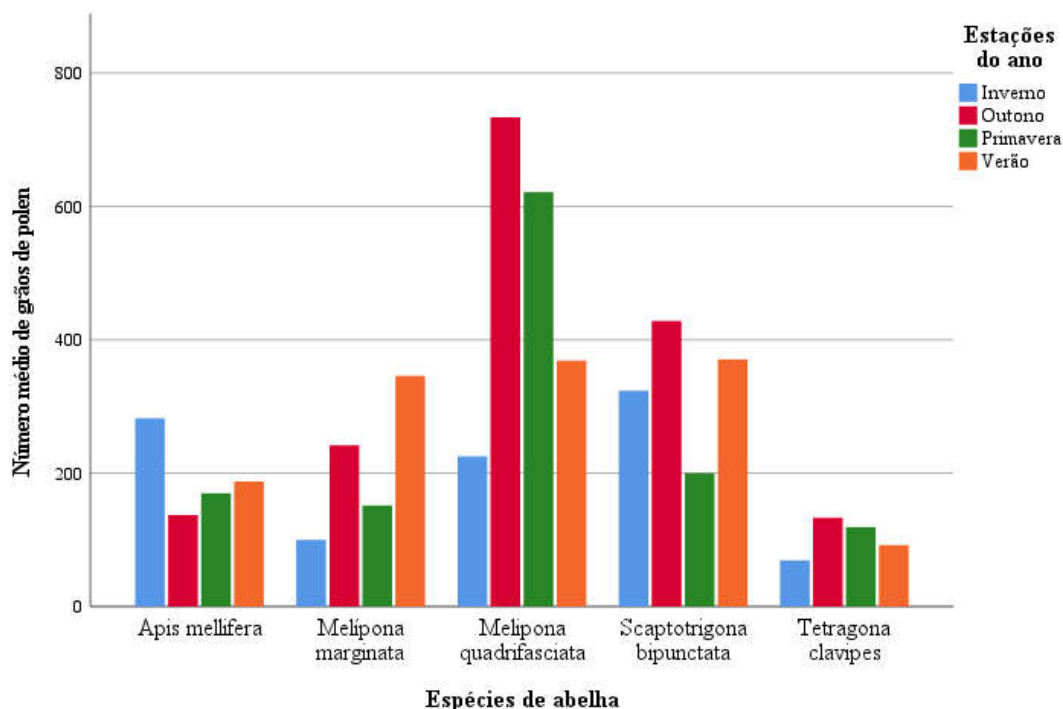
A região produtora das amostras de pólen de abelha, objeto de estudo desta tese, é caracterizada por um clima chuvoso, úmido e quente durante a maior parte do ano. Segundo informações descritas por Melo Nascimento, (2020), os maiores índices pluviométricos foram registrados na primavera (152, 279 e 144 mm) em comparação aos índices pluviométricos (143, 49 e 86 mm) medidos no outono. O verão também registrou altos índices pluviométricos (187, 118 e 143 mm), enquanto o inverno registrou os menores índices pluviométricos (62, 5 e 224 mm). Foram registradas faixas médias de umidade relativa de 50 a 69 % no inverno, de 62 a 72 % na primavera, de 61 a 68 % no verão e de 62 a 89 % no outono. As maiores variações de temperatura foram registradas no inverno (6,6 a 33,2 °C) e na primavera (15,2 a 35,7 °C), enquanto o verão (17,2 a 38,1 °C) e o outono (12 a 31,8 °C) registraram as menores variabilidade neste parâmetro.

As variações nas condições climáticas em cada estação do ano podem afetar a fenologia da floração de espécies de plantas cultivadas na região produtora (OLIVEIRA-ABREU et al., 2014). As taxas de precipitação afetam a abundância de plantas individuais, principalmente em ambientes tropicais onde as plantas com flores e, conseqüentemente, a disponibilidade de pólen para as abelhas, estão fortemente associadas a variações sazonais neste parâmetro (ALEIXO et al., 2017). Segundo Mattos, Souza e Soares (2018), regiões em que as chuvas não são escassas e apresentam estreita variabilidade de temperatura; sendo que as chuvas são bem distribuídas entre as estações e que não apresentam umidade relativa e radiação solar significativamente altas, são as mais indicadas para a produção de pólen de abelha.

Também foi observado um efeito de interação significativo entre os fatores 'estação do ano' e 'espécies de abelhas' (Tabela 3.1) ($p < 0,05$). Assim, este efeito de interação sugere que a diversidade de tipos polínicos, bem como o número de grãos de pólen vegetal nas amostras de pólen de abelha, dependem da espécie de abelha que faz a coleta, bem como da estação do ano em que o pólen foi coletado (Figura 3.6).

Avaliando o padrão mostrado na Figura 3.6, pode-se afirmar que as abelhas *Apis mellifera* concentraram seus esforços de forrageamento durante o inverno enquanto as espécies de abelhas sem ferrão no outono e no verão. Entre as espécies de abelhas sem ferrão também foram observadas diferenças no número médio de grãos de pólen vegetais coletados. *Melipona quadrifasciata* apresentou o maior número médio de grãos de pólen em contraste com o determinado para a abelha *Tetragona clavipes*. Portanto, os fatores 'espécie de abelha' e 'estação do ano' não podem ser avaliados separadamente em estratégias univariadas.

FIGURA 3.6 - CONTRIBUIÇÃO (%) DE TIPOS POLÍNICOS NAS AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Apis mellifera* E ABELHAS SEM FERRÃO EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO. ILUSTRAÇÃO DO EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE ‘ESPÉCIES DE ABELHAS’ E ‘ESTAÇÕES DO ANO’



Fonte: a autora, (2023).

O efeito de interação entre “espécie de abelha” e “estação do ano” pode ser explicado considerando as características biológicas de cada espécie de abelha e sua capacidade específica de adaptação às variações climáticas e de recursos florais em cada estação na região produtora. Verificou-se que a *Apis mellifera* concentrou sua coleta de grãos de pólen no inverno (estação mais seca e com as menores temperaturas mínimas); esse comportamento também foi observado por Negrão e Orsi (2018) e Negrão, Barreto e Orsi (2014). Por outro lado, as abelhas *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes* coletaram maior quantidade de grãos de pólen no outono e no verão (estações com maiores temperaturas e índices pluviométricos).

É reconhecido na literatura que a *Apis mellifera* é a espécie de abelha mais adaptada a condições climáticas extremas, enquanto as espécies de abelhas sem ferrão iniciam o processo de coleta de pólen em diferentes temperaturas mínimas, com base em seu tamanho corporal, cor e mecanismos individuais de termo regulação (MAIA-SILVA et al., 2014; OLIVEIRA-ABREU et al., 2014). Além disso, algumas espécies de abelhas, como as abelhas sem ferrão, tendem a diminuir a produção larval - ou seja, a realizar a diapausa reprodutiva - nas estações mais frias do ano (inverno e primavera); assim, diminuindo a quantidade de grãos de pólen coletados nessas estações. Espécies em diapausa reprodutiva, como as abelhas sem ferrão, costumam coletar mais

grãos de pólen no verão e no outono, enquanto aquelas que não passam por esse processo tendem a coletar mais grãos de pólen no inverno e na primavera (HILÁRIO; IMPERATRIZ-FONSECA, 2009).

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apis mellifera e *Tetragona clavipes* foram as espécies de abelhas que apresentaram o comportamento de forrageamento de pólen mais generalizado em relação às plantas disponíveis ao redor do apiário. Além disso, as amostras de pólen de abelha dessas abelhas apresentaram maior diversidade de tipos polínicos, principalmente nas estações da primavera e do verão; assim, estas foram classificadas quanto a sua origem botânica, na maioria das estações como heteroflorais. As espécies de abelhas *Melipona Marginata* e *Melipona quadrifasciata* mostraram preferência por tipos polínicos das famílias Myrtaceae e Fabaceae. Esse comportamento possibilitou a classificação da origem botânica dessas amostras como monofloral na maioria das estações do ano. Na apicultura e na meliponicultura, a obtenção de pólen de abelha com determinadas características botânicas, composicionais e nutricionais é desejada, pois tem potencial para ser utilizada nos setores farmacêutico e alimentício. A prevalência de uma determinada espécie vegetal na origem botânica do pólen facilita a padronização de suas propriedades nutracêuticas e funcionais, minimizando sua variabilidade composicional.

Os fatores '*estação do ano*' e '*espécie de abelha*', em conjunto, têm efeitos significativos na composição botânica das amostras de pólen de abelha analisadas; portanto, não podem ser avaliados separadamente. É fundamental entender como os padrões relacionais decorrentes da sazonalidade impostas a diferentes espécies de abelhas - principalmente aquelas pouco estudadas, como a *Scaptotrigona bipunctata* e a *Tetragona clavipes* interferem nas características botânicas e composicionais de pólen de abelha. Estas informações podem auxiliar na escolha de melhores práticas de manejo para a obtenção de pólen de abelha, o que tem impacto direto no desenvolvimento da apicultura e meliponicultura regionais, além de facilitar a comercialização e utilização deste em aplicações industriais.

3.5. REFERÊNCIAS

AL-AJLAN, A.; EL ALLALI, A. Feature selection for gene prediction in metagenomic fragments. **BioData Mining**, v. 11, n. 1, p. 9, dez. 2018.

ALEIXO, K. P. et al. Seasonal availability of floral resources and ambient temperature shape

- stingless bee foraging behavior (*Scaptotrigona aff. depilis*). **Apidologie**, v. 48, n. 1, p. 117–127, 2017.
- ANCONI, A. C. S. A.; BRITO, N. C. S.; NUNES, C. A. Determination of peroxide value in edible oils based on Digital Image Colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 113, p. 104724, out. 2022.
- ANJOS, O. et al. Application of FTIR-ATR spectroscopy on the bee pollen characterization. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 3, p. 210–218, 2017.
- ARES, A. M. et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 110–124, 2018.
- ARES, A. M. . et al. Differentiation of bee pollen samples according to the apiary of origin and harvesting period.pdf. **Food Bioscience**, v. 50, p. 8, 2022.
- ARRUDA, V. A. S. et al. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 2, p. 100–105, 2013.
- ASKAR, M. et al. Comparison of soil quality indexes calculated by network and principal component analysis for carbonated soils under different uses. **Ecological Indicators**, v. 17, p. 2054–2061, 2021.
- BALLESTEROS-VIVAS, D. et al. Green food analysis: Current trends and perspectives. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 31, p. 100522, out. 2021.
- BÁRBARA, M. F. S. et al. Caracterizações microbiológica e físico-química de pólenes armazenados por abelhas sem ferrão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 0, p. 1–9, 2018.
- BARTH, O. M. et al. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: A proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 893–902, 2010.
- BARTH, O. M.; DE FREITAS, A. DA S.; VANDERBORGHT, B. Pollen preference of stingless bees (*Melipona rufiventris* and *M. quadrifasciata anthidioides*) inside an urban tropical forest at Rio de Janeiro city. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1005–1010, 2020.
- BILISIK, A. et al. Seasonal variation of collected pollen loads of honeybees (*Apis mellifera L. anatoliaca*). **Grana**, v. 47, n. 1, p. 70–77, 2008.
- BORCHARDT, K. E. et al. Plant–pollinator conservation from the perspective of systems-ecology. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47, p. 154–161, 2021.
- BORLINGHAUS, P.; JUNG, J.; ODEMER, R. Introducing Pollenzyzer: An app for automatic determination of colour diversity for corbicular pollen loads. **Smart Agricultural Technology**, v. 5, p. 100263, out. 2023.

- BREIMAN, L. Random forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, out. 2001.
- BRODSCHNEIDER, R. et al. A citizen science supported study on seasonal diversity and monoflorality of pollen collected by honey bees in Austria. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- CALDAS, F. R. L. et al. Composição química, atividade antiradicalar e antimicrobiana do pólen apícola de Fabaceae. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 49–56, 2019.
- CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660–1664, 2008.
- CARPES, S. T. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY**, v. 12, n. 03, p. 220–229, out. 2009.
- CASTIGLIONI, S. et al. Spectroscopic Properties of Bee Pollen Loads from Different Botanical Origin. **Molecules**, v. 24, n. 3874, p. 1–13, 2019.
- CASTIGLIONI, S. et al. Characterisation of Bee Pollen from the Marche Region (Italy) According to the Botanical and Geographical Origin with Analysis of Antioxidant Activity and Colour , Using a Chemometric Approach. **Molecules**, v. 27, p. 1–14, 2022.
- CHAMORRO, F. J. et al. Botanical origin and geographic differentiation of bee-pollen produced in high mountains from the Colombian eastern Andes. **Grana**, v. 56, n. 5, p. 386–397, 2017.
- CHICA, M.; CAMPOY, P. Discernment of bee pollen loads using computer vision and one-class classification techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 112, n. 1-2, p. 50–59, 2012.
- COSTA, M. C. A. et al. Analysis of bee pollen constituents from different Brazilian regions: Quantification by NIR spectroscopy and PLS regression. **Lwt**, v. 80, p. 76–83, 2017.
- DE-MELO, A. A. M. et al. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **Lwt**, v. 65, p. 808–815, 2016.
- DE-MELO, A. A. M. et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. **Food Bioscience**, v. 25, n. August, p. 91–110, 2018.
- DEVEZA, M. V. et al. Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1171–1176, 2015.
- DIMO, M.; THRASYVOULOU, A. Seasonal variation in vegetation and pollen collected by honeybees in Thessaloniki, Greece. **Grana**, v. 46, n. 4, p. 292–299, 2007.
- DINIZ, M. E. DOS R.; BUSCHINI, M. L. T. Pollen analysis and interaction networks of floral visitor bees of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), in Atlantic Forest areas in southern Brazil.

Arthropod-Plant Interactions, v. 9, n. 6, p. 623–632, 2015.

DINIZ, P. H. G. D. Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems. **Journal of Chemometrics**, v. 34, n. 12, dez. 2020.

DUARTE, A. W. F. et al. Honey and bee pollen produced by meliponini (Apidae) in alagoas, brazil: Multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 38, n. 3, p. 493–503, 2018.

DUARTE, R. S.; SOUZA, J.; SOARES, A. E. E. Nest architecture of *Tetragona clavipes* (Fabricius) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 813–818, 2016.

ENNAJI, O.; VERGÜTZ, L.; EL ALLALI, A. Machine learning in nutrient management: A review. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v. 9, p. 1–11, set. 2023.

ESTEVINHO, L. M. et al. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 429–435, 2012.

FAN, Y. et al. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, p. 108829, fev. 2021.

GIAMPIERI, F. et al. Bee Products : An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 6833–6848, 2022.

GOMES, A. DE A. et al. Pattern recognition techniques in food quality and authenticity: A guide on how to process multivariate data in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 164, p. 117105, jul. 2023.

GONÇALVES, I. C.; SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Exploiting microdistillation and smartphone-based digital-image colorimetry for determination of protein in foods. **Microchemical Journal**, v. 188, n. 108458, 2023.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 998–1003, maio 2007.

GUPTA, J. K.; SHARMA, R.; OJHA, K. N. Bee pollen as a hive product and potentials of its use in human diet. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, v. 1, n. 1, p. 39–48, 2011.

HEVEY, D. Network analysis: A brief overview and tutorial. **Health Psychology and Behavioral Medicine**, v. 6, n. 1, p. 301–328, 2018.

HILÁRIO, S. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Pollen foraging in colonies of *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponini): Effects of season, colony size and queen number. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 664–671, 2009.

- HRNCIR, M. et al. Stingless bees and their adaptations to extreme environments. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 205, n. 3, p. 415–426, 2019.
- HUANG, H. et al. Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 1765–1776, 2017.
- HUMEAU-HEURTIER, A. Color Texture Analysis: A Survey. **IEEE Access**, v. 10, p. 107993–108003, 2022.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; RAMALHO, M. Pollen Harvest By Eusocial Bees In A Non-Natural Community In Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 5, n. 2, p. 239–242, 1989.
- ISOPESCU, R. D. et al. Romanian bee pollen classification and property modelling. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 443–451, 2020.
- KEBONYE, N. M.; AGYEMAN, P. C.; BINEY, J. K. M. Optimized modelling of countrywide soil organic carbon levels via an interpretable decision tree. **Smart Agricultural Technology**, v. 3, p. 100106, fev. 2023.
- KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 170–180, 2018.
- KLEINERT, A. D. M. P.; GIANNINI, T. C. Generalist bee species on Brazilian bee-plant interaction networks. **Psyche (London)**, v. 2012, p. 7, 2012.
- KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Aspects of the Trophic Niche of *Melipona Marginata Marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, v. 18, n. 1, p. 69–100, 1987.
- KOCOT, J. et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 7074209, p. 29, 2018.
- LAAROUSSI, H. et al. Unveiling the techno-functional and bioactive properties of bee pollen as an added-value food ingredient. **Food Chemistry**, v. 405, n. November 2022, p. 12, 2023.
- LANDER, T. Network modelling, citizen science and targeted interventions to predict, monitor and reverse bee decline. **Plants People Planet**, v. 2, p. 111–120, 2020.
- LANDI, P. et al. Complexity and stability of ecological networks: a review of the theory. **Population Ecology**, v. 60, p. 319–345, 2018.
- LI, Q. Q. et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. **Journal of Functional Foods**, v. 49, n. August, p. 472–484, 2018.

- LOCATELLI, M. et al. Green profile tools: Current status and future perspectives. **Advances in Sample Preparation**, v. 6, p. 100068, maio 2023.
- LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v. 51, n. 3, p. 125–138, 1970.
- LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v. 59, n. 4, p. 139–157, 1978.
- LU, P. et al. NMR and HPLC profiling of bee pollen products from different countries. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, n. 100119, p. 12, 2022.
- MAIA-SILVA, C. et al. Environmental windows for foraging activity in stingless bees, *Melipona subnitida* Ducke and *Melipona quadrifasciata* lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 378–385, 2014.
- MAILULA, M. T.; NOFEMELA, R. S. Botanical origin of pollen collected by *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) in a suburb of Pretoria, South Africa. **African Entomology**, v. 25, n. 2, p. 417–427, 2017.
- MARTINS, M. C. T.; MORGANO, M. A.; VICENTE, E.; BAGGIO, S. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states. **Journal of Apicultural Science**, v. 55, p. 107, 2011.
- MARTÍN-SANZ, J. P. et al. Comparison of soil quality indexes calculated by network and principal component analysis for carbonated soils under different uses. **Ecological Indicators**, v. 143, n. July, p. 1 – 14, 2022.
- MASEKO, K. H. et al. Discrimination of *Musa* banana genomic and sub-genomic groups based on multi-elemental fingerprints and chemometrics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, p. 104334, mar. 2022.
- MATTOS, I. M.; SOUZA, J.; SOARES, A. E. E. Analysis of the effects of climate variables on *Apis mellifera* pollen foraging performance. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1301–1308, 2018.
- MELO NASCIMENTO, J. E. **Caracterização botânica e físico-química do mel e pólen dos meliponíneos e pólen da *Apis***. [s.l.] UEM - Universidade Estadual de Maringá, 2020.
- MONTERO, I.; TORMO, R. Análisis polínico de mieles de cuatro zonas montañosas de Extremadura. **Anales de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española**, v. 5, p. 71–78, 1990.
- MORGANO, M. A. et al. A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: Geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 727–736, 2012.

MOURA, M. E. K. DE et al. Influence of some abiotic factors on the flight activity of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) in Southern Brazil. **Journal of Apicultural Research**, p. 7, 2022.

NASCIMENTO, J. E. M. et al. Temporal variation in production and nutritional value of pollen used in the diet of *Apis mellifera L.* in a seasonal semideciduous forest. **Sociobiology**, v. 66, n. 2, p. 263–273, 2019.

NEGRÃO, A. F.; BARRETO, L. M. R. C.; ORSI, R. O. Influence of the collection season on production, size, and chemical composition of bee pollen produced by *Apis mellifera L.* **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 5–10, 2014.

NEGRÃO, A. F.; ORSI, R. DE O. Harvesting season and botanical origin interferes in production and nutritional composition of bee pollen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 325–332, 2018.

NOVAIS, J. S. DE; LIMA, L. C. L. E.; SANTOS, F. DE A. R. DOS. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera L.* in a semi-arid area from Bahia, Brazil. **Grana**, v. 48, n. 3, p. 224–234, 2009.

OFORI, D. A. et al. Coletor de pólen para abelhas sem ferrão. **Molecules**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2020.

OLIVEIRA-ABREU, C. et al. Pollen and nectar foraging by *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepelletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in natural habitat. **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 441–448, 2014.

PENA-PEREIRA, F. et al. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, p. 100025, ago. 2022.

RAMALHO, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 37–47, 2004.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 469–488, 1990.

RAMÍREZ-ARRIAGA, E. et al. Análisis palinológico de mieles y cargas de polen de *Apis Mellifera* (Apidae) de la Región Centro y Norte del Estado de Guerrero, México. **Botanical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 141–156, 2016.

REBELO, K. S. et al. Nutritional composition and bioactive compounds of *Melipona seminigra* pot-pollen from Amazonas, Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 12, p. 4907–4915, 2021.

