UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estabilidade das vitaminas antioxidantes em amostras de pólen
apícola

Illana Louise Pereira de Melo

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Ligia Bicudo de Almeida Muradian

São Paulo
2008
19.283

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013893

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Melo, Illana Louise Pereira de
M528e Estabilidade das vitaminas antioxidantes em amostras de
pólen apícola / Illana Louise Pereira de Melo. -- São Paulo,
2008.
90p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Muradian, Ligia Bicudo de Almeida

I. Vitamina : Ciências dos alimentos 2. Antioxidante : Ciência
dos alimentos 4. Bromatologia I. T. II. Muradian, Ligia Bicudo
de Almeida, orientador.

641.18 CDD

Illana Louise Pereira de Melo

Estabilidade das vitaminas antioxidantes em amostras de pólen
apícola

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a Dr.^a Ligia Bicudo de Almeida Muradian
Orientador / Presidente

Prof. Dr. Odeir Zenebon
1º. examinador

Profa. Dra. Marilene De Vuono Camargo
2º. examinador
Penteado

São Paulo, 18 de setembro de 2008.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

A Rodrigo, companheiro querido e principal
incentivador, pela força e apoio constante
durante a realização deste trabalho.

A Ivo Pereira e Maria de Fátima, pais
amados, pela dedicação e amor incondicional;
pela confiança, compreensão e paciência
com minha ausência durante este tempo.

Aos queridos Braz Neto (irmão) e Mirella
(cunhada), pelo carinho e apoio dedicado aos
meus pais durante a minha ausência.

Aos meus lindos e adorados sobrinhos
(Isabella e Fellipe), pelo carinho e por
proporcionar momentos de tanta alegria e
descontração durante as férias.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Ligia B. de Almeida Muradian, pela confiança depositada e pelo carinho com que me recebeu e orientou na realização desta pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos e incentivo, sempre valorizando meu trabalho e idéias.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo incentivo à pesquisa e bolsa concedida.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro de auxílio à pesquisa, tornando viável o desenvolvimento do trabalho.

À PRONATU Laboratório de Produtos Naturais LTDA, pelo fornecimento das amostras e por nos proporcionar uma visita de campo tão produtiva e acolhedora. Agradeço em especial à Fabrícia, funcionária tão prestativa e sempre acessível, pelo intermédio da parceria e pela amizade que se iniciou.

Aos Apicultores que gentilmente forneceram as amostras preliminares, tão importantes no desenvolvimento inicial deste trabalho.

À Dra. Ortrud Monika Barth Schatzmayr e seu orientado Alex da S. Freitas, do Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio na análise polínica, atenção e valiosas contribuições.

Aos professores do departamento de alimentos e nutrição experimental (FCF/USP) pelos ensinamentos transmitidos. Em especial aos professores Jorge Mancini Filho, Inar Castro e Ursula M. Lanfer Márquez pelo apoio técnico e ensinamentos durante a realização do Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À minha banca de qualificação: Dra. Marilene De Vuono C. Penteado e Dra. Myrna Sabino, pela atenciosa correção deste trabalho e preciosas sugestões.

Aos funcionários Rosa e Lurdinha, que tanto trabalharam pela ordem, organização e limpeza do laboratório; Elaine, Jorge, Edílson, Mônica e Cléo, pela atenção, carinho e eficiência no desempenho dos seus trabalhos tão importantes no andamento da Pós-Graduação; Cida e Jozefa, pela alegria proporcionada nos momentos de descontração regados a café.

A Roberto Dimenstein (professor da UFRN) e a sua pupila Karla Danielly (amiga querida), pelos ensinamentos, amizade e companheirismo durante a graduação e, principalmente, pelo incentivo à minha vinda para São Paulo a fim de realizar este trabalho. Vocês são muito especiais.

À Karla Oliveira, pela ajuda e informações oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho, pelas caronas, conversas, desabafos e, especialmente, pelos momentos de descontração e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Alimentos pela amizade, convívio, carinho, conversas, risadas e momentos de descontração durante o cafezinho, tornando os dias mais suaves e alegres. E, principalmente, pelas pequenas e grandes ajudas no dia-a-dia que de uma forma ou de outra contribuíram para continuidade deste trabalho. Em especial, agradeço:

- À Marina Moriya, dedicada aluna de iniciação científica, pela ajuda preciosa nas etapas iniciais dos experimentos, pela companhia nos momentos trabalhosos e pesados do dia-a-dia e, principalmente, pelas conversas, risadas e amizade.
- À Luciana Yoshime, amiga especial, pelo exemplo de responsabilidade, sensibilidade, dedicação e cumplicidade. Obrigada pela ajuda, sugestões, ensinamentos, conversas preciosas, palavras de apoio e incentivo os quais foram indispensáveis no andamento deste trabalho. Obrigada ainda pela paciência comigo e pelo carinho e amizade tão preciosa.
- À Bárbara Bicalho, amiga querida, pelas palavras de apoio, conversas, desabafos, discussões e risadas compartilhadas. Obrigada pela companhia e momentos maravilhosos que tornaram meus dias mais fáceis e felizes. Você é mais que uma amiga especial, é minha irmã do coração.
- À Otília Teixeira, Daniela Borrmann, Thais Campos e Cinthya Higashi, pela amizade e momentos de descontração;
- À Simone, Cristina e Nádia, pelo carinho, companhia e conversas regadas a café;
- À Isabel Massaretto, exemplo de doçura, alegria e honestidade, pelo carinho e amizade;
- À Juliana Almeida, exemplo de alegria e espontaneidade, que foi me conquistando aos poucos e hoje se tornou uma grande amiga;
- E, aqueles que participam ou participaram do grupo da prof.^ª Ligia: Graziela, Alexandre Bera, Fernando, Victor, Aline, Renato e, especialmente, a Vanilda (companheira no trabalho com o pólen e amiga), pela ajuda, conversas e companheirismo na jornada de trabalho.

Finalmente, agradeço a todos os amigos que estão próximos ou distantes, os quais contribuíram carinhosamente torcendo pela realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Polén.....	3
2.1.1 Definição e funções.....	3
2.1.2 Importância do pólen para as abelhas.....	4
2.2.3 Palinologia.....	6
2.2 Pólen apícola.....	7
2.2.1 Definição e funções.....	7
2.2.2 Composição físico-química e valor nutricional.....	8
2.2.3 Produção do pólen apícola.....	10
2.2.4 Controle de qualidade do pólen apícola.....	12
2.2.5 Estabilidade do pólen apícola.....	14
2.2.6 Consumo de pólen e importância para a saúde dos humanos.....	16
2.3 Vitaminas.....	17
2.3.1 Definição e funções.....	17
2.3.2 Vitamina C.....	19
2.3.3 Vitamina E.....	24
2.3.4 Carotenóides.....	28
2.4 Vitaminas no pólen apícola.....	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Material.....	37
4.1.1 Amostragem.....	37

4.1.2 Reagentes.....	40
4.2 Métodos.....	40
4.2.1 Determinação da umidade.....	40
4.2.2 Determinação da vitamina C (ácido ascórbico).....	41
4.2.3 Determinação da vitamina E (α -tocoferol).....	43
4.2.4 Determinação dos carotenóides totais, β -caroteno e teor pró-vitamínico A.....	44
4.2.5 Pureza dos padrões (α -tocoferol e β -caroteno).....	46
4.2.6 Validação dos métodos cromatográficos (α -tocoferol e β -caroteno).....	46
4.2.7 Análise da composição centesimal.....	47
4.2.8 Análise polínica (microscópica).....	48
4.2.9 Tratamento estatístico dos dados.....	49
4.2.10 Tratamento dos resíduos químicos.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Amostras preliminares (ano de 2006).....	51
5.1.1 Análise do pólen <i>in natura</i> e desidratado.....	51
5.1.2 Análise polínica.....	52
5.1.3 Análises do pólen desidratado após quatro meses de estocagem..	53
5.1.4 Comparação de métodos para a determinação de umidade.....	57
5.2 Amostras definitivas (ano de 2007).....	62
5.2.1 Análise do pólen <i>in natura</i> e desidratado.....	62
5.2.2 Análise polínica.....	66
5.2.3 Composição centesimal do pólen desidratado.....	68
5.2.4 Correlação entre os tipos polínicos e os nutrientes analisados....	69
5.2.5 Comparação da metodologia para análise de β -caroteno (CCA x CLAE)	71
5.2.6 Validação dos métodos cromatográficos.....	72
5.2.7 Análises do pólen desidratado após um ano de estocagem.....	73
6 CONCLUSÕES.....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS	

RESUMO

MELO, I. L. P. **Estabilidade das vitaminas antioxidantes em amostras de pólen apícola**. 2008. 90p. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.]

