



COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM
PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR PROTEIN DETERMINATION IN STINGLESS BEE
POLLEN

COMPARACIÓN DE DIFERENTES METODOS PARA DETERMINAR PROTEÍNAS EN POLEN DE
ABEJA SIN AGUIJÓN

Elen Vanessa Costa da Silva¹, Emilly Vitória dos Santos Oliveira¹, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos¹, Antônio José Nogueira Leão¹, Pablo Ruan Cardoso Forte¹, Naely Piteira Xavier¹, Beatriz Muniz de Lima Freitas¹

e595620

<https://doi.org/10.47820/recima21.v5i9.5620>

PUBLICADO: 09/2024

RESUMO

O pólen apícola é uma mistura de pólen de flores, néctar e secreções das abelhas, contendo proteínas, os 22 aminoácidos básicos, hidratos de carbono, lipídios, vitaminas e minerais. Os métodos para a quantificação de proteínas são muito variados, no entanto, os mais utilizados são os espectrofotométricos Biureto, Lowry, Bradford, Smith e absorção no ultravioleta. O método do Biureto é um dos mais empregados, por ser um método rápido, simples, econômico e exato; e o método de Kjeldahl determina a matéria nitrogenada total de uma amostra. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência dos métodos Biureto e Kjeldahl na análise do teor de proteína de amostras de pólen de abelha sem ferrão (*Melipona fasciculata*). As amostras foram obtidas em um Meliponário situado em Castanhal-PA. Realizou-se a quantificação pelo método de Biureto utilizando a curva padrão de ovoalbumina e o método de Kjeldahl com as etapas de digestão, destilação e titulação. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey e Análise de Variância (ANOVA) a nível de 5% de significância, no qual verificou-se que não existe diferença entre os dois procedimentos analisados, sendo preferível o método de Biureto pela rapidez e mais baixo custo.

PALAVRAS-CHAVE: Biureto. Proteína. Pólen.

ABSTRACT

*Bee pollen is a mixture of flower pollen, nectar and bee secretions, containing proteins, the 22 basic amino acids, carbohydrates, lipids, vitamins and minerals. The methods for quantifying proteins are very varied, however, the most used are Biuret, Lowry, Bradford, Smith spectrophotometric and ultraviolet absorption. The Biuret method is one of the most used, as it is a quick, simple, economical and accurate method; and the Kjeldahl method determines the total nitrogenous matter of a sample. The main objective of this work was to compare the efficiency of the Biuret and Kjeldahl methods in analyzing the protein content of stingless bee (*Melipona fasciculata*) pollen samples. The samples were obtained from a Meliponário located in Castanhal-PA. Quantification was carried out by the Biuret method using the ovalbumin standard curve and the Kjeldahl method with the digestion, distillation and titration steps. The results obtained were statistically analyzed using the Tukey test and Analysis of Variance (ANOVA) at a 5% level of significance, in which it was found that there is no difference between the two procedures analyzed, with the Biuret method being preferable due to its speed and low cost.*

KEYWORDS: Biuret. Protein. Pollen.

RESUMEN

El polen de abeja es una mezcla de polen de flores, néctar y secreciones de abejas, que contiene proteínas, los 22 aminoácidos básicos, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales. Los métodos para cuantificar proteínas son muy variados, sin embargo, los más utilizados son la espectrofotometría de Biuret, Lowry, Bradford, Smith y la absorción ultravioleta. El método Biuret es uno de los más utilizados, por ser un método rápido, sencillo, económico y preciso; y el método

¹ Universidade do Estado do Pará.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO
Elen Vanessa Costa da Silva, Emily Vitória dos Santos Oliveira, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos, Antônio José Nogueira Leão,
Pablo Ruan Cardoso Forte, Naely Piteira Xavier, Beatriz Muniz de Lima Freitas

*Kjeldahl determina la materia nitrogenada total de una muestra. El objetivo de este trabajo fue comparar la eficiencia de los métodos de Biuret y Kjeldahl en el análisis del contenido proteico de muestras de polen de abeja sin aguijón (*Melipona fasciculata*). Las muestras fueron obtenidas de un Meliponário ubicado en Castanhal-PA. La cuantificación se realizó por el método de Biuret utilizando la curva estándar de ovoalbúmina y el método de Kjeldahl con los pasos de digestión, destilación y titulación. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Tukey y Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significancia del 5%, en el cual se verificó que no existe diferencia entre los dos procedimientos analizados, siendo preferible el método de Biuret por su velocidad y más bajo costo.*

PALABRAS CLAVE: Biuret. Proteína. Polen.