RODRIGUES DE S., B. et al. Physicochemical parameters and content of b-complex vitamins: An exploratory study of bee pollen from southern Brazilian states. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 45, n. 3, p. 232–242, 2018.

ROZMAN, A. S. et al. A Comprehensive Review of Stingless Bee Products: Phytochemical Composition and Beneficial Properties of Honey, Propolis, and Pollen. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 13, 2022.

SAHA, D. et al. Application of near-infrared hyperspectral imaging coupled with chemometrics for rapid and non-destructive prediction of protein content in single chickpea seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 115, p. 104938, jan. 2023.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, p. 123046, fev. 2022.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C. Y. et al. Analysis of Multifloral Bee Pollen Pellets by Advanced Digital Imaging Applied to Functional Food Ingredients. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 328–335, dez. 2018.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C. Y. et al. Carotenoid profile determination of bee pollen by advanced digital image analysis. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 175, p. 105601, ago. 2020.

SANYAL, A. et al. Revolutionizing the Use of Honeybee Products in Healthcare : A Focused Review on Using Bee Pollen as a Potential Adjunct Material for Biomaterial Functionalization. **Functional Biomaterials**, v. 14, n. 352, p. 30, 2023.

SILVA, C. I. DA et al. **Guia ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil**. 1. ed. São Paulo - SP: Ministério do meio ambiente, 2014.

SILVA FERNANDES, J. et al. Tea authentication and determination of chemical constituents using digital image-based fingerprint signatures and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 421, p. 136164, set. 2023.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507–511, 2006.

SIPOS, L. et al. Classification of bee pollen and prediction of sensory and colorimetric attributes—a sensometric fusion approach by e-nose, e-tongue and nir. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 23, p. 1–22, 2020.

STANLEY, R.G. & LINSKENS, H. F. **Pollen Biology Biochemistry Management**. Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1974.

STRAUMITE, E. et al. Physical and Microbiological Characteristics and Antioxidant Activity of Honey Bee Pollen. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 6, 2022.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, p. 82–106, 2020.

VENKATARAJU, A. et al. A review of machine learning techniques for identifying weeds in corn. **Smart Agricultural Technology**, v. 3, p. 100102, fev. 2023.

VIT, P. et al. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by Melipona and Scaptotrigona stingless bees from Paria Grande , Amazonas State , Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 78–84, 2016.

WANG, J. et al. A term function-aware keyword citation network method for science mapping analysis. **Information Processing and Management**, v. 60, p. 1–18, 2023.

WANG, Y.; CHENG, J. Rapid and Non-destructive Prediction of Protein Content in Peanut Varieties Using Near-infrared Hyperspectral Imaging Method. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 40–43, 2018.

WEGLIŃSKA, M. et al. Determination of nutritional parameters of bee pollen by Raman and infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 212, n. November 2019, 2020.

WILMS, W.; WIECHERS, B. Floral resource partitioning between native Melipona bees and the introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rain forest. **Apidologie**, v. 28, n. 6, p. 339–355, 1997.

WILSON, R. S. et al. Many small rather than few large sources identified in long-term bee pollen diets in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 310, p. 8, 2021.

YANG, K. et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 708–718, 2013.

ZHANG, Y. et al. Deep learning in food category recognition. **Information Fusion**, v. 98, p. 101859, out. 2023.

ZHOU, M. et al. Machine learning modeling and prediction of peanut protein content based on spectral images and stoichiometry. **Lwt**, v. 169, n. 114015, p. 10, 2022.

4. CAPÍTULO IV

VARIABILIDADE SAZONAL NA COLORAÇÃO DE PÓLEN DE *Apis mellifera* E DE ABELHAS SEM FERRÃO

4.1. INTRODUÇÃO

Recentemente, o pólen de abelha tem despertado o interesse da comunidade científica mundial decorrente de numerosos estudos que apontam para os seus efeitos benéficos à saúde. Este está sendo potencialmente utilizado como ingredientes ativos em fármacos, como suplemento alimentar ou como ingrediente em alimentos processados devido ao seu caráter funcional (GIAMPIERI et al., 2022; LAAROUSSI et al., 2023). Estes efeitos são associados à sua composição que engloba quantidades significativas de carboidratos, proteínas, lipídios e quantidades importantes de micronutrientes como minerais, vitaminas, compostos fenólicos e aminoácidos essenciais. Em vista disso, o pólen de abelha possui propriedades terapêuticas como atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e anti-hipertensivas, entre outras (ARES et al., 2022; KIELISZEK et al., 2018; LI et al., 2018; LU et al., 2022; THAKUR; NANDA, 2020).

O maior desafio atual das indústrias farmacêuticas e alimentícias é utilizar como matéria prima pólen de abelha com coloração padronizada, uma vez que este apresenta elevada variabilidade em sua composição química, nutricional e fitoquímica. Essas variações em sua composição e conseqüentemente em sua coloração dependem das espécies de abelha, bem como, das espécies vegetais, área geográfica, estações do ano, tipo de solo, práticas de manejo, entre outros fatores (GIAMPIERI et al., 2022; KIELISZEK et al., 2018; LI et al., 2018; ROZMAN et al., 2022; THAKUR; NANDA, 2020). Portanto, estudos, que embora ainda sejam escassos, mas que demonstrem como estes fatores afetam a composição química, nutracêutica e fitoquímica e conseqüentemente a coloração do pólen de abelha são essenciais para o desenvolvimento da apicultura e meliponicultura nacional (NEGRÃO; ORSI, 2018). Devido a ampla diversidade de flora disponível no Brasil, bem como de espécies de abelhas nativas (abelhas sem ferrão) e abelhas de mel (*Apis mellifera*) para a produção de pólen de abelha, torna-se imprescindível o desenvolvimento de pesquisas que possam auxiliar os apicultores e meliponicultores na escolha dos locais e espécies de abelhas mais adequados de acordo com o uso pretendido (fármaco, suplemento alimentar ou ingrediente em formulações alimentícias).

Abelhas sem ferrão são amplamente distribuídas em países da América do Sul, África, Sudeste Asiático e Austrália trazendo desenvolvimento a meliponicultura nestes locais e propiciando a conservação da biodiversidade de diferentes biomas (ROZMAN et al., 2022; SILVA et al., 2006).

No Brasil, as abelhas sem ferrão são nativas e estão presentes em todo o país, embora as espécies diferem de região para região. Além de sua importância como maiores polinizadores da maioria das plantas silvestres e de algumas monoculturas, o mel e o pólen de meliponídeos são também fontes de alimento, medicamentos (geoprópolis) e renda para as populações rurais. Existe uma forte cultura do uso dos produtos da meliponicultura, especialmente, mel e própolis e mais recentemente de pólen, no Brasil e em outras partes do mundo onde estas espécies de abelhas são nativas (SILVA et al., 2006). Apesar disso, enquanto, são reportadas inúmeras publicações sobre a composição, coloração e propriedades nutricionais do pólen de *Apis mellifera* (DE-MELO et al., 2018a; NEGRÃO; BARRETO; ORSI, 2014; NEGRÃO; ORSI, 2018; RODRIGUES DE S. et al., 2018), a composição química, fitoquímica e coloração de pólen coletado por ‘abelhas sem ferrão’ continua inexplorada e demanda mais pesquisas sobre os fatores que levam a grande variabilidade observada nesse produto (BARTH; DE FREITAS; VANDERBORGHT, 2020; DUARTE et al., 2018; REBELO et al., 2021; SILVA et al., 2006; VIT et al., 2016).

Sendo assim, uma ANOVA de fatores aninhados foi aplicada a dados de cor instrumental do sistema CIELAB (coordenadas L^* , a^* e b^*) para avaliar a influência da espécie de abelha e da sazonalidade na coloração de amostras de pólen coletadas por *Apis mellifera* e por abelhas sem ferrão (*Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*) em diferentes estações do ano, na Fazenda Experimental Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá no Estado do Paraná, Brasil.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Análise polínica

A identificação da origem botânica das amostras de pólen de abelha investigadas nesta tese foi realizada por análise polínica descrita no Capítulo III.

4.2.2. Análise de cor instrumental

A medição de cor instrumental nas amostras de pólen de abelha foi realizada no laboratório de fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Dois Vizinhos no Paraná,

com um medidor de cor Konica Minolta CR-400, dispositivo de medição de cor equipado com seis fotodiodos de silício altamente sensíveis com faixa de medição de 0,01 a 160 %. Os resultados foram expressados pelas coordenadas do espaço de cor CIELAB, L^* (luminosidade) a^* (+ a^* vermelho e - a^* verde) e b^* (+ b^* amarelo e - b^* azul) (KONICA MINOLTA, 2023). Previamente à medição das amostras, o dispositivo foi calibrado usando um padrão branco (C: $Y - 87,0$; $x - 0,3169$; $y - 0,3239$ e D: $Y - 87,0$; $x - 0,3193$; $y - 0,3367$). Para a medição da cor instrumental, uma massa em torno de 3,0 a 8,0 g da amostra de pólen de abelha, previamente moída e homogeneizada, foi colocada sobre papel sulfite branco e compactada com uma placa de Petri formando uma camada uniforme de aproximadamente 0,3 cm de espessura. Assim, a amostra de pólen cobria completamente a superfície do sensor, sem espaços brancos ocupando um espaço aproximado de 9,0 cm², onde foram tomadas três leituras em posições diferentes. O aparelho de medição foi abaixado sobre a amostra de pólen encostando inteiramente o leitor sob a amostra, antes do início da medição. Os valores das coordenadas de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos após alguns segundos da medição da amostra. As medições paralelas foram realizadas em triplicata para cada amostra de pólen (243 amostras x 3 réplicas = 729 registros de coordenadas de cor) e os resultados das coordenadas de cor foram expressos como valores médios.

4.2.3. Análise estatística

Para avaliar a influência dos fatores ‘*espécie de abelha*’ e ‘*estação do ano*’ na cor instrumental das amostras de pólen de abelha foi realizada uma ANOVA com fatores aninhados dos Modelos Lineares Generalizados (MLG) no nível de 95 % de confiança, em que o fator ‘*estação do ano*’ foi aninhado no fator ‘*espécie de abelha*’. Para o fator ‘*espécie de abelha*’ ($i = 5$) foram adotados cinco níveis (*Apis mellifera*, *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*) e para o fator ‘*estação do ano*’ ($j = 4$) foram adotados quatro níveis (inverno, primavera, verão e outono). Para avaliar o erro experimental foram utilizadas diferentes amostras de pólen de abelha coletadas nas quatro estações do ano por cada espécie de abelha no período de junho de 2018 a maio de 2019.

O teste *Tukey* de comparação múltipla de médias foi aplicado no nível de 95 % de confiança aos dados de cor instrumental das amostras de pólen de abelha de forma a identificar diferenças significativas entre as médias das coordenadas de cor (L^* , a^* e b^*) do espaço de cor CIELAB obtidas para as espécies de abelha e entre as médias determinadas para as estações do ano dentro de cada espécie de abelha. Análises de correlação de *Pearson*, também foram realizadas para todos os dados no mesmo nível de confiança de 95 % para verificar as correlações existentes entre as

coordenadas de cor instrumental avaliadas. Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio dos softwares estatísticos Minitab for Windows, versão 16.2.2 e Statistica versão 8.0.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pólen de abelha apresenta coloração variável com tonalidades que podem variar do branco acinzentado ao marrom escuro, com predominância do amarelo, laranja e vermelho e essa variabilidade pode ser atribuída às diferenças na composição de pólenes vegetais, ou em sua composição química ou ainda de processos de oxidação oriundos dos processos de obtenção e de processamento (CASTIGLIONI et al., 2022; DE-MELO et al., 2016, 2018a; SIPOS et al., 2020; STRAUMITE et al., 2022; THAKUR; NANDA, 2020; YANG et al., 2013).

Os valores de cor instrumental do sistema CIELAB (Tabela 4.1) indicaram variações nas coordenadas L^* (45,32 - 63,01), a^* (7,65 - 16,17) e b^* (17,48 - 31,93) para as amostras de pólen de abelha coletadas em diferentes estações do ano pela *Apis mellifera* e pelas abelhas sem ferrão. Para avaliar se haviam diferenças significativas na cor instrumental do pólen de abelha coletado por diferentes espécies de abelhas e em diferentes estações do ano foi realizada uma ANOVA de fatores aninhados.

O fator ‘espécie de abelha’ foi significativo para as coordenadas L^* , a^* e b^* ($F_{obs} = 26,49$; $p = 0,000$ para L^* ; $F_{obs} = 18,50$; $p = 0,000$ para a^* ; $F_{obs} = 22,94$; $p = 0,000$ para b^*). O fator ‘estação do ano’ também influenciou de forma significativa essas coordenadas de cor (L^* , a^* e b^*) ($F_{obs} = 4,32$; $p = 0,000$ para L^* ; $F_{obs} = 10,41$; $p = 0,000$ para a^* ; $F_{obs} = 7,85$; $p = 0,000$ para b^*) responsáveis pela luminosidade e pela coloração característica (tons de vermelho e de amarelo) do pólen de abelha.

No sistema CIELAB, o parâmetro L^* expressa a luminosidade do objeto sendo avaliado na escala de cinza, variando do preto absoluto ao branco absoluto (SIPOS et al., 2020). Nas amostras de pólen de abelha os valores de L^* se situaram entre 45,32 – 63,01 e foram similares aos reportados na literatura para pólen de abelha moído e homogeneizado (CASTIGLIONI et al., 2022) e para as cargas de pólen de abelha oriundas do estado do Paraná, Brasil (DE-MELO et al., 2018a). Além disso, pode ser atribuído que valores (+) e mais elevados para L^* indicam amostras de pólen de abelha com tonalidades mais claras (Sipos et al., 2020). Quando se comparam os valores de L^* para as amostras das diferentes espécies de abelhas, observa-se que o pólen coletado pelas abelhas *Apis mellifera* ($59,02 \pm 6,77$), *Melipona marginata* ($58,57 \pm 6,88$) e *Melipona quadrifasciata* ($59,85 \pm 4,52$) mostraram tonalidades mais claras e significativamente diferentes

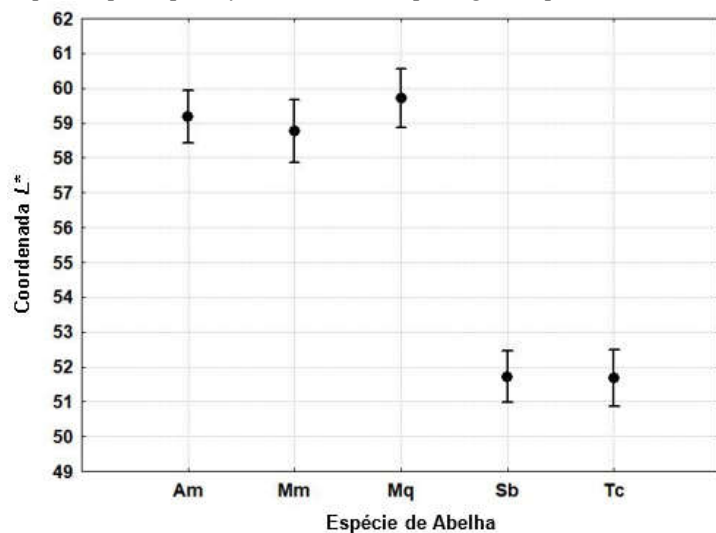
das encontradas nas amostras de pólen das abelhas *Scaptotrigona bipunctata* ($51,75 \pm 5,52$) e *Tetragona clavipes* ($51,58 \pm 6,53$) (Figura 4.1-a).

TABELA 4.1 - VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DE PARÂMETROS DE COR (L^* , a^* , b^*) DA ESCALA CIELAB DE AMOSTRAS DE PÓLEN COLETADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE ABELHAS E EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO

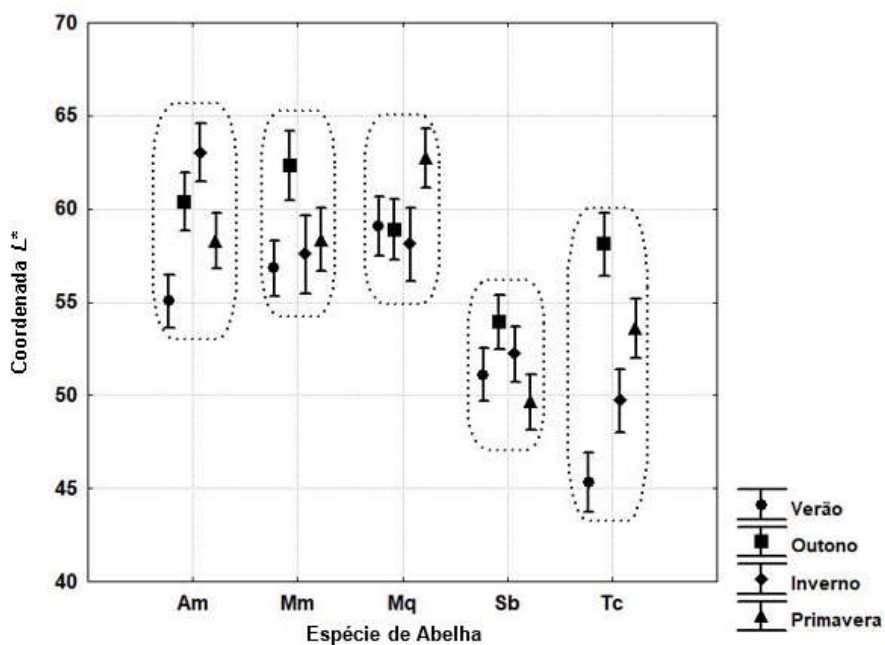
Espécie de Abelha	Estação do Ano	L^*	a^*	b^*
<i>Apis mellifera</i>	Inverno	$63,01 \pm 7,78^a$	$10,37 \pm 3,15^{c,d,e,f}$	$31,27 \pm 4,24^a$
	Outono	$60,38 \pm 3,86^{a,b,c}$	$8,69 \pm 1,05^{d,e,f}$	$23,51 \pm 1,78^{b,c}$
	Primavera	$58,29 \pm 8,11^{a,b,c,d,e}$	$10,47 \pm 2,08^{c,d,e,f}$	$24,75 \pm 5,04^b$
	Verão	$55,05 \pm 4,14^{b,c,d,e,f,g}$	$11,28 \pm 2,10^{b,c}$	$22,12 \pm 3,07^{b,c,d}$
	Média Anual	$59,02 \pm 6,77^A$	$10,25 \pm 2,35^A$	$25,28 \pm 5,05^A$
<i>Melipona marginata</i>	Inverno	$57,56 \pm 7,76^{a,b,c,d,e,f,g}$	$11,65 \pm 1,88^{b,c,d}$	$22,17 \pm 1,64^{b,c,d}$
	Outono	$62,31 \pm 7,21^{a,b,c}$	$7,65 \pm 1,01^f$	$20,09 \pm 2,53^{b,c,d}$
	Primavera	$58,35 \pm 7,58^{a,b,c,d,e}$	$11,63 \pm 1,41^{b,c}$	$23,13 \pm 3,89^{b,c}$
	Verão	$56,83 \pm 5,29^{a,b,c,d,e,f,g}$	$11,99 \pm 2,50^{b,c}$	$22,23 \pm 4,02^{b,c,d}$
	Média Anual	$58,57 \pm 6,88^A$	$10,88 \pm 2,51^A$	$21,99 \pm 3,45^C$
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Inverno	$58,11 \pm 5,00^{a,b,c,d,e,f,g}$	$11,39 \pm 1,42^{b,c,d}$	$22,03 \pm 1,35^{b,c,d}$
	Outono	$58,90 \pm 3,08^{a,b,c,d}$	$8,06 \pm 0,66^{e,f}$	$21,08 \pm 1,88^{b,c,d}$
	Primavera	$62,74 \pm 5,97^{a,b}$	$10,77 \pm 1,83^{b,c,d,e}$	$23,57 \pm 2,05^{b,c}$
	Verão	$59,08 \pm 2,42^{a,b,c,d}$	$11,45 \pm 2,68^{b,c}$	$23,07 \pm 3,61^{b,c}$
	Média Anual	$59,85 \pm 4,52^A$	$10,33 \pm 2,28^A$	$22,48 \pm 2,57^{B,C}$
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Inverno	$52,22 \pm 7,21^{d,e,f,g,h}$	$10,19 \pm 1,52^{c,d,e,f}$	$19,48 \pm 3,48^{b,c,d}$
	Outono	$53,91 \pm 3,76^{c,d,e,f,g}$	$8,26 \pm 0,58^{e,f}$	$17,48 \pm 1,34^d$
	Primavera	$49,64 \pm 5,95^{g,h}$	$11,67 \pm 1,10^{b,c}$	$18,97 \pm 3,62^{c,d}$
	Verão	$51,11 \pm 4,34^{e,f,g,h}$	$10,81 \pm 1,71^{b,c,d}$	$19,24 \pm 3,92^{c,d}$
	Média Anual	$51,75 \pm 5,52^B$	$10,21 \pm 1,79^A$	$18,78 \pm 3,26^D$
<i>Tetragona clavipes</i>	Inverno	$49,71 \pm 4,64^{d,g,h}$	$12,19 \pm 2,26^{b,c}$	$22,70 \pm 7,00^{b,c,d}$
	Outono	$58,10 \pm 4,21^{a,b,c,d,e,f}$	$10,32 \pm 1,08^{c,d,e,f}$	$23,76 \pm 2,74^{b,c}$
	Primavera	$53,58 \pm 3,66^{c,d,e,f,g}$	$16,17 \pm 1,83^a$	$31,93 \pm 4,78^a$
	Verão	$45,32 \pm 5,68^h$	$13,25 \pm 2,77^b$	$19,35 \pm 7,71^{b,c,d}$
	Média Anual	$51,58 \pm 6,53^B$	$13,06 \pm 2,95^B$	$24,49 \pm 7,44^{A,B}$

Fonte: a autora, (2023).