O pólen apícola apresenta elevadas porcentagens de nutrientes e pode ser utilizado como suplemento nutricional na alimentação humana. Este trabalho teve por objetivo principal avaliar a estabilidade das vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno) em pólen apícola durante um ano de estocagem. Foram adquiridos entre os meses de março e abril 2007 seis lotes de pólen apícola *in natura* e desidratado, diretamente de entrepostos de comercialização de produtos apícolas. Foram analisadas as concentrações das três vitaminas no tempo zero e em seguida as amostras foram armazenadas, em embalagens fornecidas pelo produtor, sob três formas: a temperatura ambiente; a temperatura ambiente, porém protegida da luz; e, em freezer. Foi utilizado o método titulométrico para análise de vitamina C. Para o β -caroteno utilizou-se a cromatografia em coluna aberta no tempo zero e a cromatografia líquida de alta eficiência após 6 e 12 meses de estocagem. Esta última foi utilizada para as análises da vitamina E. Foram realizadas ainda análises polínica e de composição centesimal. Foram encontradas as seguintes variações: $14 \pm 0,25$ a $119 \pm 1,96 \mu\text{g/g}$ para vitamina C, $19,43 \pm 1,70$ a $45,00 \pm 3,61 \mu\text{g/g}$ para vitamina E e $3,77 \pm 0,10$ a $99,27 \pm 2,45 \mu\text{g/g}$ para β -caroteno em amostras frescas. Após o processo de desidratação, houve uma alteração de 67,1% para mais na vitamina C (diferença significativa $p < 0,05$), uma perda de 18,7% para vitamina E e de 15,6% para β -caroteno. O valor pró-vitamínico A das amostras desidratadas variou de 0,26 a $6,48 \mu\text{g/g}$. A composição centesimal das amostras estudadas está de acordo com as especificações estabelecidas pela legislação brasileira em vigor (Instrução Normativa Nº 3, de 19/01/2001). Houve grande variabilidade dos tipos polínicos encontrados nas amostras e alguns deles estiveram fortemente correlacionados com os teores de vitamina C (Myrtaceae), de β -caroteno (Arecaceae, Cecropia e Fabaceae) e de lipídeos (Arecaceae e Fabaceae). Outros estiveram correlacionados de forma negativa, como é o caso dos tipos *Mimosa caesalpineafolia* e *Poaceae* com os níveis de β -caroteno, do tipo Arecaceae com as proteínas e do tipo *Mimosa*

caesalpineafolia com os lipídeos. A estocagem em freezer foi a condição mais eficiente na conservação das três vitaminas e a perda na estocagem a temperatura ambiente exposto a luz e protegido da luz foram semelhantes. Considerando-se as três condições estudadas, a vitamina E parece ser mais preservada durante a estocagem quando comparada à vitamina C e ao β -caroteno. Entretanto, conforme o teste estatístico realizado, houve perdas significativas ($p < 0,05$) apenas para a vitamina C em todas as condições estudadas quando comparadas a sua concentração inicial (tempo 0).

Palavras-chave: Pólen apícola. Vitamina C. Vitamina E. β -caroteno. Estabilidade das vitaminas.

ABSTRACT

MELO, I. L. P. **Stability of antioxidants vitamins in bee pollen sample**. 2008. 90p. [Pharmaceutical Science School, São Paulo University, São Paulo - Brazil, 2008.]

Bee pollen contains high percentages of nutrients and it can be used as a nutritional supplement for human feeding. The aim of this work was to evaluate the stability of the antioxidant vitamins (vitamin C, E and β -carotene) in bee pollen during one year of storage. Six batches of fresh and dried bee pollen pellets were acquired in 2007 March and April from bee products warehouses. The three vitamins were quantified and then stored under three forms in packages supplied by the producer: in room temperature, in room temperature protected from light and frozen. Vitamin C was quantified by potentiometric titration. The open column chromatography was used for β -carotene analyses in the zero time and the high performance liquid chromatography after 6 and 12 months storage. This last one was used for the vitamin E analyses. The centesimal composition and botanical characterization of the bee pollen were obtained. Vitamin content in fresh samples varied between 14 ± 0.25 and $119 \pm 1.96 \mu\text{g/g}$ for vitamin C; 19.43 ± 1.70 and $45.00 \pm 3.61 \mu\text{g/g}$ for vitamin E and 3.77 ± 0.10 and $99.27 \pm 2.45 \mu\text{g/g}$ for β -carotene. After the drying process a significant alteration of 67.1% for more in the vitamin C ($p < 0.05$), a losses of 18.7% for vitamin E and 15.6% for β -carotene were observed. The provitamin A value was between 0.26 and $6.48 \mu\text{g/g}$. The proximal composition of the samples studied presented results which were all in accordance to the specifications established for the Brazilian regulation (Normative Instruction N^o 3, 19/01/2001). A great variability of the pollen types was found in the samples and some of them were strongly correlated with the vitamin C (Myrtaceae), β -carotene (Arecaceae, Cecropia and Fabaceae) and lipids (Arecaceae and Fabaceae). Other ones were negatively correlated, such as *Mimosa caesalpineafolia* and Poaceae types with β -carotene, Arecaceae type with proteins and *Mimosa caesalpineafolia* type with lipids. Storage in freezer was more efficient to keep the vitamins and the losses at room temperature storage when exposed to light and in the dark were similar. Vitamin E was more preserved during the storage when compared to vitamin C and β -carotene. However, only vitamin C presented significant statistical losses ($p < 0.05$) in all of the studied conditions when compared to its initial content.