INTRODUÇÃO

O pólen apícola é uma mistura de pólen de flores de várias fontes vegetais, néctar e secreções das abelhas (*Melipona fasciculata*), coletado das plantas pelas abelhas e transportado nas patas, mais precisamente nas corbículas (cestas). Recebe a adição da “ensalivação”, momento em que é enriquecido com enzimas e vitaminas, sendo desta maneira estocado posteriormente nos potes, passando a ser chamado “pão das abelhas”¹.

O pólen contém proteínas, os 22 aminoácidos básicos, hidratos de carbono, lipídios, vitaminas e minerais². Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Pólen Apícola³, a quantidade de proteínas para o pólen ser considerado de qualidade é de no mínimo 8,0% para pólen apícola.

As proteínas se encontram com um teor médio de 20%, sendo que grande parte está sob a forma de aminoácidos livres. Entre os aminoácidos essenciais encontrados estão o ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, lisina e outros, tornando o produto rico nutricionalmente⁴.

O pólen tem despertado a atenção do homem pela riqueza dos seus constituintes nutricionais, a fim de que haja um aproveitamento de suas propriedades alimentícias na dieta humana Souza *et al*⁵. O pólen de melipona possui um sabor e aroma diferenciado devido a ação de enzimas que degradam a glicose e produzem ácido glicônico, tornando-o com sabor acidificado. O valor proteico é variável e depende da origem floral⁵. A mudança no teor de proteína observada em diferentes estações do ano pode ser influenciada por diferenças na diversidade de pólen⁶. O tipo de pólen mais estudado no mundo é aquele coletado pela espécie *A. mellifera*, e pouco é conhecido sobre a composição química do pólen coletado pelas abelhas sem ferrão. Nesse sentido, saber seus componentes é importante para caracterizar os produtos obtidos de diferentes regiões, climas, e espécies de abelhas, para ter um melhor controle de qualidade, e incentivar a criação de abelhas sem ferrão para extração comercial de seus produtos⁷. O pólen de abelha possui uma composição química altamente complexa e nutritiva, mas seus constituintes variam dentro de uma faixa de valores mínimo e máximo, principalmente devido à origem geográfica e botânica, bem como às condições edafoclimáticas⁸.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO
Elen Vanessa Costa da Silva, Emilly Vitória dos Santos Oliveira, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos, Antônio José Nogueira Leão,
Pablo Ruan Cardoso Forte, Naely Piteira Xavier, Beatriz Muniz de Lima Freitas

Este produto da colmeia é considerado um alimento saudável, com uma ampla gama de efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo proteção contra depressão e propriedades ansiolíticas, melhora da memória e efeito antiepiléptico, bem como diminuição da taxa de perda óssea devido à osteoporose em camundongos⁹.

Além de sua utilidade como suplemento alimentício, o pólen é usado em outros setores, seja: na farmacologia é utilizado como ingrediente em produtos epífito-aromáticos (encapsulados, tinturas, óleos essenciais); cosmética: para filtros solares, cremes, máscaras, batons, sabonetes, xampus; alimentos: barras de cereais, chocolates, bolachas, saladas, pastas; como alimento para as abelhas em período de estiagem; no monitoramento da poluição ambiental¹⁰.

Os métodos para a quantificação de proteínas são muito variados, sendo que os mais utilizados são os espectrofotométricos Biureto, Lowry, Bradford, Smith e absorção no ultravioleta. Com exceção do método de absorção no ultravioleta que se baseia na absorção da luz das ligações peptídicas dos aminoácidos que constituem as proteínas, os demais se baseiam nos cromóforos resultantes de reações com as proteínas¹¹.

O método de Biureto é um dos mais empregados, por ser um método rápido, simples e exato. O reagente contendo íons cúpricos é utilizado para promover a formação de um complexo de cor violeta com as ligações peptídicas das proteínas. O produto da reação absorve em duas regiões do espectro, a 270 nm e a 540 nm, sendo esta última a mais utilizada para fins analíticos¹².

O método de Kjeldahl determina a matéria nitrogenada total de uma amostra de pólen. A base do processo consiste no deslocamento do nitrogênio presente na amostra, transformando-se em sal amoniacal (sulfato de amônio). Desse sal obtido, desloca-se o amônio para a solução ácida (ácido bórico). Por titulação determina-se a quantidade de nitrogênio que lhe deu origem¹³ e, em seguida, estima-se indiretamente o teor de proteína por meio de um fator de conversão.