FIGURA 4.1 - INFLUÊNCIA DOS FATORES (a) ESPÉCIE DE ABELHA E (b) ESTAÇÃO DO ANO NA COORDENADA DE COR (L^*) DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA. Am = *Apis mellifera*; Mm = *Melipona marginata*; Mq = *Melipona quadrifasciata*; Sb = *Scaptotrigona bipunctata*; Tc = *Tetragona clavipes*



(a)



(b)

Fonte: a autora, (2023).

Para o pólen coletado pela abelha *Apis mellifera* observou-se que os valores de luminosidade (L^*) foram maiores para as amostras coletadas no inverno ($63,01 \pm 7,78$) e significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores determinados nas demais estações do ano (Figura 4.1-b). No inverno, as amostras de pólen de abelha foram caracterizadas por altas taxas de frequência de pólen das espécies vegetais *Mimosa pigra* (76,9%), *Raphanus raphanistrum* (76,3%) e *Eugenia uniflora* (37,1%). Todavia, para as amostras de pólen de abelha das espécies de abelhas *Scaptotrigona bipunctata* ($53,91 \pm 3,76$) e *Tetragona clavipes* ($58,10 \pm 4,21$) observa-se um comportamento diverso em que as amostras coletadas no outono apresentaram maiores valores

de luminosidade (L^*) quando comparadas às obtidas nas outras estações do ano (Figura 4.1-b). No outono, as amostras de pólen de abelha de *Scaptotrigona bipunctata* foram caracterizadas pela predominância de *Eucalyptus robusta* (88,3 %) e as amostras de *Tetragona clavipes* por *Eriobotrya japonica* (48,7 %) e contribuições importantes de *Eucalyptus robusta* (33,0 %), *Macherium stipitatum* (22,0 %) e *Baccharis dracunculifolia* (16,0 %).

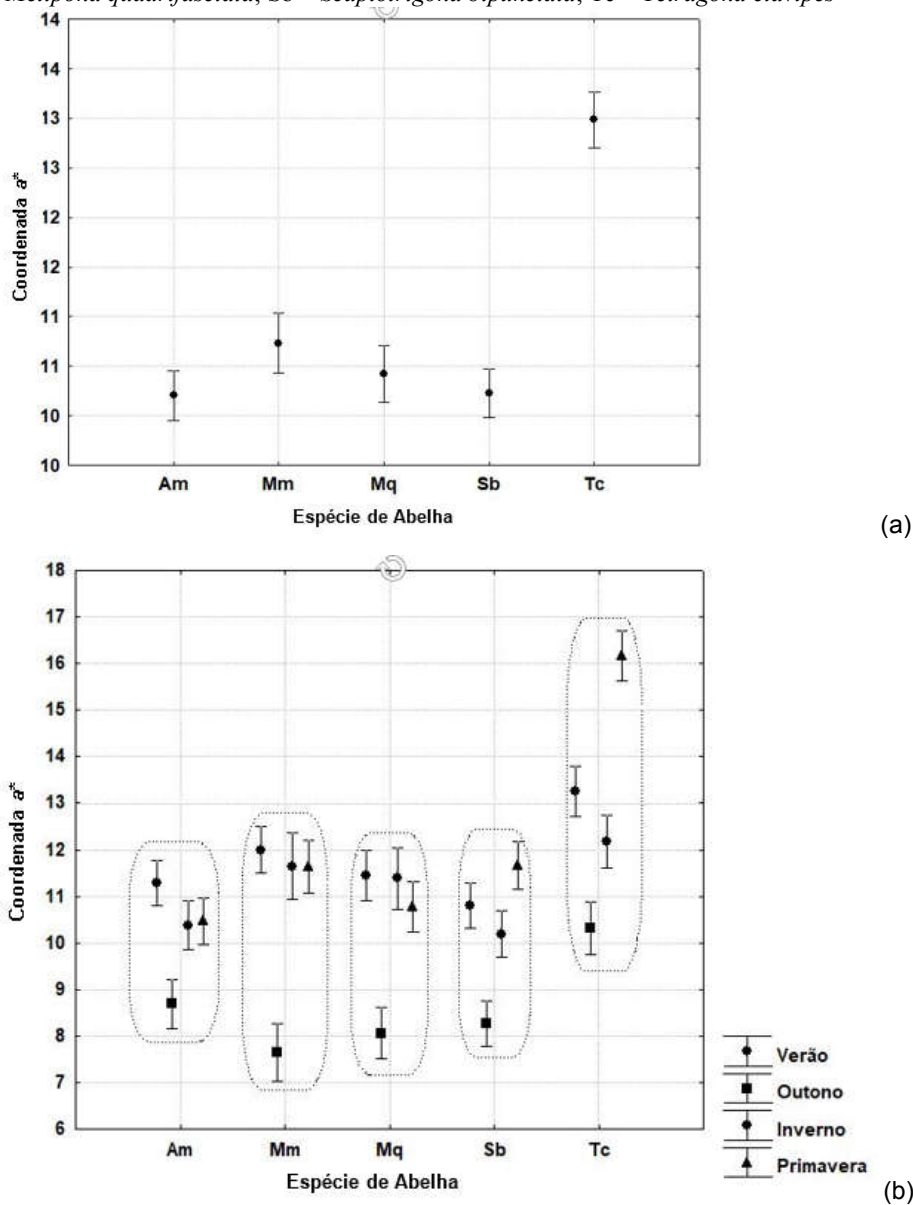
Por outro lado, as amostras de pólen de abelha da *Melipona marginata* e da *Melipona quadrifasciata* não mostraram os valores de luminosidade influenciados pelas estações do ano em que a coleta foi realizada (Figura 4.1-b). Esse comportamento pode ser associado ao fato que as amostras dessas espécies de abelhas sem ferrão apresentam predominância em uma ou mais estações do ano das espécies vegetais *Eucalyptus robusta*, *Psidium guajava* e *Alchornea triplinervia*. Assim, pode-se inferir que entre os fatores espécie de abelha e estação do ano, a espécie de abelha apresenta maior influência nos valores de luminosidade (L^*) das amostras de pólen de abelha, o que foi comprovado pelos resultados da análise de ANOVA de fatores aninhados.

A coordenada de cor no sistema CIELAB, denominada de a^* , pode assumir valores (+) para a coloração vermelha e valores (-) para a coloração verde (SIPOS et al., 2020). Neste estudo, para o pólen coletado por diferentes espécies de abelhas e em diferentes estações do ano, foram observados sempre valores positivos para a^* , com intervalo entre 7,65 - 16,17, indicando uma maior contribuição do vermelho em relação ao verde na coloração das amostras. Estes intervalos para a coordenada a^* foram similares aos observados na literatura por De-Melo et al. (2018) (4,9 - 11,7), Sipos et al. (2020) (0,9 - 15,6) e por Castiglioni et al. (2022) (5,1 - 14,8).

Para os valores da coordenada a^* observa-se uma certa homogeneidade, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) para as amostras de pólen das espécies *Apis mellifera* ($10,25 \pm 2,35$), *Melipona marginata* ($10,88 \pm 2,51$), *Melipona quadrifasciata* ($10,33 \pm 2,28$) e *Scaptotrigona bipunctata* ($10,21 \pm 1,79$) (Figura 4.2-a). As amostras de pólen de abelha da *Tetragona clavipes* por sua vez apresentaram valores de a^* mais elevados ($13,06 \pm 2,95$) e que diferiram significativamente dos encontrados para as amostras de pólen das outras espécies de abelhas investigadas, indicando que estas amostras apresentam coloração que tende ao vermelho (Figura 4.2-a). Para as amostras de pólen de *Tetragona clavipes* foi observada a contribuição relevante de espécies vegetais que não estavam presentes nas amostras de pólen das outras espécies de abelhas. Por exemplo, foi identificada a presença de *Eriobotrya japonica*, *Ceiba speciosa*, *Alternanthera tenella*, *Piper amalago* e *Murraya paniculata*. Considerando que o pólen de espécies vegetais pode variar em coloração, a presença de uma diversidade de plantas em sua composição poderá interferir

e contribuir para a coloração final do pólen de abelha e, portanto, nos valores das coordenadas de cor do sistema CIELAB.

FIGURA 4.2 - INFLUÊNCIA DOS FATORES (a) ESPÉCIE DE ABELHA E (b) ESTAÇÃO DO ANO NA COORDENADA DE COR (a^*) DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA. Am = *Apis mellifera*; Mm = *Melipona marginata*; Mq = *Melipona quadrifasciata*; Sb = *Scaptotrigona bipunctata*; Tc = *Tetragona clavipes*



Fonte: a autora, (2023).

Em relação às estações do ano, os menores valores de a^* foram detectados nas amostras de pólen de abelha coletadas no outono pelas abelhas *Apis mellifera* ($8,69 \pm 1,05$), *Melipona Marginata* ($7,65 \pm 1,01$), *Melipona quadrifasciata* ($8,06 \pm 0,66$) e *Scaptotrigona bipunctata* ($8,26 \pm 0,58$), enquanto que foram obtidos valores similares para as amostras coletadas nas outras estações do ano (Figura 4.2-b). As amostras de pólen coletadas no outono apresentaram

predominância de *Eucalyptus robusta* para a *Melipona marginata* (98,1 %), para a *Melipona quadrifasciata* (94,6 %), para a *Scaptotrigona bipunctata* (88,3 %) e contribuições importantes de *Mimosa pigra* (65,0 %) e *Eucalyptus robusta* (44,0 %) para *Apis mellifera*.

Novamente, os valores de a^* das amostras de pólen coletadas pela abelha *Tetragona clavipes* se destacam, apresentando os maiores valores para essa coordenada na primavera ($16,17 \pm 1,83$) e os menores valores no outono ($10,32 \pm 1,08$). As amostras de pólen coletadas na primavera apresentaram contribuições de diferentes espécies de plantas tais como *Raphanus raphanistrum* (25,5 %), *Eucalyptus robusta* (33,0 %), *Alchornea triplinervia* (33,0 %), and *Croton floribundus* (33,0 %), enquanto que as amostras coletadas no outono foram caracterizadas pela presença marcante de *Eriobotrya japonica* (48,7 %), *Macherium stipitatum* (22,0 %), *Eucalyptus robusta* (33,0 %), e *Baccharis dracunculifolia* (16,0 %). As amostras de pólen coletadas por essa espécie de abelha sem ferrão foram também as que apresentaram o comportamento mais diferenciado entre as estações do ano em relação a essa coordenada de cor. Esse comportamento pode ser associado a um hábito generalista na coleta de pólen vegetal pela abelha *Tetragona clavipes*, o que leva a contribuição relevante de diferentes espécies vegetais ao pólen coletado em cada estação do ano, interferindo, portanto, na coloração das amostras obtidas em cada estação do ano.

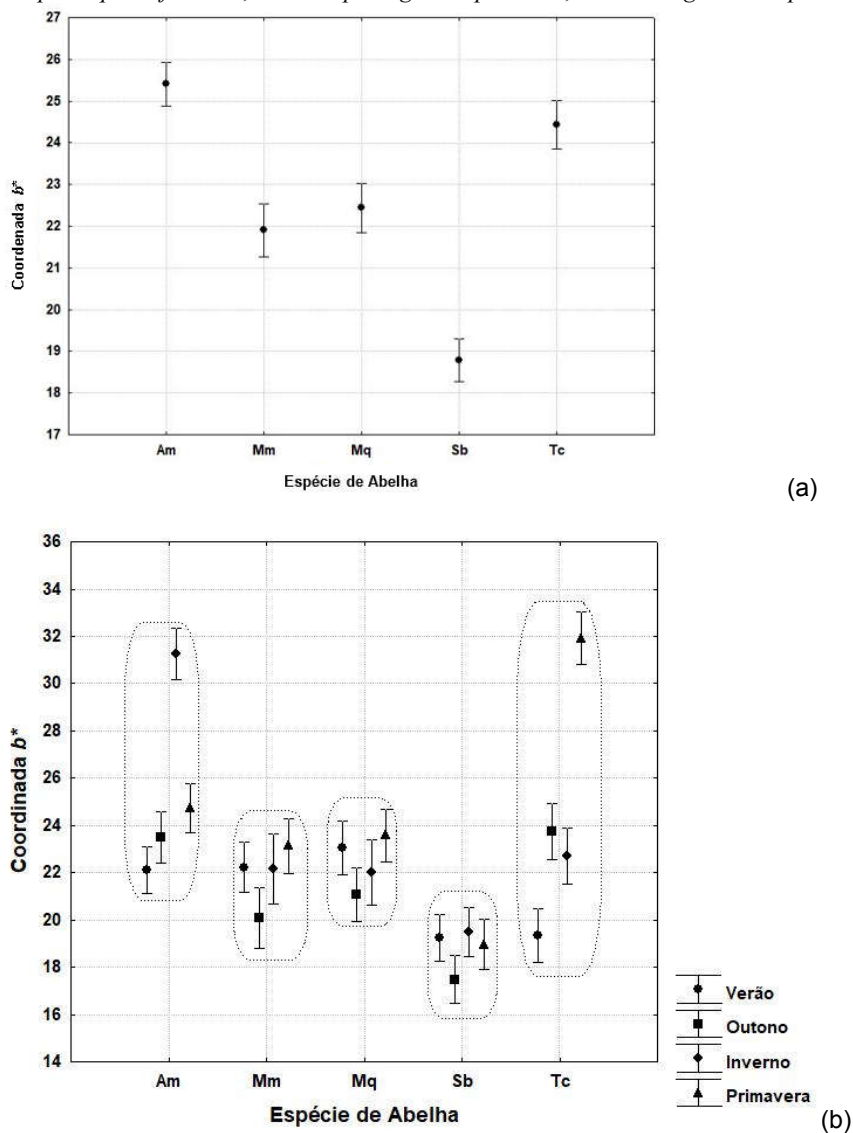
A coordenada de cor no sistema CIELAB, denominada de b^* , pode assumir valores (+) para a coloração amarela e valores (-) para a coloração azul (SIPOS et al., 2020). Neste estudo, para o pólen de abelha coletado por diferentes espécies de abelhas e em diferentes estações do ano, foram observados sempre valores positivos para b^* (17,48 – 31,93), indicando uma maior contribuição do amarelo em relação ao azul na coloração das amostras. No entanto, na literatura foram observados maiores valores para essa coordenada por outros autores (De-Melo et al. (2018) (50,0 – 63,0), Sipos et al. (2020) (17,1 – 64,5), Castiglioni et al. (2022) (41,6 – 68,1)). Essas diferenças podem estar relacionadas a riqueza de pigmentos com atividade antioxidante e as diferenças na concentração de minerais nas amostras de pólen de abelha, as quais interferem nos valores das coordenadas de cor a^* e b^* (CASTIGLIONI et al., 2022).

Para a coordenada b^* foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de pólen coletadas pela *Apis mellifera* e pelas abelhas sem ferrão (Figura 4.3-a). Para as amostras de pólen coletadas pela *Scaptotrigona bipunctata* os valores de b^* foram os mais baixos ($18,78 \pm 3,26$) e diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos encontrados nas amostras coletadas pelas outras espécies de abelhas.

Os valores de b^* para as amostras de pólen de *Apis mellifera* ($25,28 \pm 5,05$) também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos valores observados para as

amostras de *Melipona marginata* ($21,99 \pm 3,45$) e de *Melipona quadrifasciata* ($22,48 \pm 2,57$), mas foram similares aos valores encontrados para as amostras de *Tetragona clavipes* ($24,49 \pm 7,44$) (Figura 4.3-a).

FIGURA 4.3 - INFLUÊNCIA DOS FATORES (a) ESPÉCIE DE ABELHA E (b) ESTAÇÃO DO ANO NA COORDENADA DE COR (b^*) DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA. Am = *Apis mellifera*; Mm = *Melipona marginata*; Mq = *Melipona quadrifasciata*; Sb = *Scaptotrigona bipunctata*; Tc = *Tetragona clavipes*



Fonte: a autora, (2023).

Para as amostras de pólen das espécies de abelhas *Melipona marginata* ($21,99 \pm 3,45$) e *Melipona quadrifasciata* ($22,48 \pm 2,57$) não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de b^* entre as estações do ano, enquanto que para as amostras de *Apis mellifera* maiores valores foram obtidos quando a coleta foi realizada no inverno ($31,27 \pm 4,24$) e para as amostras de *Tetragona clavipes* quando estas eram coletadas na primavera ($31,93 \pm 4,78$) (Figura

4.3-b). Como descrito anteriormente, as amostras de pólen coletadas no inverno pela *Apis mellifera* foram caracterizadas por altas taxas de frequência de pólen vegetais de *Mimosa pigra* (76,9 %) e *Raphanus raphanistrum* (76,3 %), enquanto as amostras de pólen coletadas pela *Tetragona clavipes* na primavera foram caracterizadas por contribuições relevantes de diferentes espécies vegetais (*Raphanus raphanistrum* (25,5 %), *Eucalyptus robusta* (33,0 %), *Alchornea triplinervia* (33,0 %), and *Croton floribundus* (33,0 %)).

Para melhor compreender como a composição química pode influenciar a variabilidade da coloração do pólen de abelha foram realizadas análises de correlação linear entre as coordenadas (L^* , a^* e b^*) do espaço de cor CIELAB no intervalo de 95 % de confiança. Foram observadas correlações lineares significativas entre as coordenadas L^* e b^* ($r = 0,617$; $p = 0,000$) e entre a^* e b^* ($r = - 0,357$, $p = 0,000$), as quais podem estar associadas ao tipo e quantidade de fitoquímicos presentes (pigmentos, carotenoides e compostos fenólicos) ou outros componentes como sais minerais. Correlações entre as coordenadas de cor instrumental e a composição química de amostras de pólen de abelha foram observadas por outros autores (DE-MELO et al., 2016; THAKUR; NANDA, 2020; YANG et al., 2013), e em especial, correlações com os teores de minerais (Ca, Mg e Fe) ou com os teores de compostos fenólicos totais e com potencial antioxidante e antimicrobiano. De acordo com Thakur e Nanda (2020), o tipo de processamento adotado como moagem e secagem pode resultar em amostras mais claras e com predominância do amarelo (valores de b^* positivos e mais elevados), como os observados neste estudo, os quais podem ser oriundos de reações de oxidação de alguns compostos como polifenóis durante o processo de secagem.

4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma variabilidade intrínseca na cor instrumental (coordenadas L^* , a^* e b^* do espaço de cor CIELAB) do pólen de abelha foi observada, sendo principalmente atribuída a espécie de abelha que faz a coleta. Porém, a sazonalidade, outro fator tão importante quanto a espécie de abelha, pode produzir mudanças nas fontes vegetais disponíveis para a nutrição das abelhas na região produtora. Sendo assim, o hábito de forrageamento das diferentes espécies de abelhas associado a flora e as condições climáticas em cada estação do ano na região produtora podem explicar, em parte, a variabilidade na coloração desse produto.

Amostras de pólen de abelha classificadas como monoflorais em que há predominância de determinadas espécies vegetais como *Eucalyptus robusta*, *Psidium guajava*, *Mimosa pigra*, *Raphanus raphanistrum* e *Albizia niopoides* apresentaram valores característicos para as

coordenadas de cor (L^* , a^* e b^*) que as diferenciaram das amostras classificadas como heteroflorais, independente da espécie de abelha responsável pela coleta do pólen de abelha.

Correlações importantes entre as coordenadas de cor (L^* , a^* e b^*) demonstraram que a busca pelo suprimento de pólen vegetal para manutenção e a reprodução das colmeias pelas espécies de abelhas *Apis mellifera* e pelas abelhas sem ferrão (*Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*) tem grande influência na coloração final do pólen de abelha produzido.

Informações sobre o comportamento de forrageamento (coleta de pólen vegetal) de cada espécie de abelha, bem como da disponibilidade da flora na região produtora podem auxiliar os apicultores e meliponicultores na fixação das colmeias próximas a determinadas plantas predominantes ao redor do apiário, visando assim, obter produtos com determinadas características de coloração que podem ser utilizadas em indústrias do setor.