Key words: Bee pollen. Vitamin C. Vitamin E. β -carotene. Vitamins Stability.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição química apresentada por alguns autores em diferentes amostras de pólen apícola brasileiro.....	10
Tabela 2. Composição química e requisitos para o pólen apícola de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001).....	13
Tabela 3. Informações das amostras preliminares de pólen apícola.....	37
Tabela 4. Umidade e concentração de vitaminas antioxidantes nas amostras preliminares de pólen <i>in natura</i> e desidratadas.....	50
Tabela 5. Porcentagens de tipos polínicos obtidos nas amostras preliminares desidratadas de pólen apícola.....	52
Tabela 6. Teor de Vitamina C (mg/g) em amostras preliminares desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.....	53
Tabela 7. Teor de Vitamina E (µg/g) em amostras preliminares desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.....	54
Tabela 8. Teor de β-caroteno (µg/g) em amostras preliminares desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.....	54
Tabela 9. Teor de umidade das amostras desidratadas de pólen apícola por seis métodos diferentes.....	57
Tabela 10. Diferenças estatísticas entre os métodos de análise de umidade, de acordo com o teste de Tukey.....	58
Tabela 11. Comparação das médias de umidade encontradas neste trabalho com as encontradas por Serra-Bonvehí e Casanova (1987) em amostras da Espanha.....	59
Tabela 12. Umidade das amostras de pólen <i>in natura</i> e desidratadas.....	61
Tabela 13. Concentração das vitaminas C e E nas amostras de pólen <i>in natura</i> e desidratadas e sua perda após o processamento.....	62
Tabela 14. Concentração dos carotenóides totais, β-caroteno e seu valor pró-vitaminico A nas amostras de pólen <i>in natura</i> e desidratadas e sua perda pelo processamento.....	64
Tabela 15. Porcentagens de tipos polínicos obtidos em amostras desidratadas de pólen apícola.....	66

Tabela 16. Análise química das amostras desidratadas de pólen apícola e as Regulamentações Brasileira (BRASIL, 2001), Argentina (KRELL, 1996; CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, 1990) e Francesa (BOGDANOV, 2004).....	68
Tabela 17. Correlação entre os carotenóides totais e β -caroteno com alguns tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.....	70
Tabela 18. Comparação do conteúdo de β -caroteno ($\mu\text{g/g}$) no pólen apícola, usando CCA e CLAE.....	72
Tabela 19. Parâmetros de validação da determinação por HPLC de α -tocoferol e do β -caroteno.....	72
Tabela 20. Concentração de Vitamina C ($\mu\text{g/g}$) nas amostras desidratadas de pólen apícola após seis e doze meses de estocagem.....	74
Tabela 21. Concentração de Vitamina E ($\mu\text{g/g}$) nas amostras desidratadas de pólen apícola após seis e doze meses de estocagem.....	75
Tabela 22. Concentração de β -caroteno ($\mu\text{g/g}$) nas amostras desidratadas de pólen apícola após seis e doze meses de estocagem.....	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aparelho reprodutor da flor e camadas do grão de pólen.....	4
Figura 2. Abelha com carga de pólen na corbícula.....	5
Figura 3. Bolotas de pólen.....	7
Figura 4. Coleta de pólen (Apiário Trianoski – PRONATU).....	8
Figura 5. Estrutura química do ácido L-ascórbico.....	20
Figura 6. Estrutura química do α -tocoferol.....	25
Figura 7. Estrutura química do β -caroteno.....	30
Figura 8. Colméia de abelhas <i>Apis mellifera</i> com coletor de alvado (A) e coleta de pólen (B).....	38
Figura 9. Estufa (Ballardin®) com amostra de pólen.....	39
Figura 10. Amostras de pólen armazenadas nas embalagens originais.....	40
Figura 11. Teor de Vitamina E em amostras desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.....	55
Figura 12. Teor de β -caroteno em amostras desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.....	56
Figura 13. Valores médios de umidade encontrados em amostras desidratadas de pólen apícola por seis processos diferentes.....	58
Figura 14. Amostras de pólen após aplicação de métodos para a determinação de umidade.....	61
Figura 15. Tipos polínicos encontrados nas amostras desidratadas de pólen apícola.....	67
Figura 16. Comportamento da vitamina C em amostras desidratadas de pólen apícola após 6 e 12 meses de estocagem.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas contidas nas anteras dos estames das angiospermas e representam o gametófito masculino das plantas. Além de ser o próprio objeto da polinização, para muitos insetos, e especialmente para as abelhas, o pólen é a principal fonte de alimento não líquido. Portanto, o pólen tem grande importância na apicultura como fonte de proteínas, gorduras e minerais para as abelhas e como produto excedente do apiário (WITHERELL, 1975; BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002).