A inovação em metodologias e estudos comparativos de métodos espectrofotométricos e as demais já utilizadas para a determinação de proteínas totais, sempre foram de grande interesse para vários seguimentos, tanto para a indústria de alimentos como para laboratórios e pesquisadores de diferentes áreas, reduzindo principalmente tempo e custo nos resultados obtidos com a mesma qualidade. Pesquisando na literatura não foram encontradas pesquisas utilizando o método de Biureto na determinação de proteínas no pólen, por isso o objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência dos métodos Biureto e Kjeldahl na análise do teor de proteína de amostras de pólen de abelha sem ferrão (*Melipona fasciculata*).

MATERIAL E MÉTODO

Matéria prima

A amostra de pólen da espécie *Melipona fasciculata* foi obtida no mês de setembro de 2021, em um Meliponário situado no Município de Castanhal-PA. A amostra foi coletada de três ninhos diferentes, homogeneizada. A análise laboratorial foi executada em triplicata.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO
Elen Vanessa Costa da Silva, Emilly Vitória dos Santos Oliveira, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos, Antônio José Nogueira Leão,
Pablo Ruan Cardoso Forte, Naely Piteira Xavier, Beatriz Muniz de Lima Freitas

As coletas foram realizadas com o auxílio de espátulas e armazenadas em potes rosqueáveis de polietileno com capacidade de 200 mL previamente higienizados e, a seguir, encaminhados ao Laboratório de Alimentos da Universidade do Estado do Pará (Campus Vinte), onde permaneceram sob congelamento a - 5 °C por período de 12 h, antes do procedimento analítico.

Para a quantificação do teor de proteína pelo método de Biureto foi utilizada a metodologia descrita por AOAC¹⁴ e para o método de Kjeldahl procedeu-se a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz¹⁵.

Preparo da solução para o método espectrofotômetro (Biureto)

Solução tampão fosfato

Em um volume de 25 mL de solução aquosa de K_2HPO_4 (fosfato monopotássico) a 1 M e 25 mL de solução aquosa de KH_2PO_4 (fosfato dipotássico) a 1 M foram colocados sob uma placa com agitação magnética, adicionando 24,85 mL da solução aquosa de K_2HPO_4 e 25 mL da solução aquosa de KH_2PO_4 em bequer. Acrescentou-se 400 mL de água destilada, sob agitação, e confirmando-se o pH da solução com o medidor de pH (potenciômetro) devidamente ajustado. A solução foi transferida para um balão de 500 mL e completado o volume com água destilada. A solução foi armazenada sob refrigeração (2 a 5°C).

Preparo da solução de Biureto

Dissolveu-se 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) em 500 mL de água destilada. Adicionou-se, sob agitação constante, 300 mL de solução de hidróxido de sódio 10%.

Preparo da solução de pólen

Pesou-se 0,5 g de pólen e macerou em cadinhos com 10 mL de solução tampão de fosfato 0,1 M. Em tubos falcon, submeteu essa solução à centrifugação de 1020 rpm por 10 minutos e utilizou para análise o conteúdo sobrenadante resfriado (colocar em freezer por 10 minutos). Concentração final da solução de pólen: 50 mg/ml.

Preparo da curva padrão de ovoalbumina

Separou-se a clara do ovo e levou a uma chapa aquecedora, a 41 °C, após atingir a temperatura, adicionou 10 mL de ácido acético 5% e submeteu à centrifugação de 1700 rpm por 10 minutos tubos de centrífuga. Pesou 0,5 g da albumina precipitada e dissolveu em 100 mL de NaOH 0,1 M, resultando em concentração final de 5 mg/ml. Para traçar a equação da reta que define a concentração de proteínas foi necessário realizar diluições para se obter diferentes concentrações de proteínas, conforme Tabela 1. Em tubos de ensaio, pipetou-se 0,5 mL de solução de pólen e 2,5 mL



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO
Elen Vanessa Costa da Silva, Emilly Vitória dos Santos Oliveira, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos, Antônio José Nogueira Leão,
Pablo Ruan Cardoso Forte, Naely Piteira Xavier, Beatriz Muniz de Lima Freitas

de biureto. Aguardou 15 minutos e realizou a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

Tabela 1. Procedimento para obtenção da curva padrão

Tubos	Água destilada (mL)	Solução de ovoalbumina (mL)	Reagente de Biureto (mL)
Branco	1	-	5
1	0,8	0,2	5
2	0,6	0,4	5
3	0,4	0,6	5
4	0,2	0,8	5
5	-	1,0	5