O conhecimento de como a composição vegetal e as espécies de abelhas determinam a coloração do pólen de abelha produzido em uma determinada região pode ser determinante na sua utilização em âmbito industrial, como alimento, cosmético ou fármaco, especialmente para o pólen proveniente de abelhas sem ferrão que tem sua coloração pouco estudada até o momento. Além disso, essas informações podem contribuir para o desenvolvimento da apicultura e meliponicultura brasileira, uma vez que amostras de pólen de abelha monoflorais podem ser comercializadas mais facilmente e com maior valor agregado, assegurando ao consumidor um produto com coloração mais uniforme e padronizada.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARES, A. M. . et al. Differentiation of bee pollen samples according to the apiary of origin and harvesting period.pdf. **Food Bioscience**, v. 50, p. 8, 2022.

BARTH, O. M.; DE FREITAS, A. DA S.; VANDERBORGHT, B. Pollen preference of stingless bees (*Melipona rufiventris* and *M. quadrifasciata anthidioides*) inside an urban tropical forest at Rio de Janeiro city. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1005–1010, 2020.

CASTIGLIONI, S. et al. Characterisation of Bee Pollen from the Marche Region (Italy) According to the Botanical and Geographical Origin with Analysis of Antioxidant Activity and Colour , Using a Chemometric Approach. **Molecules**, v. 27, p. 1–14, 2022.

DE-MELO, A. A. M. et al. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **Lwt**, v. 65, p. 808–815, 2016.

DE-MELO, A. A. M. et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen.

Food Bioscience, v. 25, n. August, p. 91–110, 2018.

DUARTE, A. W. F. et al. Honey and bee pollen produced by meliponini (Apidae) in alagoas, brazil: Multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 38, n. 3, p. 493–503, 2018.

GIAMPIERI, F. et al. Bee Products : An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 6833–6848, 2022.

KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v.71, p. 170-180, 2018.

KONICA MINOLTA. **Entendendo o espaço de cor L* a* b***. 2006-2023 Konica Minolta Sensing Americas, Inc. 2023. Disponível em: <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>. Acesso em: 12 de outubro de 2023.

LAAROUSSI, H. et al. Unveiling the techno-functional and bioactive properties of bee pollen as an added-value food ingredient. **Food Chemistry**, v. 405, n. November 2022, p. 12, 2023.

LI, Q. Q. et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. **Journal of Functional Foods**, v. 49, n. August, p. 472–484, 2018.

LU, P. et al. NMR and HPLC profiling of bee pollen products from different countries. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, p. 12, 2022.

MELO NASCIMENTO, J. E. **Caracterização Botânica e Físico-Química do Mel e Pólen dos Meliponíneos e Pólen da *Apis***. [s.l.] UEM - Universidade Estadual de Maringá, 2020.

NEGRÃO, A. F.; BARRETO, L. M. R. C.; ORSI, R. O. Influence of the collection season on production, size, and chemical composition of bee pollen produced by *Apis mellifera L.* **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 5–10, 2014.

NEGRÃO, A. F.; ORSI, R. DE O. Harvesting season and botanical origin interferes in production and nutritional composition of bee pollen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 325–332, 2018.

REBELO, K. S. et al. Nutritional composition and bioactive compounds of *Melipona seminigra* pot-pollen from Amazonas, Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 12, p. 4907–4915, 2021.

RODRIGUES DE S., B. et al. Physicochemical parameters and content of b-complex vitamins: An exploratory study of bee pollen from southern Brazilian states. **Revista Chilena de Nutricion**, v. 45, n. 3, p. 232–242, 2018.

ROZMAN, A. S. et al. A Comprehensive Review of Stingless Bee Products: Phytochemical Composition and Beneficial Properties of Honey, Propolis, and Pollen. **Applied Sciences**

(Switzerland), v. 12, n. 13, 2022.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507–511, 2006.

SIPOS, L. et al. Classification of bee pollen and prediction of sensory and colorimetric attributes—a sensometric fusion approach by e-nose, e-tongue and nir. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 23, p. 1–22, 2020.

STRAUMITE, E. et al. Physical and Microbiological Characteristics and Antioxidant Activity of Honey Bee Pollen. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 6, 2022.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v.98, p. 82-106, 2020.

VIT, P. et al. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 78–84, 2016.

YANG, K. et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 708–718, 2013.

5. CAPÍTULO V

PREDIÇÃO VERDE E RÁPIDA DOS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA EM PÓLEN DE ABELHA COM BASE EM SUAS IMAGENS DIGITAIS COMBINADAS COM O ALGORITMO FLORESTA RANDÔMICA

5.1. INTRODUÇÃO

O pólen de abelha é produzido como resultado da coleta de grãos de pólen vegetal por abelhas, os quais são aglutinados por secreções salivares, néctar e/ou mel para formar bolotas que são armazenadas nos alvéolos da colmeia até o consumo. Serve como uma fonte de nutrientes para as abelhas, especialmente em épocas de escassez de recursos florais, garantindo assim o desenvolvimento e a manutenção das colônias. Do ponto de vista de composição, ele é uma valiosa fonte de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, fibras, carboidratos, lipídeos e ácidos, bem como outros compostos que, embora não tenham uma função nutricional, apresentam um importante caráter funcional, como pigmentos (carotenoides) e polifenóis, que podem atuar como potentes antioxidantes. Sua composição é variável e influenciada por vários fatores, como a espécie vegetal, a espécie de abelha, a região e a estação do ano em que o pólen é coletado. Apesar disso, ele continua sendo uma importante fonte de nutrientes essenciais e compostos funcionais, a tal ponto que muitas vezes é considerado como “*o melhor produto alimentar do mundo*” (GIAMPIERI et al., 2022; KIELISZEK et al., 2018; LI et al., 2018).

Em vista das suas características nutricionais e funcionais, o pólen de abelha desidratado é recomendado como o melhor suplemento dietético por exibir vários efeitos benéficos a saúde. Seu consumo regular contribui para o bom funcionamento do metabolismo a nível celular, para o fortalecimento de músculos, para regular algumas funções bioquímicas e no combate ao desgaste físico e mental extremo em humanos (LAAROUSSI et al., 2023; LI et al., 2018). Em função de suas propriedades nutracêuticas e funcionais, ele tem sido amplamente utilizado no tratamento e na prevenção de várias patologias, atraindo o interesse de muitos pesquisadores ao redor do mundo. Entre os efeitos benéficos mais relatados destacam-se os cardioprotetores, anti-inflamatórios, anti-cancerígenos e hepatoprotetivos. O pólen de abelha desidratado também tem sido utilizado em dietas para combater problemas de desnutrição e falta de apetite em crianças, e como paliativo dos efeitos adversos de tratamentos quimioterápicos e radioterápicos (LI et al., 2018).

Do ponto de vista de suas propriedades funcionais pesquisas recentes têm sugerido sua utilização como um ingrediente bio(técnico) funcional para enriquecer a qualidade dos produtos em que ele é adicionado, como por exemplo, iogurte, queijo, pão e bebidas fermentadas ou como um aditivo em formulações biomédicas para aplicação em biotintas, biopolímeros, engenharia de tecidos e na formulação de nanopartículas (SANYAL et al., 2023).

O pólen de abelha desidratado é constituído basicamente por carboidratos (40-85%), proteínas (14 – 30%), lipídios (1-10%), fibras além de outros componentes presentes em menor proporção (vitaminas, sais minerais e compostos bioativos). Desta forma, as proteínas são o segundo maior constituinte e sua concentração determina o seu sabor e o seu valor nutricional, sendo também a origem de importantes aminoácidos essenciais livres (GIAMPIERI et al., 2022; LI et al., 2018) além de influenciar em propriedades técnico funcionais como gelatinização, emulsificação e formação de espuma (LAAROUSSI et al., 2023). Em vista dessas características, tem sido sugerido o potencial uso do pólen de abelha desidratado como um suplemente dietético inovador, especialmente para dietas de vegetarianos e de atletas ou como um ingrediente em formulações alimentícias e de aplicação biomédica (GIAMPIERI et al., 2022; LAAROUSSI et al., 2023; SANYAL et al., 2023).

Os teores de proteínas em pólen de abelha desidratado são muito variáveis (2,5 a 62 g/100g) e são influenciados principalmente pela origem botânica como comprovado por vários pesquisadores ao redor do mundo (ANJOS et al., 2017; ARES et al., 2018; COSTA et al., 2017; GIAMPIERI et al., 2022; ISOPESCU et al., 2020; LI et al., 2018; MARTINS et al., 2011; OFORI et al., 2020; THAKUR; NANDA, 2020; WĘGLIŃSKA et al., 2020). As principais frações de proteína consistem de albuminas (35,4%), globulinas (18,9%), glutelinas (18,6%), prolaminas (21,8%) e outras proteínas como enzimas (5,3%) (GIAMPIERI et al., 2022; LI et al., 2018). Portanto, desenvolver novas metodologias para a análise composicional do pólen de abelha desidratado, especialmente com relação ao teor de proteína bruta, que sejam ambientalmente amigáveis e que apresentem características como sensibilidade, rapidez e exatidão é essencial para assegurar a qualidade e segurança alimentar deste, bem como para ampliar sua utilização em diferentes produtos como alimentos, fármacos, cosméticos e produtos biomédicos (GIAMPIERI et al., 2022; KIELISZEK et al., 2018; KOCOT et al., 2018; LAAROUSSI et al., 2023; LI et al., 2018; SANYAL et al., 2023).

Os métodos tradicionalmente adotados para a análise proteínas em alimentos envolvem a determinação de Kjeldahl, a espectrofotometria, o método de combustão, o método do Biureto, o método de Bradford e o método do reagente Folin fenol. Para a análise de proteínas em pólen de abelha desidratado a determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl ou micro Kjeldahl e

posterior conversão a proteínas por um fator específico (6,25 ou 5,60) tem sido as metodologias mais comumente utilizadas como demonstrado por Ares et al. (2018) em extensa revisão da literatura. O método de Kjeldahl é composto por três etapas: digestão a quente com a adição de ácido sulfúrico, catalisadores (sulfato de potássio e sulfato de cobre) a massas em torno de 0,5 a 1,0 g de pólen de abelha desidratado, destilação com solução concentrada de hidróxido de sódio e titulação com ácido clorídrico e ácido bórico. O método de micro Kjeldahl foi adotado por alguns pesquisadores como forma de reduzir o volume de resíduos tóxicos realizando a análise em microescala. Foi também reportada na literatura a utilização do método de combustão com posterior análise elementar de nitrogênio e o método de Bradford que consiste na determinação de proteínas em extratos aquosos de pólen de abelha usando o corante azul brilhante de Coumassie e a espectrofotometria UV-VIS (ARES et al., 2018).

Estas metodologias convencionais de análise de proteínas apresentam alguns inconvenientes como a extensa manipulação do analista, alto custo, elevado consumo de reagentes e de energia, longos tempos de análise, são destrutivas e geram grandes volumes de resíduos tóxicos. Em vista disso, tem sido observado o interesse de vários pesquisadores no desenvolvimento de novas metodologias analíticas que sejam rápidas, não destrutivas e mais ambientalmente amigáveis (ANJOS et al., 2017; ARES et al., 2018; GONÇALVES; SOARES; ROCHA, 2023; SAHA et al., 2023; WANG; CHENG, 2018; ZHOU et al., 2022) atendendo assim aos critérios da Química Analítica Verde (LOCATELLI et al., 2023; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022).

As técnicas espectroscópicas não destrutivas como NIR, FTIR-ATR, Raman combinadas com técnicas quimiométricas já são bem consolidadas nas áreas de pesquisa e/ou ambientes industriais para a análise de proteínas, pois permitem a análise rápida e não destrutiva de várias características químicas de matrizes alimentares complexas bem como de sementes e de grãos (ANJOS et al., 2017; ARES et al., 2018; SAHA et al., 2023). A aplicação destas técnicas espectroscópicas combinadas com ferramentas quimiométricas a análise de proteínas em pólen de abelha desidratado tem sido relatada na literatura (ANJOS et al., 2017; ARES et al., 2018; COSTA et al., 2017; ISOPESCU et al., 2020; WEGLIŃSKA et al., 2020). Outra metodologia que vem ganhando destaque na análise de proteínas é a combinação da Hiper Imagem Espectral combinada com as espectroscopias NIR ou Raman e ferramentas quimiométricas, a qual minimiza alguns dos inconvenientes das técnicas espectroscópicas e tem sido aplicada na análise de proteínas em carne de carneiro, arroz, trigo e soja (SAHA et al., 2023; ZHOU et al., 2022).

Apesar da vasta aplicação das metodologias espectroscópicas sozinhas ou combinadas a Hiper Imagem Espectral e ferramentas quimiométricas na análise de proteínas em alimentos

incluindo o pólen de abelha desidratado, estas exigem instrumentação de alto custo, técnicos especializados, apresentam custo elevado de manutenção do equipamento e normalmente exibem uma modelagem mais complexa para o tratamento dos dados espectrais do que a utilizada quando se faz uso de técnicas de visão de computador que incluem o processamento digital de imagens (DINIZ, 2020; GONÇALVES; SOARES; ROCHA, 2023).

O processamento digital de imagens combinado a técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrões ou de aprendizado de máquina, tem sido considerado uma alternativa simples aos métodos convencionais de análise de alimentos, pois permite extrair e analisar automaticamente informações de amostras e tem se mostrado uma técnica promissora para a eficiente classificação e/ou predição de características químicas e físicas deste tipo de matriz (DINIZ, 2020; WANG; CHENG, 2018;). Outras características interessantes do processamento digital de imagens combinado a ferramentas quimiométricas que o classificam como uma técnica segura e eco amigável são realizar a análise da amostra de forma não invasiva e não destrutiva, apresentar eficiência energética, rápida coleta e processamento de dados, utilizar instrumentação de baixo custo (câmeras fotográficas, escâneres ou celulares e computadores), não exigir técnico especializado para a coleta dos dados, apresentar alta frequência analítica além de permitir a automação das várias etapas da metodologia analítica (MEENU et al., 2021).

Apesar de todas as características interessantes do processamento digital de imagens combinado a ferramentas quimiométricas/aprendizado de máquina e sua vasta aplicação na caracterização e análise de alimentos (MEENU et al., 2021), a classificação e/ou predição de características químicas de pólen de abelha desidratado ainda é tímida e escassa e reportada somente para a classificação de grupos de cor e para a predição do perfil de carotenóides (SALAZAR-GONZÁLEZ et al., 2018, 2020).

Em vista destes fatos, neste trabalho, de forma inédita, foi desenvolvida e validada uma metodologia preditiva para a análise de proteína bruta em pólen de abelha por processamento digital de imagens combinado com a técnica de aprendizado de máquina, Floresta Randômica. Além disso foi realizada também a análise de verdura da metodologia desenvolvida considerando métricas bem estabelecidas na literatura como forma de demonstrar sua aderência aos critérios da Química Analítica Verde e possível aplicação prática em análises de rotina.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Determinação de proteína bruta

Os teores de proteína bruta das amostras de pólen de abelha investigadas nesta tese foram obtidos por Melo Nascimento (2020) no Laboratório de Nutrição Animal (LANA-DZO-UEM) do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, adotando o método de Kjeldahl descrito pela AOAC (PB; AOAC 1990; método número 984.13). Para a conversão dos teores percentuais de nitrogênio (N, %) em % de proteína bruta (PB (%)) foi utilizada a equação: $PB (\%) = (N, \%) \times 6,25$. As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.2. Obtenção e processamento das imagens digitais

Massas em torno de 5,0 g de pólen de abelha desidratado e homogeneizado conforme descrito no Capítulo 2, foram depositadas em um fundo branco, compactadas até obter uma superfície plana e homogênea com espessura de 0,2 cm e diâmetro em torno de 9,0 cm. Para cada amostra, foi gerada uma foto por um smartphone com câmera de 48 megapixels (MP), resolução de 4000×3000 pixels, posicionado horizontalmente sobre a amostra a uma distância de 8,0 cm, sob luz ambiente padronizada com o acoplamento ao smartphone de luz de led Selfie Ring Light de luminosidade White light 7000 k. Posteriormente, as imagens foram salvas na extensão PNG (com resolução espacial de 4000×3000 pixels).

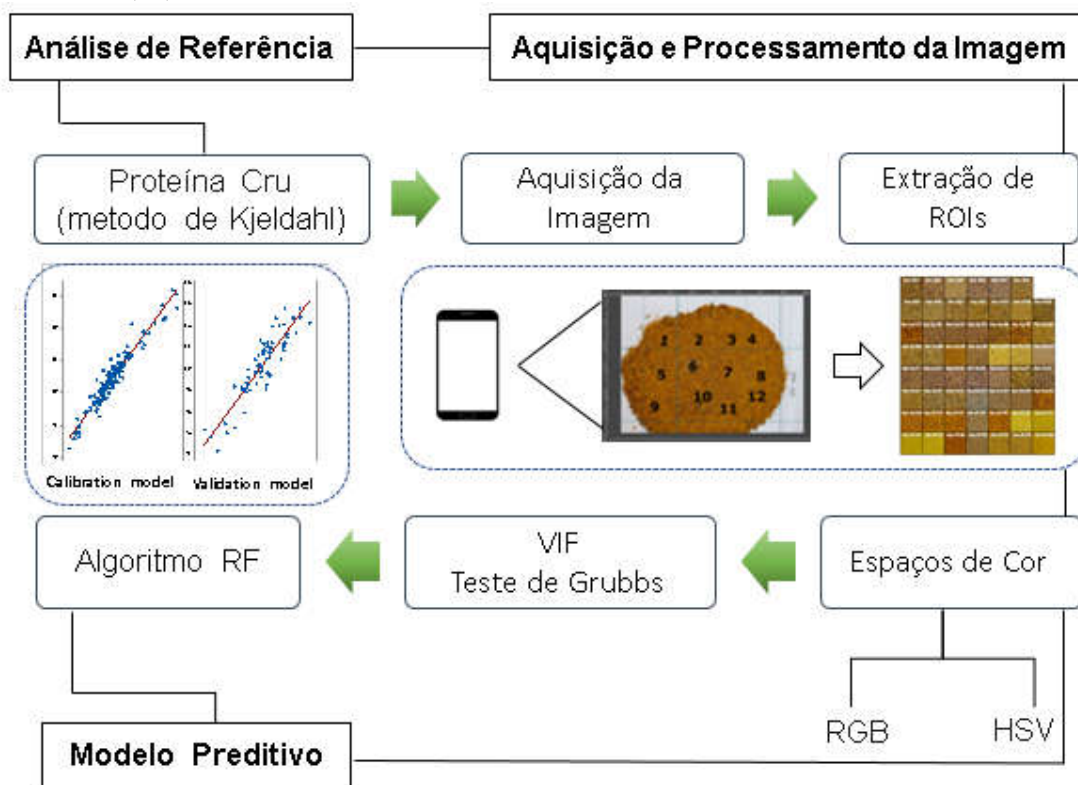
Cada imagem foi dividida em 12 quadrantes (Figura 5.1). A região de interesse (ROI) foi obtida pela realização de um recorte da região de interesse (ROI) na imagem com tamanho de 300×300 pixels, escolhido dentro do quadrante 6, usando o software Gimp[®] v. 2.10.32 sem nenhuma manipulação adicional. Os recortes das imagens digitais de todas as amostras de pólen de abelha são mostrados no Apêndice (Figuras Ap.1 a Ap.5). O recorte da região de interesse (ROI) nas imagens de cada amostra de pólen de abelha foi carregado no software Chemostat[®] v.2 para separar e quantificar as intensidades de cor nos canais RGB (vermelho, verde e azul) e para gerar o histograma de cor. A região de interesse (ROI) de cada amostra de pólen de abelha foi codificada da seguinte forma: espécie de abelha (Am – *Apis mellifera*; Mm – *Melipona marginata*; Mq – *Melipona quadrifasciata*; Sb – *Scaptotrigona bipunctata*; Tc – *Tetragona clavipes*), estação do ano em que foi realizada a coleta (A – outono; Sp – primavera; Su – verão; W – inverno) e número de entrada no laboratório (1 a 244).

Esse procedimento foi adotado com o intuito de se obter a relação entre a matriz de cor, que incluía as intensidades dos canais RGB, o histograma de cor (variável preditora) e os teores

de proteína bruta (variável dependente). Estes dados foram usados para desenvolver o modelo de predição por regressão pela aplicação do algoritmo de aprendizado de máquina *Floresta Randômica* (RF).

Ainda, para minimizar a influência de multicolinearidade nos resultados do modelo de predição por regressão, uma análise do fator de inflação da variância (VIF) foi realizada no programa R, v. 4.2.1. As variáveis (tons de cinza – RGB e do histograma de cor) que apresentaram valores de VIF superiores a 10,0 foram excluídas do conjunto de dados, uma a uma, antes da realização da modelagem pelo algoritmo de máquina, Floresta Randômica. As etapas de processamento digital das imagens e da modelagem preditiva são ilustradas na Figura 5.1.

FIGURA 5.1 - UMA REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ABORDAGEM REALIZADA PARA O PROCESSAMENTO DIGITAL DAS IMAGENS (DIP) E GERAÇÃO DO MODELO PREDITIVO PARA PREDIÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA PELO ALGORITMO DE APRENDIZAGEM DE MÁQUINA, FLORESTA RANDÔMICA (RF)



Fonte: a autora, (2023).