Segundo a Instrução Normativa N° 3, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001), define-se pólen apícola como o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colméia. Os grãos de pólen recolhidos das flores é colocado nas corbículas e transportado para a colméia (FUNARI *et al.*, 2003), onde são armazenados em alvéolos separadamente do mel, servindo para a alimentação das abelhas operárias e da cria (BARTH, 1989). O pólen apícola é coletado por uma grade de retenção, caindo em um recipiente coletor, conjunto este denominado de coletor de pólen (BARRETO, 2004).

Os maiores produtores de pólen apícola no mundo são China, Estados Unidos, México, Argentina, Austrália e Espanha (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; EATON e LAW, 2000). No Brasil, os maiores Estados produtores são Bahia, Santa Catarina e Paraná (BARRETO, 2004).

Os grãos de pólen variam quanto à forma, tamanho, cor e aparência e por isso, na prática, podem ser utilizados para identificar o gênero das plantas e algumas vezes, as espécies vegetais (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005). A composição química do pólen também varia com a espécie vegetal, condições ambientais (diferentes localidades, estações do ano e diferentes anos), idade e estado nutricional da planta (quando o pólen está se desenvolvendo) (FUNARI *et al.*, 2003).

O pólen apícola apresenta proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais em sua composição. Além disso, possui não só as vitaminas antioxidantes (vitaminas C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A), mas também as do complexo B e vitamina D (MUNITEGUI *et al.*, 1990; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997). As vitaminas

antioxidantes são capazes de estabilizar os radicais livres, responsáveis por muitas doenças degenerativas características do envelhecimento, que tanto podem ser provenientes do meio externo ou como resultantes naturais do metabolismo humano (ELLIOT, 1999).

O conteúdo de vitaminas do pólen e demais alimentos pode sofrer alteração com o processamento e a estocagem (ALBALÁ-HURTADO *et al.*, 1997). Como o pólen apícola apresenta em sua composição alto teor de umidade o que provoca sua rápida fermentação e deterioração (HERBERT Jr. e SHIMANUKI, 1978), o processo de desidratação é indispensável. Oliveira (2006) concluiu em seu estudo que houve perda das vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A) após o processo de desidratação do pólen apícola.

A Instrução Normativa N° 3, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001) não prevê qual o prazo de validade do pólen apícola desidratado. Barreto (2004), ao avaliar a vida de prateleira do pólen apícola desidratado através de análises sensoriais e de composição centesimal, concluiu que a mesma é variável em função da temperatura de armazenamento. Pelas análises organolépticas, o pólen tornou-se impróprio para o consumo aos 240 dias a temperatura ambiente e aos 360 dias na temperatura de -12°C. Como os alimentos não são necessariamente consumidos imediatamente após sua manufatura, como é o caso do pólen, e o conteúdo de vitaminas pode ser afetado por vários fatores tais como o tipo de embalagem e das condições e duração da estocagem (exemplos: exposição ao oxigênio, luz e temperaturas elevadas); justifica-se a realização do presente trabalho que tem o objetivo de avaliar a estabilidade das vitaminas antioxidantes do pólen apícola desidratado durante o período de um ano de estocagem.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pólen

2.1.1 Definição e funções

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas localizadas nas anteras dos estames das angiospermas e consistem nas células reprodutivas masculinas das plantas, com o propósito de transmitir seus gametas ao aparelho sexual feminino das flores (WITHERELL, 1975; SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996; MORETI *et al.*, 2002). A cada espécie vegetal corresponde um tipo de pólen, podendo-se dizer que o pólen é um “cartão de identidade” da planta considerada (BARRETO *et al.*, 2006).