A concentração de proteínas foi dada pela equação a seguir:

$$\text{Proteína (mg.mL}^{-1}\text{)} = x = \frac{y-b}{a}$$

y = valor da absorvância

x = concentração da proteína

b = obtido da equação reta

a = obtido da equação da reta

Método de Kjeldahl

Foi realizada inicialmente a digestão, onde pesou-se 0,2 g da amostra de pólen e 2 g de catalisador (sulfato de potássio) e 5ml de ácido sulfúrico P.A em Erlenmeyer, posteriormente colocadas em tubos digestores, até alcançarem a coloração verde esmeralda (sulfato de amônio). Na etapa de destilação adicionou-se 10 mL de água destilada para se iniciar o processo, seguindo para a titulação, onde usou-se o ácido bórico como titulante, adicionando 2 gotas do indicador vermelho de metila, o ponto de viragem quando atinge a cor laranja-rosado.

Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados das análises físico-químicas das amostras de pólen foram avaliados por análise de ANOVA e pelo teste de Tukey para verificar diferença entre os tratamentos ao nível de 95% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da quantificação de proteínas nas amostras de pólen de *Melipona fasciculata*, de acordo com a diferença das duas metodologias utilizadas estão descritas na Tabela 2.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO
Elen Vanessa Costa da Silva, Emilly Vitória dos Santos Oliveira, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos, Antônio José Nogueira Leão,
Pablo Ruan Cardoso Forte, Naely Piteira Xavier, Beatriz Muniz de Lima Freitas

Tabela 2. Teor de proteína (média \pm desvio padrão) nas amostras de pólen pelo método de Biureto e Kjeldahl

AMOSTRA	BIURETO (%)	KJELDAHL (%)
1	22,48 \pm 0,05 ^a	20,31 \pm 0,007 ^a
2	22,28 \pm 0,05 ^a	20,50 \pm 0,353 ^a
3	22,04 \pm 0,028 ^a	22,26 \pm 0,2 ^a

Letras diferentes na mesma coluna possuem diferença significativa, Letras iguais na mesma coluna não possuem diferença significativa.

Os valores médios obtidos de proteína nas amostras analisadas foram de 22,26 \pm 0,5% pelo método de Biureto e 21,02 \pm 0,15% pelo método de Kjeldahl. Os resultados foram analisados estatisticamente e verificou-se que não existe diferença nos resultados entre os dois métodos utilizados, comprovando a eficácia na análise de proteína em pólen.

A legislação indica que em pólen apícola *in natura* o valor mínimo de proteína é 8% e todas as amostras apresentaram resultados superiores Brasil¹⁶. No entanto, para pólen de melipona ainda não existe um parâmetro estabelecido na legislação vigente.

Ferreira¹⁷ encontrou teores de proteína em pólen *in natura* de *Melipona scutellaris Latreille* de 19,67%. Outras espécies de *Melipona* apresentaram concentração média de proteína no pólen *in natura* de 19,5%¹⁸. No trabalho de Orsi *et al.*¹³, encontraram valor de proteína em pólen da espécie *Melipona seminigra* de 23,8 \pm 0,3 %, todos utilizando o método de Kjeldahl.

Em suas análises físico-químicas do mel e do pólen, Ramalho²⁰ obteve resultados de proteínas próximo aos determinados no presente trabalho, uma média de 24,26% utilizando o método de Kjeldahl. Modro *et al.*²¹ em amostras de pólen de *Apis Mellifera* obteve média de 28,27% de proteína. Por fim, Silva²² obteve uma média de 25,67 na determinação de proteína do pólen de *Apis Mellifera* usando a técnica de Kjeldahl.

Não foram encontrados trabalhos de proteínas em pólen utilizando o método de biureto, no entanto ele possui a mesma eficiência do método de Kjeldahl. O método do biureto pode ser utilizado para determinar a concentração de proteínas totais por ser um processo rápido se comparado com outros métodos, por utilizar reagentes de baixo custo e por não apresentar grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas²³.

CONSIDERAÇÕES

Os dois métodos demonstraram a mesma eficiência na detecção do teor de proteína no pólen, como observado na análise estatística de ambos os resultados. Algo considerado promissor já que o método de biureto é um método analítico eficiente, que demanda pouco tempo e agilidade para obtenção dos resultados.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO
Elen Vanessa Costa da Silva, Emilly Vitória dos Santos Oliveira, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos, Antônio José Nogueira Leão,
Pablo Ruan Cardoso Forte, Naely Piteira Xavier, Beatriz Muniz de Lima Freitas

AGRADECIMENTO

Ao laboratório de Análise de Alimentos da Universidade do Estado do Pará, Campus XX, pelo incentivo e permissão para a realização das análises e pela infraestrutura ofertada.