5.2.3. Algoritmo floresta randômica (RF)

O algoritmo de aprendizagem de máquina RF, executado por meio dos pacotes de códigos WEKA v. 3.8.6, foi usado para prever os teores de proteína bruta em amostras de pólen de abelha a partir do processamento digital das imagens. O conjunto de dados foi separado em modelos de calibração (60 % dos dados, $n = 147$) e de validação externa (40 % dos dados, $n = 97$) para as

variáveis definidas previamente pela análise do VIF (B, H e V). Também foi aplicada a validação cruzada ao conjunto de dados usando o método *k-fold* com valor de $k = 10$. A partir desse conjunto de dados de cores selecionado (variáveis B, H e V), o desempenho do modelo de predição foi determinado com base no coeficiente de determinação (R^2) e nos parâmetros de avaliação do modelo preditivo (RMSE (raiz do quadrado médio do erro) e MAE (erro absoluto médio)).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Estimativa dos teores de proteína bruta em pólen de abelha

Os teores médios de proteína bruta, bem como seus erros padrão, intervalos de variação e coeficientes de variação de amostras de pólen coletados por *Apis mellifera* e por abelhas sem ferrão (*Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*) são apresentados na Tabela 5.1. A concentração média para este parâmetro físico-químico apresentou um amplo intervalo de variação entre 9,95 – 46,81 %. Ressalta-se, ainda, que o pólen de abelha é uma fonte primária de proteínas (aminoácidos), sendo necessário ter, no mínimo, 20 % de teor de proteína bruta para atender a dieta das abelhas (STANLEY, R.G. & LINSKENS, 1974).

TABELA 5.1 - TEORES MÉDIOS, ERROS PADRÃO, INTERVALO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA (%) DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Apis mellifera* E ABELHAS SEM FERRÃO COLETADOS ENTRE JUNHO/2018 A MAIO/2019

Dados estatísticos	Proteína Bruta (%)				
	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona marginata</i>	<i>Melipona quadrifasciata</i>	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	<i>Tetragona clavipes</i>
N	55	42	44	57	46
Intervalo	12,93 – 27,82	23,28 – 42,20	15,61 – 46,81	14,16 – 34,28	9,95 – 26,82
Média	21,09	23,28	27,44	21,16	16,63
Erro Padrão	0,51	0,92	1,22	0,49	0,60
Coeficiente de Variação	17,90	27,71	29,54	17,59	24,62

Fonte: a autora, (2023).

Os teores de proteína bruta observados neste trabalho foram mais variáveis do que aqueles determinados por Negrão & Orsi (2018) (19,59 – 22,80 %) e Carpes (2009) (15,04 – 27,69 %), e foram similares aos reportados por De-Melo et al. (2018) (9,8 – 16,7 %), Martins et al. (2011) (12,28 – 18,68 %) e Duarte et al. (2018) (13,28 – 22,43 %). Ressalta-se, ainda, que a maioria das pesquisas reportadas na literatura referem-se ao pólen de abelha coletado pela espécie *Apis*

mellifera, enquanto que estudos sobre a composição química do pólen oriundo de espécies de abelhas sem ferrão, são escassos ou inexistentes, tornando difícil a comparação de resultados. Assim, quando se comparam os teores de proteína bruta das amostras de pólen coletados pela espécie *Apis mellifera*, reportados neste trabalho, (12,93 – 27,82 %) aos dados de Negrão & Orsi (2018), Carpes (2009) e Duarte et al. (2018) é possível observar que há uma sobreposição nos intervalos de variação deste parâmetro físico-químico.

Estes resultados (Tabela 5.1) denotam que os teores de proteína bruta de pólen de abelha podem estar sendo influenciados pela espécie de abelha, uma vez que a coleta das amostras foi realizada no mesmo período e na mesma região produtora. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que a espécie *Apis mellifera* e as abelhas sem ferrão tendem a coletar pólen e néctar de várias plantas de forma a atender as necessidades de sobrevivência individual e das colmeias. Neste processo algumas espécies de abelhas mantêm algumas preferências florais específicas no momento da coleta do pólen e evitam a competição por sítios florais na mesma região produtora (MELO NASCIMENTO, 2020a; NEGRÃO; BARRETO; ORSI, 2014; NEGRÃO; ORSI, 2018; OLIVEIRA-ABREU et al., 2014; WILSON et al., 2021). Esses fatores possivelmente poderiam explicar a ampla variação dos teores de proteína bruta observados nas amostras de pólen de abelha investigadas. Comportamento similar foi observado nos Capítulos 3 e 4 quanto a origem botânica e a coloração das amostras de pólen de abelha.

5.3.2. Predição dos teores de proteína bruta em pólen de abelha por DIP-RF

As amostras de pólen de abelha, coletadas em diferentes estações do ano e advindas de diferentes espécies de abelhas, exibiram uma grande variabilidade de coloração, demonstrando a diversidade intrínseca desse produto, como já descrito no Capítulo 4. A cor do pólen de abelha geralmente apresenta vários tons de coloração incluindo amarelo, branco acinzentado, laranja, avermelhado, esverdeado e azul (KIELISZEK et al., 2018). Essa variação na cor pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo, a flora e o clima da região produtora, a espécie de abelha, a época do ano em que o pólen é produzido e sua composição química (DEVEZA et al., 2015; ESTEVINHO et al., 2012). Salazar-González et al. (2018) relatam, ainda, que há uma tendência de coloração do pólen em função da época de sua colheita.

Assim, o desenvolvimento de um sistema automatizado, de baixo custo adotando o processamento digital de imagens que possa vir a reconhecer as propriedades de coloração do pólen de abelha, pode auxiliar na autenticação e garantia de qualidade do produto, como enfatizado por Borlinghaus, Jung e Odemer, (2023) e Salazar-González et al. (2020).

A cor é o recurso visual mais utilizado em análises de reconhecimento de imagens em produtos alimentícios, devido à grande quantidade de informações que podem ser extraídas dela (ZHANG et al., 2023). Os alimentos podem ser rapidamente identificados pela aquisição de suas imagens, que fornecem informações de cada pixel, por meio de dispositivos eletrônicos, como telefones celulares ou computadores (FAN et al., 2021). As imagens amostrais podem ser usadas para a identificação da qualidade alimentar uma vez que os métodos tradicionais de caracterização de alimentos possuem algumas limitações, como o custo elevado, o que faz com que isso seja um inconveniente para a indústria alimentícia, principalmente quando se possui um número amostral significativamente alto (ZHANG et al., 2023). Desta forma, a aplicação de recursos automatizados de técnicas de aprendizado de máquina combinadas com o processamento digital de imagens, podem possibilitar a obtenção de resultados precisos com um custo relativamente baixo, e conseqüentemente uma maior qualidade alimentar do pólen de abelha, sem que haja a necessidade de tratamento prévio ou aplicação de métodos destrutivos de amostra.

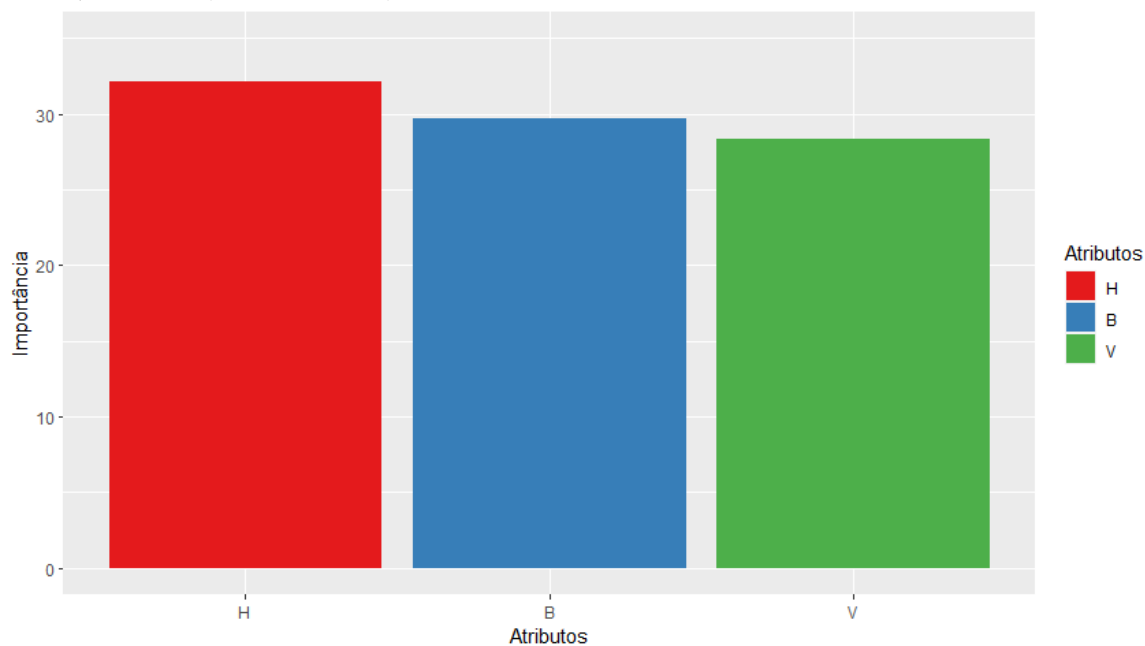
Quando se aplicam técnicas de aprendizado de máquina (AM) em um conjunto de dados é necessário, inicialmente, extrair as características dos dados originais, uma vez que a capacidade preditiva do modelo pode diminuir se as características não forem cuidadosamente selecionadas (KEBONYE; AGYEMAN; BINEY, 2023). Para alcançar esse objetivo, neste trabalho, foram realizados recortes em áreas delimitadas de 300 x 300 pixels (ROI – região de interesse) dentro do quadrante 6 nas imagens digitais das amostras de pólen de abelha para a posterior geração dos respectivos canais RGB e histogramas de cor. Essa estratégia foi utilizada para definir o grupo de características mais informativas nas imagens de pólen de abelha e assim melhorar a eficácia do modelo de regressão para a predição de proteína bruta. A representação dimensional reduzida de um conjunto de dados, consegue manter o máximo possível das informações originais da amostra (ENNAJI; VERGÜTZ; EL ALLALI, 2023) e minimiza também os recursos computacionais necessários.

O histograma de cor gerado a partir da imagem digital fornece geralmente muitas variáveis preditoras e desta forma, torna-se necessário aplicar uma estratégia para a seleção das características mais relevantes para a modelagem. Dentre estas estratégias, pode-se citar a análise do Fator de Inflação da Variância (VIF) que atribui um valor a cada preditor, com o objetivo de indicar o quão útil ou importante este será para a construção do modelo. A adoção de características que apresentem baixos valores de VIF na construção de modelos a partir de técnicas de AM, pode melhorar o seu desempenho devido a remoção de preditores redundantes (AL-AJLAN; EL ALLALI, 2018), permitem a redução do erro com menor probabilidade de super ajuste além de tornar o modelo mais simples (ENNAJI; VERGÜTZ; EL ALLALI, 2023). Considerando-se todas

as características dos histogramas de cor das amostras de pólen de abelha, foram selecionadas como mais relevantes em relação a variável dependente (teor de proteína bruta) aquelas que apresentaram valores de VIF < 10 (características H, V e B) para a aplicação posterior do algoritmo de aprendizado de máquina, Floresta Randômica na geração do modelo preditivo.

A importância das características extraídas das imagens das amostras de pólen de abelha após a sua conversão em histogramas HSV, escala de cinza e RGB e análise do VIF, em relação a variável dependente (teores de proteína bruta) são ilustradas na Figura 5.2. A avaliação da importância destas características indica que as variações de cores mais relevantes para este parâmetro físico-químico (proteína bruta), foram as relacionadas à cromaticidade H (Matiz) e intensidade V (Brilho) do espaço de cor HSV, as quais estão associados ao grau de pureza da cor e ao nível de iluminação (DINIZ, 2020) e ao canal B (Blue) do espaço de cor RGB. O histograma de cores é uma representação comum das informações de cores em imagens e apresenta como vantagem a robustez quanto a rotação e translação da imagem sem que ocorra mudanças na escala, após a sua normalização (HUMEAU-HEURTIER, 2022).

FIGURA 5.2 - HISTOGRAMA DA IMPORTÂNCIA DA VARIÁVEL DEPENDENTE (TEOR DE PROTEÍNA BRUTA) EM RELAÇÃO AOS ESPAÇOS DE COR RGB E HSV



Fonte: a autora, (2023).

As abordagens mais utilizadas no aprendizado de máquina se baseiam em métodos supervisionados ou não supervisionados, dependendo das condições de supervisão do treinamento. Assim, para verificar a relação entre a variação da coloração das amostras de pólen de abelha de *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão obtidas com os teores de proteína bruta, um modelo

preditivo foi gerado a partir do processamento digital das imagens (DIP) combinado com um método supervisionado, o algoritmo de aprendizado de máquina, Floresta Randômica (RF).

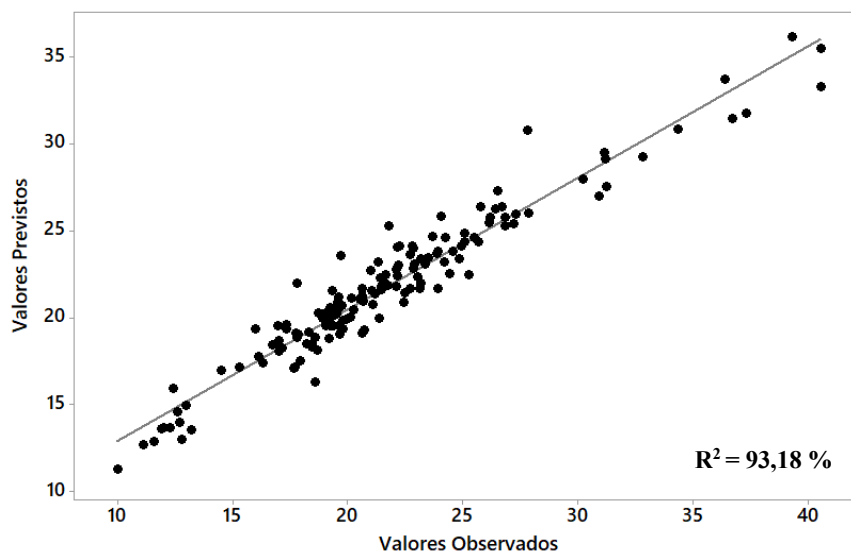
O algoritmo Floresta Randômica é um modelo de aprendizado conjunto baseado em árvores de decisão (DT), assim uma entrada de dados é mapeada para que haja uma saída, visando relacionar um conjunto de dados de treinamento. No caso da regressão, a saída é um valor, enquanto que para a classificação, a saída é uma classe (BREIMAN, 2001; VENKATARAJU et al., 2023). É amplamente utilizado para fins de predição e de classificação e consiste em uma sequência de árvores de decisão, em que suas previsões de resultados são combinadas para gerar um melhor desempenho preditivo e/ou classificatório (ENNAJI; VERGÜTZ; EL ALLALI, 2023).

Para a elaboração do modelo de predição dos teores de proteína bruta em pólen de diferentes espécies de abelha a partir do processamento digital de imagens (DIP), os dados foram divididos em conjuntos de treinamento/calibração (60%) e de teste/validação (40%). Esta estratégia foi adotada considerando que modelos de predição baseados apenas em conjuntos de treinamento/calibração podem gerar alta precisão devido às características específicas das amostras do conjunto de calibração e tornar o modelo muito específico de modo que, quando aplicado a novos dados, este não tenha um bom desempenho preditivo (MASEKO et al., 2022).

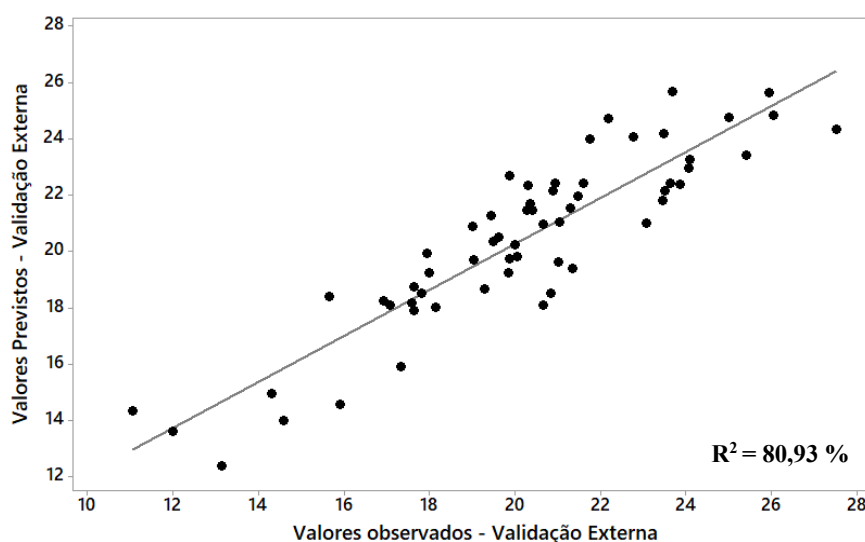
A partir da aplicação do modelo de predição para os conjuntos de treinamento/calibração e de teste/validação uma regressão linear foi realizada para relacionar os valores previstos e os valores observados da variável dependente (teores de proteína bruta) pela variável independente (coloração do pólen de abelha), em que foi possível obter um coeficiente de determinação (R^2) de 93,18 % para o conjunto de treinamento/calibração e, de 80,93 % para o conjunto de teste/validação (Figura 5.3).

Considerando-se os parâmetros de desempenho para os conjuntos de treinamento/calibração e de teste/validação do modelo preditivo gerado, baixos valores de RSME (1,80 % e 1,49 %) e de MAE (1,34% e 1,26 %), respectivamente, foram alcançados pela aplicação do algoritmo de aprendizagem de máquina Floresta Randômica (RF). Estes resultados demonstram que o modelo é robusto pois pode ser aplicado a amostras de pólen de diferentes espécies de abelhas, em uma faixa ampla de concentração de teores de proteína bruta apresentando um bom desempenho e capacidade preditiva, especialmente quando suas figuras de mérito são comparadas as reportadas na literatura por outros estudos.

FIGURA 5.3 - GRÁFICO DA CORRELAÇÃO DOS VALORES PREVISTOS E OBSERVADOS EM RELAÇÃO AOS TEORES DE PROTEÍNA BRUTA DAS AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA



(a)



(b)

Fonte: a autora, (2023).

Atualmente, observa-se um número muito expressivo de aplicações de modelos de classificação e/ou predição destinados a garantia da segurança e qualidade de alimentos (MEENU et al., 2021). Porém, ainda são escassos os estudos que fazem uso das técnicas de aprendizado de máquina e/ou quimiométricas para prever e/ou classificar os principais componentes do pólen. Dentre os trabalhos reportados na literatura, observa-se um maior número de pesquisas que aplicaram as técnicas espectroscópicas ou de Hiper Imagem Espectral combinadas com ferramentas quimiométricas/aprendizado de máquina em comparação aos estudos que empregaram o processamento digital de imagens associados as técnicas quimiométricas/aprendizado de máquina. González-Martín et al. (2007), exploraram o uso da tecnologia NIRS em conjunto com uma sonda de fibra óptica de refletância remota para prever os

teores de proteína bruta no pólen de abelha empregando o método de regressão de mínimos quadrados parciais modificados (MPLS). Os autores avaliaram a capacidade de predição do modelo com uma validação externa, em que os coeficientes de correlação múltipla (RSQ) e erros padrão corrigidos de previsão (SEPC) foram de 0,91 e 0,56 % para os teores de proteína bruta, respectivamente. Chica & Campoy (2012), utilizaram um sistema baseado nas propriedades de cor de pólen de abelha para rejeitar amostras de pólen desconhecidas usando o processamento digital de imagens e técnicas de classificação. O método foi validado pela autenticação dos tipos polínicos espanhóis mais comuns, *Cistus ladanifer*, *Rubus*, *Echium* e *Quercus ilex*, em relação aos tipos polínicos não espanhóis, sendo a acurácia global do modelo de 94 %. Salazar-González et al. (2018), desenvolveram métodos de processamento de dados de imagens para classificar o pólen de abelha como ingrediente na indústria de alimentos. Os autores calcularam a porcentagem de sete grupos de cores em todas as amostras correlacionando estes dados ao mês de coleta e a granulometria do pólen. Salazar-González et al. (2020), avaliaram a correlação entre as coordenadas colorimétricas e a composição de carotenoides no pólen de abelha colombiano a partir de parâmetros de análise de imagens. As correlações foram realizadas utilizando a regressão linear múltipla (MLR), na qual os autores observaram que dos doze carotenoides encontrados nas amostras, seis apresentaram coeficientes de determinação (R^2) > 75,0 %.

5.3.3. Avaliação do impacto ambiental (Verdura) da metodologia de DIP-RF

Para a análise de proteínas em diferentes alimentos, incluindo o pólen de abelha, normalmente se faz uso do método de Kjeldahl o qual é considerado um método de referência. Do ponto de vista da Química Analítica Verde, este método não é considerado ambientalmente amigável pois envolve várias operações analíticas (pesagem, digestão, destilação e titulação), é demorado, faz uso de grandes volumes/quantidades de reagentes tóxicos, altas temperaturas, elevado consumo de energia e oferece menor segurança ao analista (SAHA et al., 2023). Estes fatos impõem um desafio aos químicos analíticos engajados no desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de novas metodologias mais ambientalmente amigáveis para a análise de proteínas e que atendam aos critérios estabelecidos pela Química Analítica Verde.

Recentemente, tem sido observado um crescente interesse na literatura para o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos, não destrutivos, de baixo custo e mais ambientalmente amigáveis que possam ser aplicados no controle de qualidade de alimentos (ANCONI; BRITO; NUNES, 2022; BALLESTEROS-VIVAS et al., 2021; GOMES et al., 2023; SALAZAR-GONZÁLEZ et al., 2020; SILVA FERNANDES et al., 2023). Dentre estes, a combinação do processamento digital de imagens e de algoritmos de aprendizado de máquina,

como DIP-RF para a análise de proteína bruta em pólen de abelha é uma alternativa interessante. Esse tipo de metodologia apresenta características verdes como não destruir a amostra durante a análise, não fazer uso de reagentes e solventes tóxicos, menor consumo de energia e maior segurança ao analista, elevada precisão, baixo custo além de permitir a integração/automação entre as diferentes etapas do método (SAHA et al., 2023).

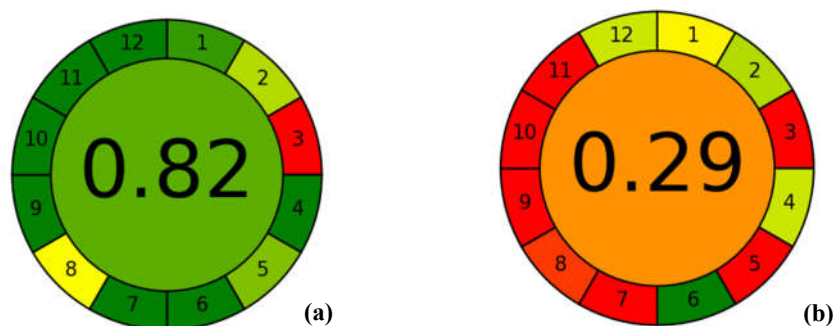
Para avaliar o impacto ambiental de uma metodologia analítica é preciso fazer uso de métricas de verdura como forma de avaliar os pontos fortes e fracos de cada procedimento analítico avaliado. Na literatura podem ser encontradas várias métricas tais como NEMI, RGB, GAPI e AGREE. Dentre essas, a métrica gerada pelo software AGREE mostra vantagens em relação as demais pois foi criada considerando os 12 princípios da Química Analítica Verde, além de mostrar maior flexibilidade, facilidade de interpretação e aplicação, uso de software de licença livre, entre outras (LOCATELLI et al., 2023; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022).

A métrica AGREE consiste na criação de um pictograma com dois círculos. No círculo externo são apresentados os números 1 a 12 que correspondem aos doze princípios da Química Analítica Verde. A extensão e a coloração de cada um destes doze espaços correspondem aos pesos aplicados (padrão ou ajustados pelo analista) e o grau de aderência de cada um (variando do verde escuro (melhor aderência) ao vermelho (pior aderência)). Dentro do círculo interno é apresentado o índice global de verdura da metodologia avaliada, que varia entre 0 a 1 e com coloração que varia do verde escuro (mais ambientalmente amigável) ao vermelho (menos ambientalmente amigável) (PENA-PEREIRA et al., 2022).

Neste trabalho, as métricas de verdura geradas pelo software AGREE, em forma de pictogramas, para a metodologia analítica desenvolvida para a determinação de proteína bruta em pólen de abelha por DIP-RF foram comparadas as obtidas para a metodologia de referência (Método de Kjeldahl) (Figura 5.4).

A análise dos pictogramas da metodologia de DIP-RF (Figura 5.4-a) mostrou um índice global de 0,82, o que indica que esta metodologia pode ser considerada verde, isto é, ambientalmente amigável, especialmente quando comparada com o método de referência de Kjeldahl que apresentou um índice global de 0,29 (Figura 5.4-b).

FIGURA 5.4 - RESULTADOS DAS MÉTRICAS DE VERDURA OBTIDAS PELO SOFTWARE AGREE PARA AS METODOLOGIAS: (A) DIP-RF E (B) KJELDAHL APLICADAS NA ANÁLISE DE PROTEÍNA BRUTA EM PÓLEN DE ABELHA



Fonte: a autora, (2023).

Os pontos fortes da metodologia DIP-RF (Figura 5.4-a) são vistos na melhor aderência aos critérios 1,2 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 e 12 da Química Analítica Verde (PENA-PEREIRA et al., 2022). Portanto, os aspectos da metodologia DIP-RF que a tornam uma metodologia mais ambientalmente amigável podem ser destacados como a utilização de preparo de amostra mínimo (critério 1), uso de quantidade mínima de amostra (critério 2), não utilização de reagentes tóxicos e o uso mínimo de energia (critérios 4, 9, 10 e 11), utilização de softwares para aquisição e processamento das imagens digitais e para a modelagem do conjunto de dados (critério 5), não utilização de reações de derivatização (critério 6), sem geração de resíduos tóxicos (critério 7) e maior segurança ao analista (critério 12).

Os pontos fortes da metodologia de Kjeldahl são ilustrados pela aderência aos critérios 2, 4, 6 e 12 (Figura 5.4-b). Os pontos que mostram melhor aspecto verde foram o uso de quantidade mínima de amostra (critério 2), número de etapas envolvidas na metodologia (critério 4), não utilização de reações de derivatização (critério 6) e considerando que os reagentes empregados mostraram somente dois riscos ao ambiente e aos seres humanos (corrosividade e nocividade a vida aquática) (critério 12). A menor aderência dos demais critérios (1, 3, 5, 7, 9, 10 e 11) é explicada pelo uso de grandes volumes/massas de reagentes tóxicos e de fontes não renováveis, aquecimento prolongado durante a etapa de digestão com consumo expressivo de energia, geração de grandes volumes de resíduos tóxicos e menor segurança ao analista (GONÇALVES; SOARES; ROCHA, 2023). Em vista disso, é possível concluir que a metodologia DIP-RF desenvolvida e validada neste trabalho para a análise de proteína bruta em pólen de abelha tem um menor impacto ambiental, sendo mais verde e ambientalmente amigável do que o método tradicionalmente empregado e assim, poderia ser adotada na análise de rotina em laboratórios industriais e de controle de qualidade.

5.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista disso, uma nova metodologia foi desenvolvida e validada para a determinação de proteína bruta em amostras de pólen de abelha empregando a combinação do processamento digital de imagens e o algoritmo de aprendizado de máquina, Floresta Randômica. O bom desempenho e capacidade preditiva desta metodologia, aliado as suas características ambientalmente amigáveis como o uso de instrumentação de baixo custo (celular smartphone e computador), rapidez, não utilização de reagentes e solventes tóxicos e maior segurança ao analista demonstram sua robustez e potencial para aplicação em análises de rotina no controle de qualidade do pólen de abelha. Esses dados demonstram também o potencial de aplicação do processamento digital de imagens combinado a técnicas quimiométricas/aprendizado de máquina no controle de qualidade de produtos derivados da apicultura e da meliponicultura.

5.5. REFERÊNCIAS

- AL-AJLAN, A.; EL ALLALI, A. Feature selection for gene prediction in metagenomic fragments. **BioData Mining**, v. 11, n. 1, p. 9, dez. 2018.
- ALEIXO, K. P. et al. Seasonal availability of floral resources and ambient temperature shape stingless bee foraging behavior (*Scaptotrigona aff. depilis*). **Apidologie**, v. 48, n. 1, p. 117–127, 2017.
- ANCONI, A. C. S. A.; BRITO, N. C. S.; NUNES, C. A. Determination of peroxide value in edible oils based on Digital Image Colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 113, p. 104724, out. 2022.
- ANJOS, O. et al. Application of FTIR-ATR spectroscopy on the bee pollen characterization. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 3, p. 210–218, 2017.
- ARES, A. M. et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 110–124, 2018.
- ARES, A. M. . et al. Differentiation of bee pollen samples according to the apiary of origin and harvesting period.pdf. **Food Bioscience**, v. 50, p. 8, 2022.
- ARRUDA, V. A. S. et al. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 2, p. 100–105, 2013.
- ASKAR, M. et al. Comparison of soil quality indexes calculated by network and principal component analysis for carbonated soils under different uses. **Ecological Indicators**, v. 17, p. 2054–2061, 2021.

- BALLESTEROS-VIVAS, D. et al. Green food analysis: Current trends and perspectives. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 31, p. 100522, out. 2021.
- BÁRBARA, M. F. S. et al. Caracterizações microbiológica e físico-química de pólen armazenados por abelhas sem ferrão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 0, p. 1–9, 2018.
- BARTH, O. M. et al. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: A proposal for technical standardization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 893–902, 2010.
- BARTH, O. M.; DE FREITAS, A. DA S.; VANDERBORGHT, B. Pollen preference of stingless bees (*Melipona rufiventris* and *M. quadrifasciata anthidioides*) inside an urban tropical forest at Rio de Janeiro city. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1005–1010, 2020.
- BILISIK, A. et al. Seasonal variation of collected pollen loads of honeybees (*Apis mellifera L. anatoliaca*). **Grana**, v. 47, n. 1, p. 70–77, 2008.
- BORCHARDT, K. E. et al. Plant–pollinator conservation from the perspective of systems-ecology. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47, p. 154–161, 2021.
- BORLINGHAUS, P.; JUNG, J.; ODEMER, R. Introducing Pollenzyzer: An app for automatic determination of colour diversity for corbicular pollen loads. **Smart Agricultural Technology**, v. 5, p. 100263, out. 2023.
- BREIMAN, L. Random forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, out. 2001.
- BRODSCHNEIDER, R. et al. A citizen science supported study on seasonal diversity and monoflorality of pollen collected by honey bees in Austria. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- CALDAS, F. R. L. et al. Composição química, atividade antiradicalar e antimicrobiana do pólen apícola de Fabaceae. **Quimica Nova**, v. 42, n. 1, p. 49–56, 2019.
- CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660–1664, 2008.
- CARPES, S. T. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 03, p. 220–229, out. 2009.
- CASTIGLIONI, S. et al. Spectroscopic Properties of Bee Pollen Loads from Different Botanical Origin. **Molecules**, v. 24, n. 3874, p. 1–13, 2019.
- CASTIGLIONI, S. et al. Characterisation of Bee Pollen from the Marche Region (Italy) According to the Botanical and Geographical Origin with Analysis of Antioxidant Activity and Colour , Using a Chemometric Approach. **Molecules**, v. 27, p. 1–14, 2022.

CHAMORRO, F. J. et al. Botanical origin and geographic differentiation of bee-pollen produced in high mountains from the Colombian eastern Andes. **Grana**, v. 56, n. 5, p. 386–397, 2017.

CHICA, M.; CAMPOY, P. Discernment of bee pollen loads using computer vision and one-class classification techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 112, n. 1-2, p. 50–59, 2012.

COSTA, M. C. A. et al. Analysis of bee pollen constituents from different Brazilian regions: Quantification by NIR spectroscopy and PLS regression. **Lwt**, v. 80, p. 76–83, 2017.

DE-MELO, A. A. M. et al. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **Lwt**, v. 65, p. 808–815, 2016.

DE-MELO, A. A. M. et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. **Food Bioscience**, v. 25, n. August, p. 91–110, 2018.

DEVEZA, M. V. et al. Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1171–1176, 2015.

DIMOU, M.; THRASYVOULOU, A. Seasonal variation in vegetation and pollen collected by honeybees in Thessaloniki, Greece. **Grana**, v. 46, n. 4, p. 292–299, 2007.

DINIZ, M. E. DOS R.; BUSCHINI, M. L. T. Pollen analysis and interaction networks of floral visitor bees of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), in Atlantic Forest areas in southern Brazil. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 9, n. 6, p. 623–632, 2015.

DINIZ, P. H. G. D. Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems. **Journal of Chemometrics**, v. 34, n. 12, dez. 2020.

DUARTE, A. W. F. et al. Honey and bee pollen produced by meliponini (Apidae) in alagoas, brazil: Multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 38, n. 3, p. 493–503, 2018.

DUARTE, R. S.; SOUZA, J.; SOARES, A. E. E. Nest architecture of *Tetragona clavipes* (Fabricius) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 813–818, 2016.

ENNAJI, O.; VERGÜTZ, L.; EL ALLALI, A. Machine learning in nutrient management: A review. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v. 9, p. 1–11, set. 2023.

ESTEVINHO, L. M. et al. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 429–435, 2012.

FAN, Y. et al. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, p. 108829, fev. 2021.

GIAMPIERI, F. et al. Bee Products : An Emblematic Example of Underutilized Sources of

Bioactive Compounds. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 6833–6848, 2022.

GOMES, A. DE A. et al. Pattern recognition techniques in food quality and authenticity: A guide on how to process multivariate data in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 164, p. 117105, jul. 2023.

GONÇALVES, I. C.; SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Exploiting microdistillation and smartphone-based digital-image colorimetry for determination of protein in foods. **Microchemical Journal**, v. 188, n. 108458, 2023.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 998–1003, maio 2007.

GUPTA, J. K.; SHARMA, R.; OJHA, K. N. Bee pollen as a hive product and potentials of its use in human diet. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, v. 1, n. 1, p. 39–48, 2011.

HEVEY, D. Network analysis: A brief overview and tutorial. **Health Psychology and Behavioral Medicine**, v. 6, n. 1, p. 301–328, 2018.

HILÁRIO, S. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Pollen foraging in colonies of *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponini): Effects of season, colony size and queen number. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 664–671, 2009.

HRNCIR, M. et al. Stingless bees and their adaptations to extreme environments. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 205, n. 3, p. 415–426, 2019.

HUANG, H. et al. Protective effect of *Schisandra chinensis* bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 1765–1776, 2017.

HUMEAU-HEURTIER, A. Color Texture Analysis: A Survey. **IEEE Access**, v. 10, p. 107993–108003, 2022.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; RAMALHO, M. Pollen Harvest By Eusocial Bees In A Non-Natural Community In Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 5, n. 2, p. 239–242, 1989.

ISOPESCU, R. D. et al. Romanian bee pollen classification and property modelling. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 443–451, 2020.

KEBONYE, N. M.; AGYEMAN, P. C.; BINEY, J. K. M. Optimized modelling of countrywide soil organic carbon levels via an interpretable decision tree. **Smart Agricultural Technology**, v. 3, p. 100106, fev. 2023.

KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 170–180, 2018.

KLEINERT, A. D. M. P.; GIANNINI, T. C. Generalist bee species on Brazilian bee-plant interaction networks. **Psyche (London)**, v. 2012, p. 7, 2012.

KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Aspects of the Trophic Niche of *Melipona Marginata Marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, v. 18, n. 1, p. 69–100, 1987.

KOCOT, J. et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 7074209, p. 29, 2018.

LAAROUSSI, H. et al. Unveiling the techno-functional and bioactive properties of bee pollen as an added-value food ingredient. **Food Chemistry**, v. 405, n. November 2022, p. 12, 2023.

LANDER, T. Network modelling, citizen science and targeted interventions to predict, monitor and reverse bee decline. **Plants People Planet**, v. 2, p. 111–120, 2020.

LANDI, P. et al. Complexity and stability of ecological networks: a review of the theory. **Population Ecology**, v. 60, p. 319–345, 2018.

LI, Q. Q. et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. **Journal of Functional Foods**, v. 49, n. August, p. 472–484, 2018.

LOCATELLI, M. et al. Green profile tools: Current status and future perspectives. **Advances in Sample Preparation**, v. 6, p. 100068, maio 2023.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v. 51, n. 3, p. 125–138, 1970.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v. 59, n. 4, p. 139–157, 1978.

LU, P. et al. NMR and HPLC profiling of bee pollen products from different countries. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, n. 100119, p. 12, 2022.

MAIA-SILVA, C. et al. Environmental windows for foraging activity in stingless bees, *Melipona subnitida* Ducke and *Melipona quadrifasciata* lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 378–385, 2014.

MAILULA, M. T.; NOFEMELA, R. S. Botanical origin of pollen collected by *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) in a suburb of Pretoria, South Africa. **African Entomology**, v. 25, n. 2, p. 417–427, 2017.

MARTINS, M. C. T. et al. Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states. **Journal of Apicultural Science**, v. 55, n. 2, p. 107–116, 2011.

- MARTINS, M. C. T.; MORGANO, M. A.; VICENTE, E.; BAGGIO, S. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states. **Journal of Apicultural Science**, v. 55, p. 107, 2011.
- MARTÍN-SANZ, J. P. et al. Comparison of soil quality indexes calculated by network and principal component analysis for carbonated soils under different uses. **Ecological Indicators**, v. 143, n. July, p. 1 – 14, 2022.
- MASEKO, K. H. et al. Discrimination of Musa banana genomic and sub-genomic groups based on multi-elemental fingerprints and chemometrics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, p. 104334, mar. 2022.
- MATTOS, I. M.; SOUZA, J.; SOARES, A. E. E. Analysis of the effects of climate variables on *Apis mellifera* pollen foraging performance. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1301–1308, 2018.
- MELO NASCIMENTO, J. E. **Caracterização botânica e físico-química do mel e pólen dos meliponíneos e pólen da *Apis***. [s.l.] UEM - Universidade Estadual de Maringá, 2020.
- MONTERO, I.; TORMO, R. Análisis polínico de mieles de cuatro zonas montañosas de Extremadura. **Anales de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española**, v. 5, p. 71–78, 1990.
- MORGANO, M. A. et al. A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: Geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 727–736, 2012.
- MOURA, M. E. K. DE et al. Influence of some abiotic factors on the flight activity of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) in Southern Brazil. **Journal of Apicultural Research**, p. 7, 2022.
- NASCIMENTO, J. E. M. et al. Temporal variation in production and nutritional value of pollen used in the diet of *Apis mellifera* L. in a seasonal semideciduous forest. **Sociobiology**, v. 66, n. 2, p. 263–273, 2019.
- NEGRÃO, A. F.; BARRETO, L. M. R. C.; ORSI, R. O. Influence of the collection season on production, size, and chemical composition of bee pollen produced by *Apis mellifera* L. **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 5–10, 2014.
- NEGRÃO, A. F.; ORSI, R. DE O. Harvesting season and botanical origin interferes in production and nutritional composition of bee pollen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 325–332, 2018.
- NOVAIS, J. S. DE; LIMA, L. C. L. E.; SANTOS, F. DE A. R. DOS. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera* L. in a semi-arid area from Bahia, Brazil. **Grana**, v. 48, n. 3, p. 224–234, 2009.
- OFORI, D. A. et al. Coletor de pólen para abelhas sem ferrão. **Molecules**, v. 2, n. 1, p. 1–12,

2020.

OLIVEIRA-ABREU, C. et al. Pollen and nectar foraging by *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in natural habitat. **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 441–448, 2014.

PENA-PEREIRA, F. et al. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, p. 100025, ago. 2022.

RAMALHO, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 37–47, 2004.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 469–488, 1990.

RAMÍREZ-ARRIAGA, E. et al. Análisis palinológico de mieles y cargas de polen de *Apis Mellifera* (Apidae) de la Región Centro y Norte del Estado de Guerrero, México. **Botanical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 141–156, 2016.

REBELO, K. S. et al. Nutritional composition and bioactive compounds of *Melipona seminigra* pot-pollen from Amazonas, Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 12, p. 4907–4915, 2021.

RODRIGUES DE S., B. et al. Physicochemical parameters and content of b-complex vitamins: An exploratory study of bee pollen from southern Brazilian states. **Revista Chilena de Nutricion**, v. 45, n. 3, p. 232–242, 2018.

ROZMAN, A. S. et al. A Comprehensive Review of Stingless Bee Products: Phytochemical Composition and Beneficial Properties of Honey, Propolis, and Pollen. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 13, 2022.

SAHA, D. et al. Application of near-infrared hyperspectral imaging coupled with chemometrics for rapid and non-destructive prediction of protein content in single chickpea seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 115, p. 104938, jan. 2023.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, p. 123046, fev. 2022.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C. Y. et al. Analysis of Multifloral Bee Pollen Pellets by Advanced Digital Imaging Applied to Functional Food Ingredients. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 328–335, dez. 2018.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C. Y. et al. Carotenoid profile determination of bee pollen by advanced digital image analysis. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 175, p. 105601, ago. 2020.

SANYAL, A. et al. Revolutionizing the Use of Honeybee Products in Healthcare : A Focused Review on Using Bee Pollen as a Potential Adjunct Material for Biomaterial Functionalization. **Functional Biomaterials**, v. 14, n. 352, p. 30, 2023.