REFERÊNCIAS

- 1 Nogueira-Neto, P. Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. São Paulo: Nogueirapis; 1997.
- 2 Morais M, Moreira L, Feás X, Estevinho LM. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidante properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49:1096-1101.
- 3 Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil). Instrução Normativa no 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Pólen Apícola. Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F. 23 de jan 2001, Seção 16-I, 18-23.
- 4 Rodrigues F, Ribeiro MF, Silva RCS. Produção de pólen por abelhas melíferas (*Apismellifera*) em área de cultivo de manga (*Mangifera indica* L.) no projeto irrigado de Maniçoba, Juazeiro-BA. In: congresso nordestino de produção animal. Fortaleza: UEVA/GEC/SNPA/EMBRAPA; 2013. p.1-3.
- 5 Cella I, Amandio DTT, Fanta MR. Meliponicultura. Boletim didático. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). 2017;141:60
- 6 Ivanivki Asn, Silveira TA, Mrchini LC, Moreti ACC. 2012. Relação entre parâmetros físico-químicos do pólen apícola e dados palinológicos. *Anais do 19º*.
- 7 Rebelo KS, Ferreira AG, Carvalho-Zilse GA. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural* [online]. 2016;46(5) [Accessed 2 February 2022];927-932. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150999>.ISSN1678-4596.<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150999>.
- 8 Estevinho LM, Rodrigues S, Pereira AP, Féas X. Pólen de abelha português: Estudo palinológico, avaliação nutricional e microbiológica. *Int. J. Food Sei. Technol*. 2012;47:429–435. Doi: 10.1111 / j.1365-2621.2011.02859.
- 9 Karampour NS, Hemmati AA, Malmir A. O efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico de pólen de abelha em camundongos. *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol*. 2017;7. doi: 10.5455 / njppp.2017.7.0617914112016.
- 10 Barreto LM, Orsi R, Oliveira R, Negrão AF. Pólen apícola: tendências na produção e diversificação do produto. *Magistra, Cruz das Almas*. out. 2011;23(Numero especial).
- 11 Souza RC da S, Yuyama LKO, Aguiar JPL, Oliveira FPM. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. *Acta Amaz* [Internet]. 2004;34(2):333–6. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200021>.Skoong DA, West DM, Holler FJ. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. São Paulo: Thomson Publishers; 2008.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PÓLEN DE ABELHA SEM FERRÃO
Elen Vanessa Costa da Silva, Emilly Vitória dos Santos Oliveira, Giovana Kathelly Costa Vasconcelos, Antônio José Nogueira Leão,
Pablo Ruan Cardoso Forte, Naely Piteira Xavier, Beatriz Muniz de Lima Freitas

- 12 Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova* [Internet]. 1998Nov;21(6):787–93. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>.
- 13 Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official Methods of Analysis*. 16. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC; 1995.
- 14 Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4. ed. [1. ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf.
- 15 Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil) . Instrução Normativa no 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Pólen Apícola. *Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, D.F. 23 de jan 2001, Seção 16-I, 18-23.
- 16 Ferreira, RC. Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen da *Melipona scutellaris* Latreille submetido a diferentes processos de desidratação. [dissertação de Mestrado]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2012.
- 17 Souza RC da S, Yuyama LKO, Aguiar JPL, Oliveira FPM. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. *Acta Amaz* [Internet]. 2004;34(2):333–6. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200021>
- 18 Orsi RO, Negrão AF, Barreto LMRC. Perfil bromatológico do pólen apícola em função de sua granulometria. In: *Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen*, 2011, ILÉUS. *Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen*. 2011;23:34.
- 19 Ramalho, WF. Análise físico-química, atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos do mel e do pólen apícola da abelha *Apis mellifera* comercializados no sertão paraibano. [dissertação de Mestrado]; Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande; 2018.
- 20 Modro AFH, Message D, Luz CFP da, Meira Neto JAA. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. *Pesq agropec bras* [Internet]. 2007Aug;42(8):1057–65. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000800001>.
- 21 Silva, GAS. Caracterização físico-química e funcional das proteínas do pólen apícola. [dissertação de mestrado]. Pombal (PB): Universidade Federal de Campina Grande; 2015.
- 22 Poletti B, Machado AT, Andrade NT, Rosa CS, Poltronieri CV, Leite TE. Comparação de diferentes metodologias para determinação de proteínas em leite cru do município de Dom Pedrito. *Anais do XXII congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas*; 2014; Pelotas, Rio Grande do Sul.