SILVA, C. I. DA et al. **Guia ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil**. 1. ed. São Paulo - SP: Ministério do meio ambiente, 2014.

SILVA FERNANDES, J. et al. Tea authentication and determination of chemical constituents using digital image-based fingerprint signatures and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 421, p. 136164, set. 2023.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507–511, 2006.

SIPOS, L. et al. Classification of bee pollen and prediction of sensory and colorimetric attributes—a sensometric fusion approach by e-nose, e-tongue and nir. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 23, p. 1–22, 2020.

STANLEY, R.G. & LINSKENS, H. F. **Pollen Biology Biochemistry Management**. Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1974.

STRAUMITE, E. et al. Physical and Microbiological Characteristics and Antioxidant Activity of Honey Bee Pollen. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 6, 2022.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, p. 82–106, 2020.

VENKATARAJU, A. et al. A review of machine learning techniques for identifying weeds in corn. **Smart Agricultural Technology**, v. 3, p. 100102, fev. 2023.

VIT, P. et al. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande , Amazonas State , Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 78–84, 2016.

WANG, J. et al. A term function-aware keyword citation network method for science mapping analysis. **Information Processing and Management**, v. 60, p. 1–18, 2023.

WANG, Y.; CHENG, J. Rapid and Non-destructive Prediction of Protein Content in Peanut Varieties Using Near-infrared Hyperspectral Imaging Method. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 40–43, 2018.

WĘGLIŃSKA, M. et al. Determination of nutritional parameters of bee pollen by Raman and infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 212, n. November 2019, 2020.

WILMS, W.; WIECHERS, B. Floral resource partitioning between native *Melipona* bees and the introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rain forest. **Apidologie**, v. 28, n. 6, p.

339–355, 1997.

WILSON, R. S. et al. Many small rather than few large sources identified in long-term bee pollen diets in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 310, p. 8, 2021.

YANG, K. et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 708–718, 2013.

ZHANG, Y. et al. Deep learning in food category recognition. **Information Fusion**, v. 98, p. 101859, out. 2023.

ZHOU, M. et al. Machine learning modeling and prediction of peanut protein content based on spectral images and stoichiometry. **Lwt**, v. 169, n. 114015, p. 10, 2022.

6. CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

Os resultados desta tese mostraram uma contribuição relevante para a caracterização botânica e composicional de pólen de *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão. Esta contribuição foi representada pelo desenvolvimento de uma metodologia mais ambientalmente amigável para a predição quimiométrica dos teores de proteína bruta, bem como a elucidação dos fatores mais significativos para a caracterização da composição botânica bem como da coloração instrumental do pólen de abelha que tem grande potencial para uso humano e industrial.

A adoção de ferramentas quimiométricas combinadas a algoritmos de aprendizado de máquina e de processamento digital de imagens agregam à química analítica importantes contribuições no desenvolvimento de metodologias analíticas com caráter mais ambientalmente amigável além de fornecerem aos produtores de pólen alternativas de caracterização da composição nutricional do pólen de abelha de baixo custo e alta frequência analítica.

Estudos que priorizem a análise dos fatores que influenciam na origem botânica e na coloração de pólen de abelha, como os realizados nesta tese, utilizando diferentes técnicas estatísticas como a Análise de Rede, Modelos Lineares Generalizados e ANOVA de fatores aninhados, são essenciais e imprescindíveis. Estes são determinantes para a caracterização das melhores práticas de manejo das diferentes espécies de abelhas de acordo com as características de flora e de clima da região produtora. Além disso, propiciam informações importantes a agricultura familiar, possibilitando aumentar a produção e a disponibilidade do pólen de abelha para uso comercial e industrial, além de tornar mais acessível ao consumidor um produto de alta qualidade e funcionalidade nas mais diversas linhas em que se aplica, como alimentar, cosmética e farmacológica.

ANEXOS

TABELA An.1 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA REALIZADA POR MELO NASCIMENTO (2020) EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA COLETADOS POR *Apis mellifera* NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO. (CONTINUA)

Tipos Polínicos		Inverno (Jun/Jul/Ago)	Primavera (Set/Out/Nov)	Verão (Dez/Jan/Fev)	Outono (Mar/Abr/Mai)
Família	Espécie				
Amaranthaceae	<i>Alternanthera tenella</i>				PIO
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i>			PIO	
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolia</i>		PIO		PIO
Apocynaceae	<i>Aspidosperma olivaceum</i>		PIO		
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana catharinensis</i>		PIO		
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i>		PA		PIO
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	PII	PA	PA (Dez) / PII (Fev)	PIO (Mar) / PII (Abr) / PA (Mai)
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	PIO	PA (Nov) / PIO (Out)	PII	PIO
Asteraceae	<i>Cosmos sulphureus</i>			PIO	
Asteraceae	<i>Emilia sonchifolia</i>	PII	PIO		
Asteraceae	<i>Galinsoga parviflora</i>		PA		
Asteraceae	<i>Mikania glomerata</i>	PIO	PIO		
Asteraceae	<i>Sonchus oleraceus</i>			PIO	
Asteraceae	<i>Tridax procumbens</i>			PIO	PII
Asteraceae	<i>Vernonanthura polyanthes</i>			PIO	
Bombacaceae	<i>Ceiba speciosa</i>			PIO	PIO
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	PIO (Jun) / PD (Jul/Ago)	PA (Set) / PIO (Out)		PA (Mar/Mai) / PIO (Abr)
Cannabaceae	<i>Celtis iguanaea</i>				PIO
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>		PIO		PIO (Mar) / PA (Mai)
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>		PII		
Euphorbiaceae	<i>Croton floribundus</i>		PIO		
Fabaceae	<i>Albizia niopoides</i>		PIO	PII (Dez) / PIO (Jan)	
Fabaceae	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>		PIO	PD (Dez/Jan) / PA (Fev)	PA
Fabaceae	<i>Senegalia velutina</i>			PIO	
Fabaceae	<i>Mimosa misera</i>				PIO
Fabaceae	<i>Senna alata</i>				PIO
Fabaceae	<i>Senna sp</i>				PIO
Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>		PIO (Set/Out) / PII (Nov)	PIO	PIO
Fabaceae	<i>Mimosa pigra</i>	PD			PD (Abr) / PII (Mai)
Fabaceae	<i>Schizolobium parahyba</i>	PII	PII (Set) / PIO (Out)		
Fabaceae	<i>Stylosanthes viscosa</i>	PIO			PIO
Lamiaceae	<i>Mesosphaerum sidifolium</i>				PIO
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>		PII		PIO
Malvaceae	<i>Heliocarpus popayanensis</i>	PII			
Moringaceae	<i>Moringa oleifera</i>		PIO		
Myrtaceae	<i>Callistemon citrinus</i>			PIO	OIP
Myrtaceae	<i>Eucalyptus robusta</i>	PIO (Jun) / PA (Jul)	PII (Set/Nov) / PIO (Out)	PD	PA (Mar/Mai) / PII (Abr)
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	PA		PA	
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	PIO	PIO (Set) / PA (Out) / PII (Nov)		

TABELA An.1 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA REALIZADA POR MELO NASCIMENTO (2020) EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA COLETADOS POR *Apis mellifera* NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO (Conclusão)

Tipos Polínicos		Inverno (Jun/Jul/Ago)	Primavera (Set/Out/Nov)	Verão (Dez/Jan/Fev)	Outono (Mar/Abr/Mai)
Família	Espécie				
Poaceae	<i>Zea mays</i>	PIO	PII	PIO (Dez) / PII (Jan/Fev)	PII (Mar) / PIO (Abr/Mai)
Phytolaccaceae	<i>Gallesia integrifolia</i>				
Rhamnaceae	<i>Hovenia dulcis</i>			PIO	
Rubiaceae	<i>Richardia brasiliensis</i>		PIO		
Sapindaceae	<i>Serjania laruotteana</i>				PIO
Urticaceae	<i>Cecropia pachystachya</i>			PIO	

PD = pólen dominante (frequências > 45 %; PA = pólen acessório (frequências entre 15 e 45 %); PII = pólen isolado importante (frequências entre 3 e 15 %); PIO = pólen isolado ocasional (frequências < 3,0 %); Jan = Janeiro; Fev = Fevereiro; Mar = Março; Abr = Abril; Mai = Maio; Jun = Junho; Jul = Julho; Ago = Agosto; Set = Setembro; Out = Outubro; Nov = Novembro; Dez = Dezembro. Fonte: Adaptada de Melo Nascimento, (2020).

TABELA An.2 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA REALIZADA POR MELO NASCIMENTO (2020) EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA COLETADOS POR *Melipona marginata* NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

Tipos Polínicos		Inverno (Jun/Jul/Ago)	Primavera (Set/Out/Nov)	Verão (Dez/Jan/Fev)	Outono (Mar/Abr/Mai)
Família	Espécie				
-	<i>Indeterminated</i>		PII		
Anacardiaceae	-		PIO		
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolia</i>		PIO		
Areacaceae	<i>Archontophoenix cunningham</i>		PII (Set) / PIO (Out/Nov)		
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	PA			
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	PIO	PIO		
Asteraceae	<i>Cosmos sulphureus</i>	PIO		PIO	
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>				PIO
Commenlinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>	PIO			
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>	PD / PIO (Ago)	PII (Set/Out) / PA (Nov)	PII (Dez) / PIO (Fev)	PIO
Fabaceae	<i>Albizia niopoides</i>		PA (Out) / PII (Nov)	PD (Dez/Jan) / PII (Fev)	
Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>	PIO	PIO	PIO	PIO
Fabaceae	<i>Machaerium stipitatum</i>				PII
Fabaceae	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	PA	PIO	PIO	
Fabaceae	<i>Mimosa pigra</i>	PII			
Fabaceae	<i>Schizolobium parahyba</i>		PIO	PIO	
Fabaceae	<i>Senegalia velutina</i>		PIO		
Fabaceae	<i>Senna alata</i>	PD			
Fabaceae	<i>Senna obtusifolia</i>	PIO (Jun)			
Fabaceae	<i>Senna sp</i>		PA		
Fabaceae	<i>Stylosanthes viscosa</i>	PII (Jun) / PIO (Ago)			PIO
Fabaceae	<i>Tipuana tipu</i>		PII		
Magnoliaceae	<i>Magnolia champaca</i>			PII	
Malvaceae	<i>Triumfetta semitriloba</i>				PIO
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	OIP			
Melastomataceae	<i>Pleroma granulorum</i>			PA	
Meliaceae	<i>Melia azedarach</i>	PA			
Myrtaceae	<i>Eucalyptus robusta</i>	PA (Jun) / PII (Ago)	PD (Set) / PII (Out/Nov)	PII (Dez) / PIO (Jan) / PD (Fev)	PD (Mar/Abr/Mai)
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>		PA (Set/Out) / PII (Nov)		
Myrtaceae	<i>Callistemon citrinus</i>	PII (Jun) / PIO (Ago)			
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	PIO			
Myrtaceae	<i>Syzygium cumini</i>		PIO		
Poaceae	<i>Zea mays</i>	PIO			
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i>				PIO (Mar) / PII (Abr)
Salicaceae	<i>Casearia gossypiosperma</i>	PIO			
Sapindaceae	<i>Serjania laruoteana</i>	PIO	PA		PIO (Mar) / PA (Abr/Mai)
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>		PII		

PD = pólen dominante (frequências > 45 %; PA = pólen acessório (frequências entre 15 e 45 %); PII = pólen isolado importante (frequências entre 3 e 15 %); PIO = pólen isolado ocasional (frequências < 3 %); Jan = Janeiro; Fev = Fevereiro; Mar = Março; Abr = Abril; Mai = Maio; Jun = Junho; Jul = Julho; Ago = Agosto; Set = Setembro; Out = Outubro; Nov = Novembro; Dez = Dezembro. Fonte: Adaptada de Melo Nascimento, (2020).

TABELA An.3 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA REALIZADA POR MELO NASCIMENTO (2020) EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA COLETADOS POR *Melipona quadrifasciata* NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

Tipos Polínicos		Inverno (Jun/Jul/Ago)	Primavera (Set/Out/Nov)	Verão (Dez/Jan/Fev)	Outono (Mar/Abr/Mai)
Familia	Espécies				
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>			PA	
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>	PII	PIO	PII	
Fabaceae	<i>Albizia niopoides</i>		PII (Out) / PA (Nov)	PD (Dez) / PA (Jan) / PIO (Fev)	
Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>			PIO	
Fabaceae	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	PIO		PII	PA (Mar/Abr)
Fabaceae	<i>Mimosa pigra</i>	PIO			
Fabaceae	<i>Senegalia velutina</i>			PII	
Fabaceae	<i>Senna alata</i>	PD (Jun)			
Fabaceae	<i>Senna sp</i>		PA	PIO	
Fabaceae	<i>Stylosanthes viscosa</i>	PIO			
Malvaceae	<i>Heliocarpus popayanensis</i>	PII			
Meliaceae	<i>Melia azedarach</i>	PIO			
Meliaceae	<i>Cedrela fissilis</i>	PIO			
Myrtaceae	<i>Eucalyptus robusta</i>	PA (Jun/Jul)	PA (Out) / PII (Nov)	PII (Jan) / PD (Fev)	PD (Mar/Abr/Mai)
Myrtaceae	<i>Callistemon citrinus</i>	PIO			
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	PD (Jul) / PII (Ago)			
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	PD	PD (Set/Out) / PA (Nov)	PIO (Dez) / PA (Jan)	
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i>				PIO
Sapindaceae	<i>Serjania laruotteana</i>	PIO			

PD = pólen dominante (frequências > 45 %); PA = pólen acessório (frequências entre 15 e 45 %); PII = pólen isolado importante (frequências entre 3 e 15 %); PIO = pólen isolado ocasional (frequências < 3 %); Jan = Janeiro; Fev = Fevereiro; Mar = Março; Abr = Abril; Mai = Maio; Jun = Junho; Jul = Julho; Ago = Agosto; Set = Setembro; Out = Outubro; Nov = Novembro; Dez = Dezembro. Fonte: Adaptada de Melo Nascimento, (2020).

TABELA An.4 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA REALIZADA POR MELO NASCIMENTO (2020) EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA COLETADOS POR *Scaptotrigona bipunctata* NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

Tipos polínicos		Inverno (Jun/Jul/Ago)	Primavera (Set/Out/Nov)	Verão (Dez/Jan/Fev)	Outono (Mar/Abr/Mai)
Família	Espécies				
Amaranthaceae	<i>Alternanthera tenella</i>		PII		
Anacardiaceae	<i>Schinus terenbinthifolia</i>		PII		
Apocynaceae	<i>Aspidosperma olivaceum</i>		PIO		
Areaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>		PIO	PIO	
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>		PIO		PIO
Bombacaceae	<i>Ceiba speciosa</i>		PIO		
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	PIO			
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>	PD (Jun) / PA (Jul)	PIO		
Euphorbiaceae	<i>Croton floribundus</i>		PII (Out) / PIO (Nov)		
Fabaceae	<i>Albizia niopoides</i>		PD (Out) / PIO (Nov)	PD (Dez) / PII (Jan) / PIO (Fev)	
Fabaceae	<i>Bauhinia variegata</i>	PII			
Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>		PIO	POI	PIO
Fabaceae	<i>Macherium stipitatum</i>				PII
Fabaceae	<i>Macroptilium atropurpureum</i>		PIO		
Fabaceae	<i>Mimosa casealpiniifolia</i>		PIO	PII (Dez) / PIO (Jan)	
Fabaceae	<i>Schizolobium parahyba</i>		PA (Set) / PIO (Out) / PII (Nov)		
Fabaceae	<i>Senegalia velutina</i>		PII	PIO	
Fabaceae	<i>Tipuana tipu</i>		PA	PA (Dez) / PIO (Jan)	
Malvaceae	<i>Heliocharpus popayanensis</i>	PII			
Meliaceae	<i>Melia azedarach</i>	PII			
Moringaceae	<i>Moringa oleifera</i>			PA	
Myrtaceae	<i>Callistemon citrinus</i>				PIO
Myrtaceae	<i>Eucalyptus robusta</i>	PII (Jun) / PA (Jul) / PD (Ago)	PA (Set/Nov) / PII (Out)	PII (Dez) / PD (Jan/Fev)	PD (Mar/Abr/Mai)
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	PIO			
Myrtaceae	<i>Syzygium cumini</i>		PII (Set/Out) / PIO (Nov)		
Phytolaccaceae	<i>Gallesia integrifolia</i>				PIO
Rhamnaceae	<i>Hovenia dulcis</i>		PA (Set) / PII (Out)		
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i>				PII (Mar/Abr) / PIO (Mai)
Rutaceae	<i>Murraya paniculata</i>	PII			
Salicaceae	<i>Casearia gossypiosperma</i>	PII			
Sapindaceae	<i>Serjania laruotteana</i>	PII (Jun) / PA (Jul)			PII
Violaceae	<i>Pombalia bigibbosa</i>	PIO			
Violaceae	<i>Pombalia communis</i>	PIO			

PD = pólen dominante (frequências > 45 %); PA = pólen acessório (frequências entre 15 e 45 %); PII = pólen isolado importante (frequências entre 3 e 15 %); PIO = pólen isolado ocasional (frequências < 3 %); Jan = Janeiro; Fev = Fevereiro; Mar = Março; Abr = Abril; Mai = Maio; Jun = Junho; Jul = Julho; Ago = Agosto; Set = Setembro; Out = Outubro; Nov = Novembro; Dez = Dezembro. Fonte: Adaptada de Melo Nascimento, (2020).

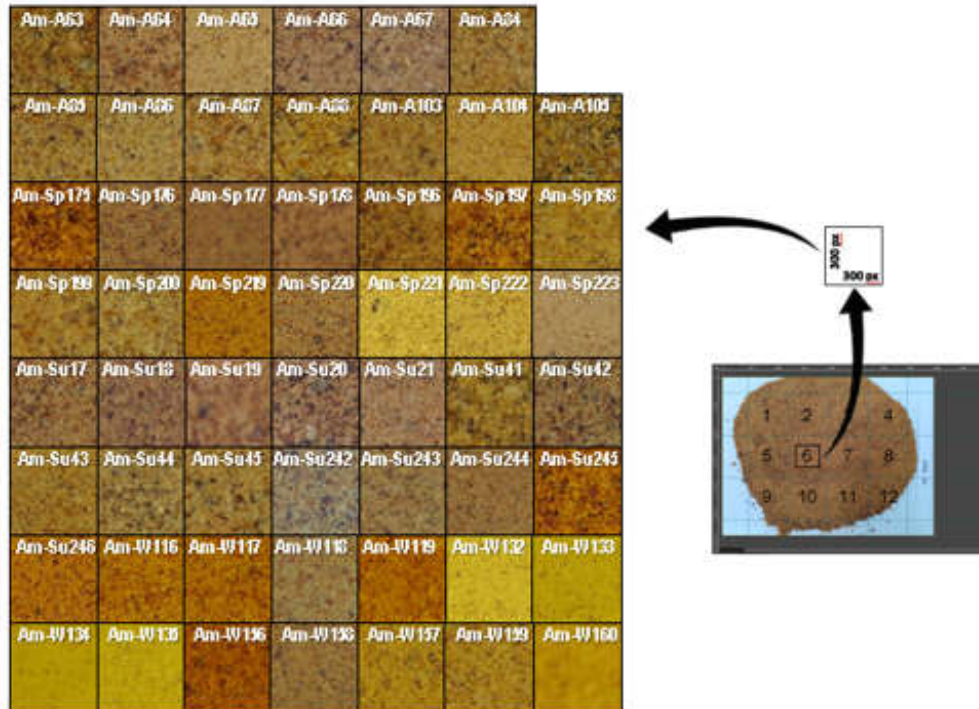
TABELA An.5 - TIPOS POLÍNICOS ENCONTRADOS PELA ANÁLISE POLÍNICA REALIZADA POR MELO NASCIMENTO (2020) EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA COLETADOS POR *Tetragona clavipes* NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

Tipo de pólen		Inverno (Jun/Jul/Ago)	Primavera (Set/Out/Nov)	Verão (Dez/Jan/Fev)	Outono (Mar/Abr/Mai)
Família	Espécies				
Acanthaceae	<i>Justicia brasiliana</i>	PIO			
Amaranthaceae	<i>Alternanthera tenella</i>		PIO		
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i>			PA PII PIO	PIO
Amaranthaceae	<i>Chamissoa altissima</i>				
Anacardiaceae	-		PIO (Set) / PII (Nov)		
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana catharinensis</i>		PII		
Areaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>		PIO	PIO	
Asteraceae	<i>Acmella brachyglossa</i>				PIO
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	PIO		PII	PIO (Abr) / PA (Mai)
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	PIO		PIO PIO	PIO
Asteraceae	<i>Cosmos sulphureus</i>			PIO	
Asteraceae	<i>Emilia sonchifolia</i>	PIO	PIO		
Asteraceae	<i>Galinsoga parviflora</i>			PII	
Asteraceae	<i>Mikania glomerata</i>	PIO			
Asteraceae	<i>Tridax procumbens</i>	PII (Jun) / PIO (Jul/Ago)	PIO		PIO PIO
Asteraceae	<i>Vernonanthura polyanthes</i>	PIO			
Bignoniaceae	<i>Dolichandra unguis-cati</i>	PIO	PII		
Bignoniaceae	<i>Mansoa difficilis</i>			PII	
Bombacaceae	<i>Ceiba speciosa</i>			PA	PIO
Boraginaceae	<i>Cordia trichotoma</i>				PIO
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	PA (Jul) / PD (Ago)	PA (Set/Out) / PII (Nov)	PIO	PII (Mar/Abr) / PIO (Mai)
Cannabaceae	<i>Celtis iguanaea</i>				PIO
Commenlinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>			PIO	
Cyperaceae	<i>Cyperaceae sp.</i>			PII	PIO
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>	PD (Jun) / PA (Jul) / PIO (Ago)	PIO (Set) / PA (Out) / PII (Nov)	PIO (Dez) / PA (Jan) / PII (Fev)	PIO
Euphorbiaceae	<i>Croton floribundus</i>		PII (Out) / PA (Nov)		
Fabaceae	<i>Bauhinia variegata</i>	PIO		PIO	
Fabaceae	<i>Machaerium stipitatum</i>	PA			PA (Abr) / PII (Mai)
Fabaceae	<i>Senna alata</i>	PIO (Jul) / PII (Ago)		PII	PIO
Fabaceae	<i>Cajanus cajan</i>	PIO			
Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>	PIO	PII	PIO	PIO
Fabaceae	<i>Stylosanthes viscosa</i>	PIO			PIO
Fabaceae	<i>Schizolobium parayba</i>		PII	PIO	

PD = pólen dominante (frequências > 45 %; PA = pólen acessório (frequências entre 15 e 45 %); PII = pólen isolado importante (frequências entre 3 e 15 %); PIO = pólen isolado ocasional (frequências < 3 %); Jan = Janeiro; Fev = Fevereiro; Mar = Março; Abr = Abril; Mai = Maio; Jun = Junho; Jul = Julho; Ago = Agosto; Set = Setembro; Out = Outubro; Nov = Novembro; Dez = Dezembro. Fonte: Adaptada de Melo Nascimento, (2020).

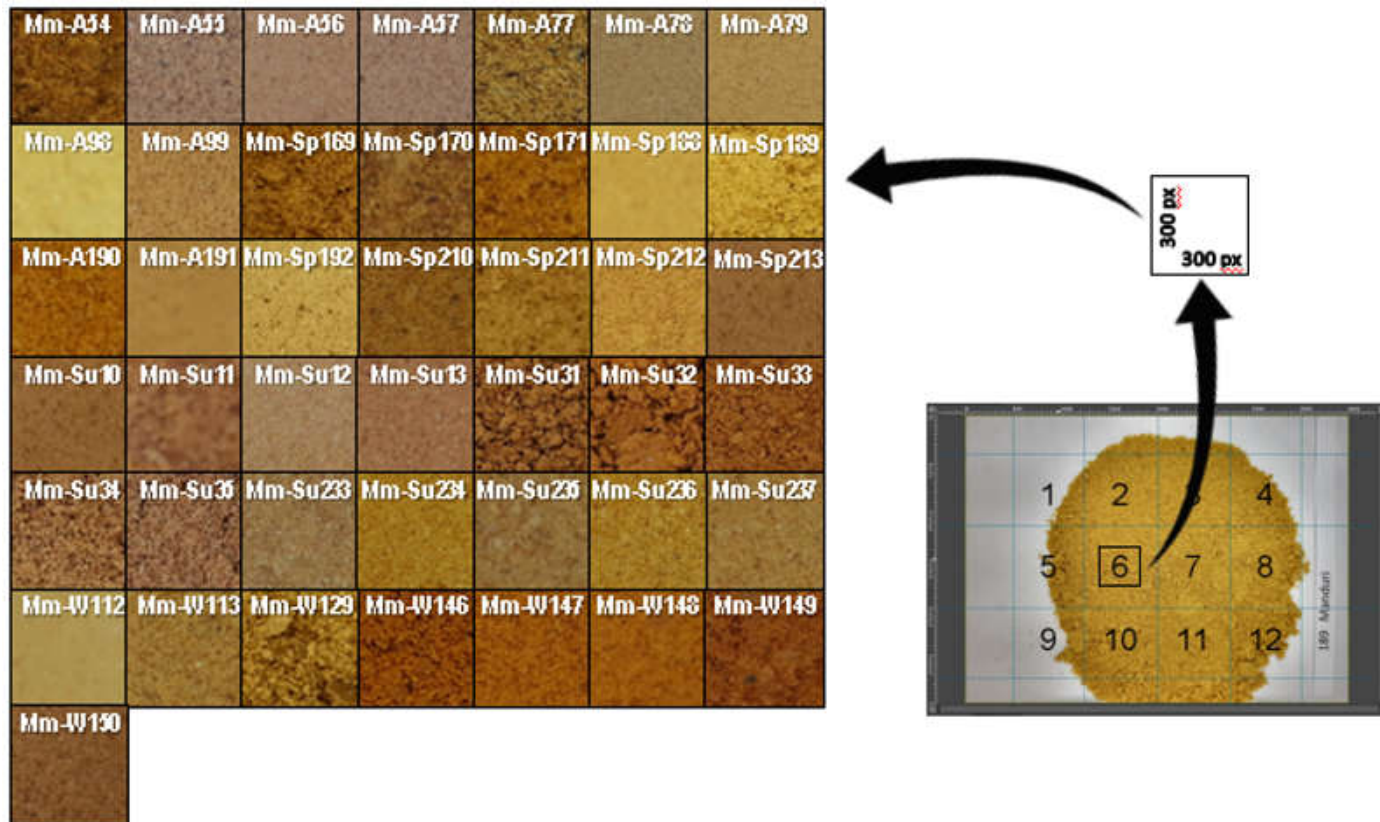
APÊNDICE

FIGURA Ap.1 - IMAGENS DIGITAIS DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Apis mellifera* COLETADAS NO PERÍODO DE JUNHO/2018 A MAIO/2019. A ESQUERDA ILUSTRAÇÃO DO RECORTE DA IMAGEM DIGITAL (ROI) EXTRAÍDA DO QUADRANTE 6, COM DIMENSÕES DE 300 X 300 PIXELS. CODIFICAÇÃO DO ROI: ESPÉCIE DE ABELHA (Am – *Apis mellifera*), ESTAÇÃO DO ANO (A – OUTONO; Sp – PRIMAVERA; Su – VERÃO; W – INVERNO) E NÚMERO DE ENTRADA NO LABORATÓRIO (1 A 244)



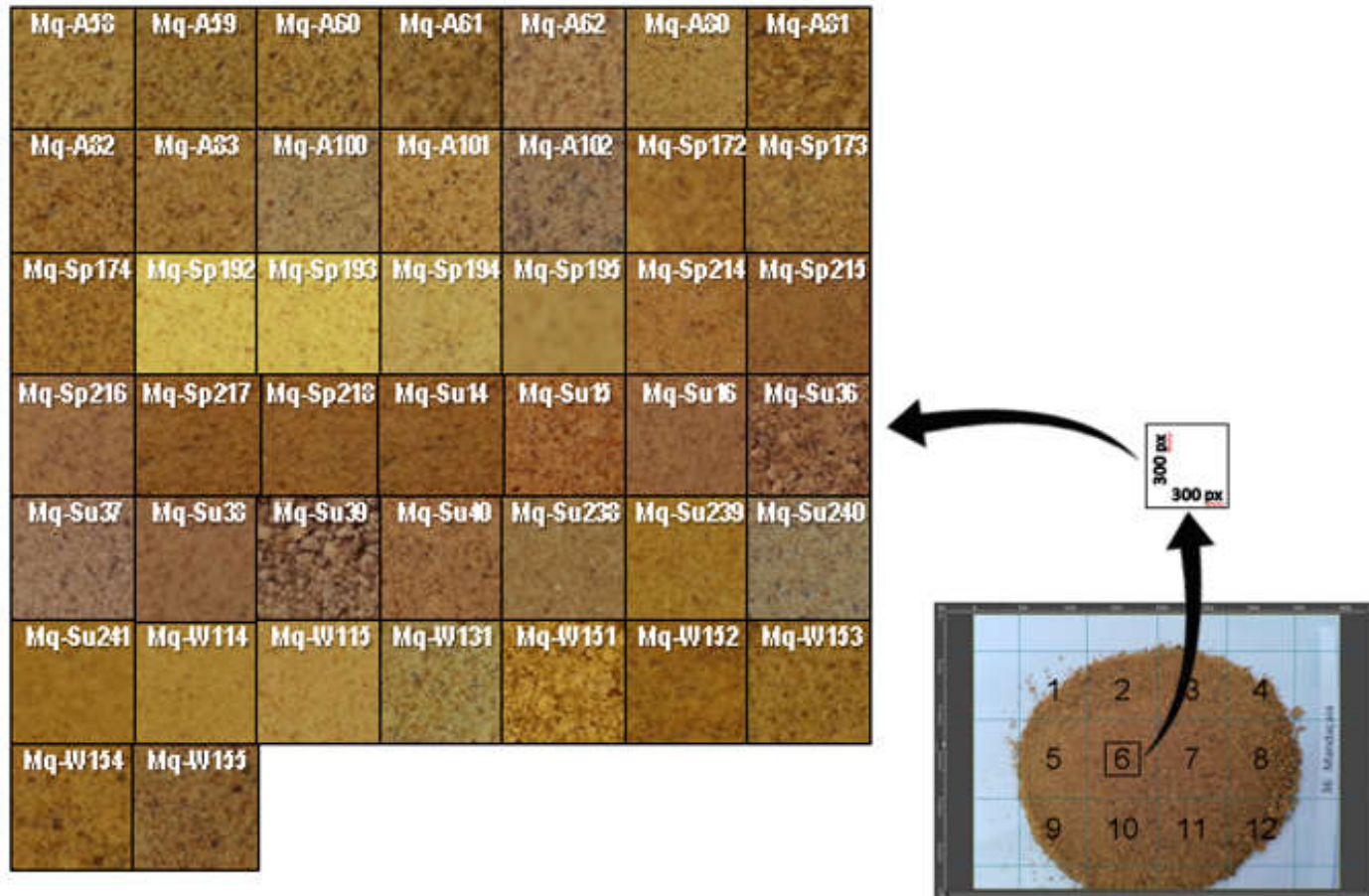
Fonte: a autora, 2023.

FIGURA Ap.2 - IMAGENS DIGITAIS DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Melipona marginata* COLETADAS NO PERÍODO DE JUNHO/2018 A MAIO/2019. A ESQUERDA ILUSTRAÇÃO DO RECORTE DA IMAGEM DIGITAL (ROI) EXTRAÍDA DO QUADRANTE 6 COM DIMENSÕES DE 300 X 300 PIXELS. CODIFICAÇÃO DO ROI: ESPÉCIE DE ABELHA (Mm – *Melipona marginata*), ESTAÇÃO DO ANO (A – OUTONO; Sp – PRIMAVERA; Su – VERÃO; W – INVERNO) E NÚMERO DE ENTRADA NO LABORATÓRIO (1 A 244)



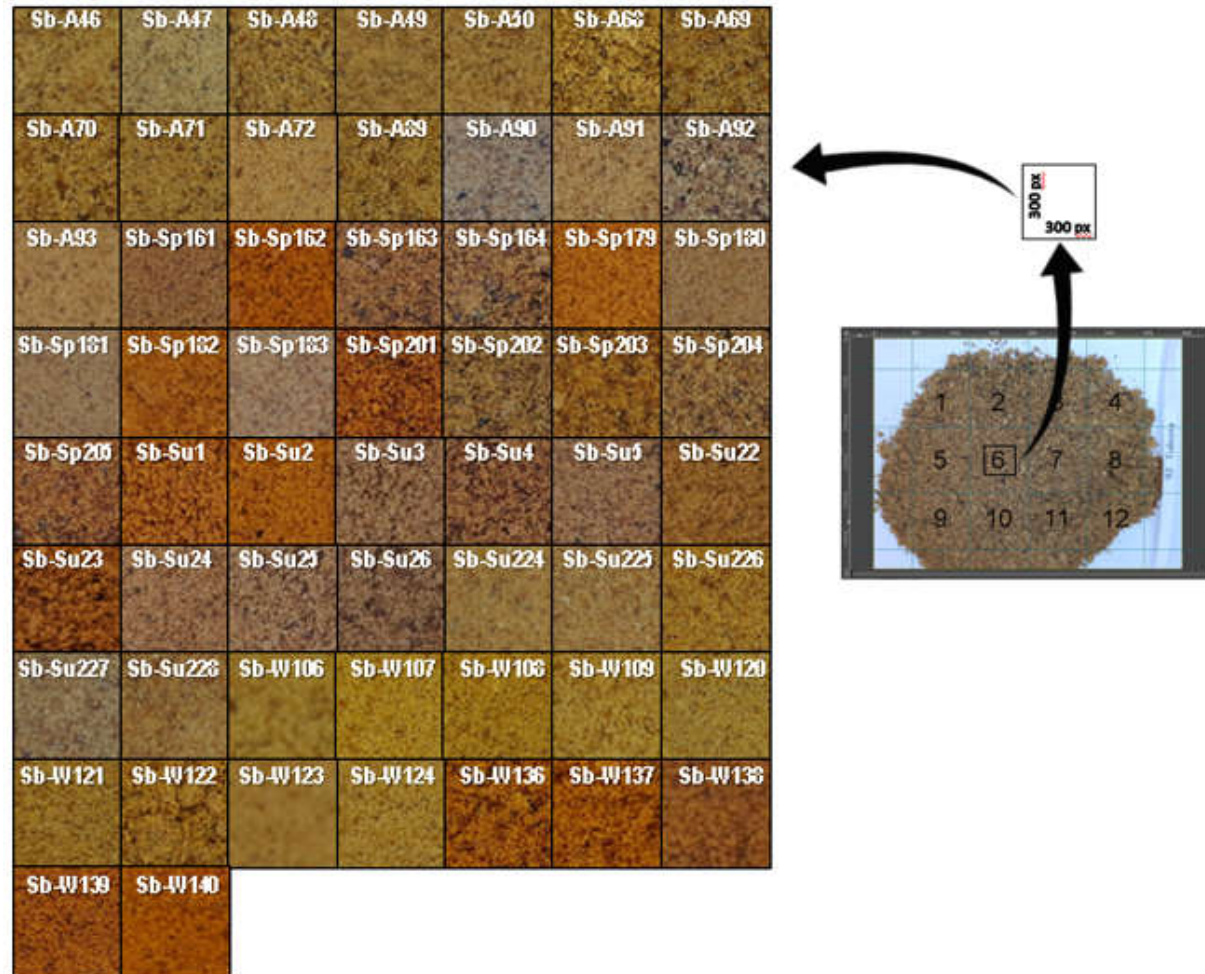
Fonte: a autora, 2023.

FIGURA Ap.3 - IMAGENS DIGITAIS DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Melipona quadrifasciata* COLETADAS NO PERÍODO DE JUNHO/2018 A MAIO/2019. A ESQUERDA ILUSTRAÇÃO DO RECORTE DA IMAGEM DIGITAL (ROI) EXTRAÍDA DO QUADRANTE 6 COM DIMENSÕES DE 300 X 300 PIXELS. CODIFICAÇÃO DO ROI: ESPÉCIE DE ABELHA (*Melipona quadrifasciata*), ESTAÇÃO DO ANO (A – OUTONO; Sp – PRIMAVERA; Su – VERÃO; W – INVERNO) E NÚMERO DE ENTRADA NO LABORATÓRIO (1 A 244)



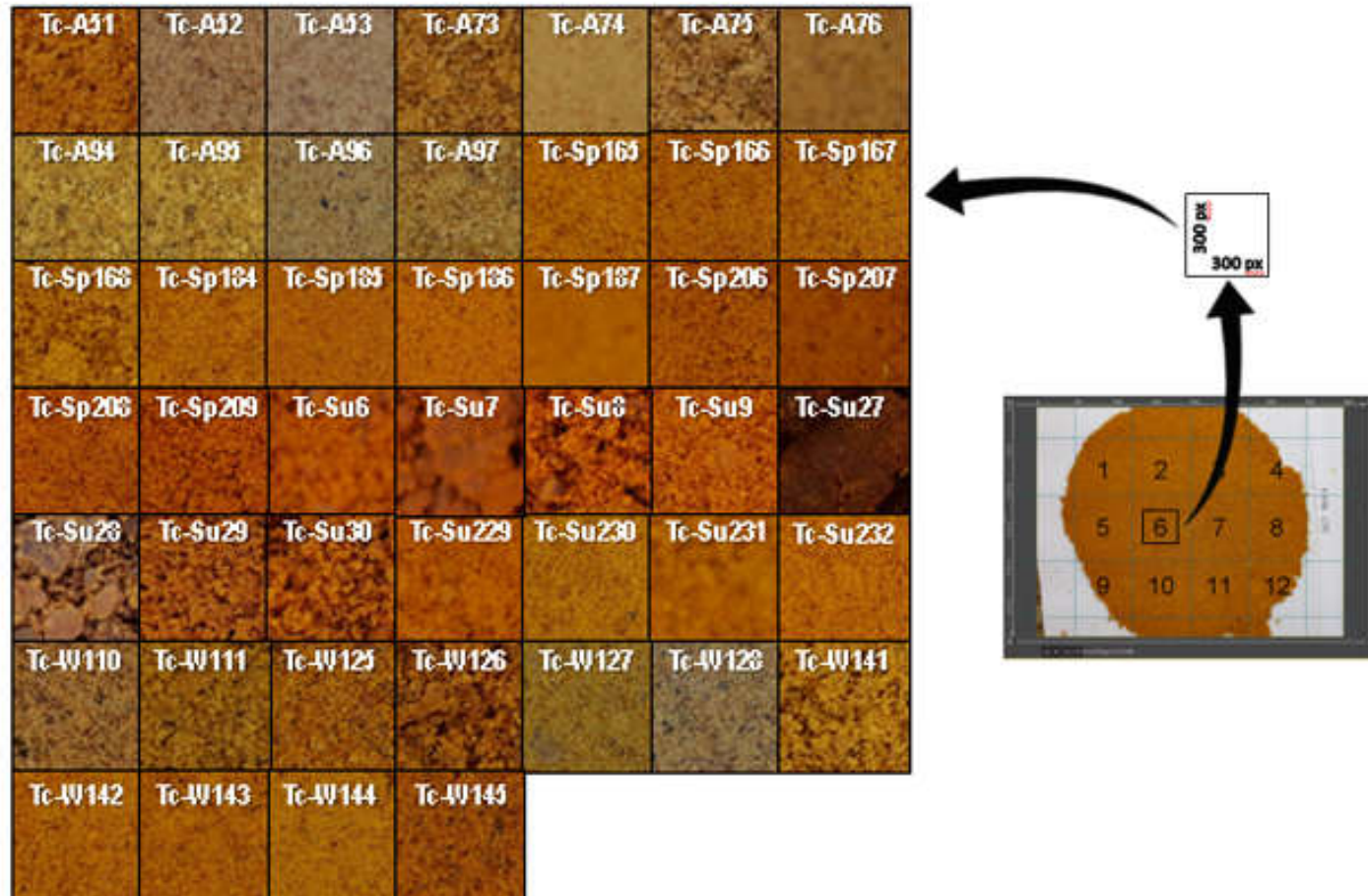
Fonte: a autora, 2023.

FIGURA Ap.4 - IMAGENS DIGITAIS DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Scaptotrigona bipunctata* COLETADAS NO PERÍODO DE JUNHO/2018 A MAIO/2019. A ESQUERDA ILUSTRAÇÃO DO RECORTE DA IMAGEM DIGITAL (ROI) EXTRAÍDA DO QUADRANTE 6 COM DIMENSÕES DE 300 X 300 PIXELS. CODIFICAÇÃO DO ROI: ESPÉCIE DE ABELHA (Sb – *Scaptotrigona bipunctata*), ESTAÇÃO DO ANO (A – OUTONO; Sp – PRIMAVERA; Su – VERÃO; W – INVERNO) E NÚMERO DE ENTRADA NO LABORATÓRIO (1 A 244)



Fonte: a autora, 2023.

FIGURA Ap.5 - IMAGENS DIGITAIS DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Tetragona clavipes* COLETADAS NO PERÍODO DE JUNHO/2018 A MAIO/2019. A ESQUERDA ILUSTRAÇÃO DO RECORTE DA IMAGEM DIGITAL (ROI) EXTRAÍDA DO QUADRANTE 6 COM DIMENSÕES DE 300 X 300 PIXELS. CODIFICAÇÃO DO ROI: ESPÉCIE DE ABELHA (Tc – *Tetragona clavipes*), ESTAÇÃO DO ANO (A – OUTONO; Sp – PRIMAVERA; Su – VERÃO; W – INVERNO) E NÚMERO DE ENTRADA NO LABORATÓRIO (1 A 244)



Fonte: a autora, 2023.