Cada grão de pólen compreende uma única célula, que se apresenta envolvida por duas camadas protetoras, a exina e a intina, uma mais externa e a outra mais interna, respectivamente. A intina é composta basicamente por celulose e a exina de esporolenina, cuja origem acredita-se ser pela polimerização oxidativa de carotenóides (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CORNEJO, 1994). Os grãos de pólen possuem diâmetro entre 6 e 200µm, com formas e cores diversas; normalmente são esféricos e possuem poros na superfície, conforme as espécies de plantas da qual foram originados (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

O pólen pode ser transportado pelo vento, pela água, pássaros, morcegos ou por insetos (KRELL, 1996; VILLANUEVA *et al.*, 2002). Além de ser o próprio objeto da polinização, para muitos insetos, e especialmente para as abelhas, o pólen é a principal fonte de alimento não líquido (BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002).

A Figura 1 mostra o aparelho reprodutor da flor, sua localização e as camadas do grão de pólen.

Figura 1. Aparelho reprodutor da flor e camadas do grão de pólen.

[Fonte: <http://io.uwinnipeg.ca/~simmons1116imagesflowerdr.gif> e http://www.infovisual.info01023_en.html.jpg, acesso em 13/02/2008]

2.1.2 Importância do pólen para as abelhas

Para muitos insetos, e especialmente para as abelhas, o pólen é a principal fonte de alimento não líquido, sendo consumido pelas abelhas adultas e fornecido às larvas de operárias e zangões, após o terceiro dia de desenvolvimento. Além disso, contém a maioria, se não todos, os nutrientes essenciais para a produção de geléia real, com a qual são nutridas as larvas da abelha rainha e as larvas jovens de abelhas operárias. As abelhas operárias necessitam de se alimentar de pólen, o que propicia o bom desenvolvimento das glândulas produtoras da geléia real. Deste modo, o pólen é essencial para o crescimento normal e o desenvolvimento de todos os indivíduos de uma colônia de abelhas, bem como, é essencial para a reprodução das colônias (MORETI *et al.*, 2002).

O pólen é a mais importante fonte de proteínas para a sobrevivência das abelhas (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005; BARRETO *et al.*, 2005). A abelha coletora visita as flores e, nos estames, coleta o pólen e aglutina-o com néctar e substâncias salivares formando as bolotas de pólen (BARRETO *et al.*, 2006). A coleta é feita através das peças bucais e dos pêlos distribuídos em seu corpo, nos quais o pólen adere quando as abelhas visitam as flores. Em seguida, elas varrem o pólen de seu corpo com o auxílio das pernas e o acondicionam em depressões localizadas nos fêmures das pernas posteriores que recebem o nome de corbículas (Figura 2). Estas consistem em estrutura resultante de modificações na tíbia do terceiro par de pernas as quais se tornaram muito largas e ligeiramente côncavas na face externa, com pêlos de comprimento e formas variáveis dispostos a sua margem

(CORNEJO, 1994; MORETI *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2006). Posteriormente, o pólen coletado é estocado em células dos quadros e devido a ação de enzimas, presentes na saliva das abelhas, este pólen estocado sofre algumas transformações e recebe o nome de “pão de abelhas” (MORETI *et al.*, 2002; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005).

A quantidade de pólen carregado pelas abelhas melíferas é maior do que a coletada por outros insetos; alguns gêneros são capazes de carregar cargas de pólen de 10 a 12mg, igual aproximadamente a metade do peso de seu corpo (MORETI *et al.*, 2002). Segundo Funari *et al.* (2003) e Barreto *et al.* (2006), as abelhas africanizadas levam para a colméia uma carga média de pólen de 11,4mg, nas duas corbículas, o que corresponde a cerca de 17% do peso da operária coletora.

Figura 2. Abelha com carga de pólen na corbícula.

[Fonte: <http://gears.tucson.ars.ag.gov/beebook/worker/imgs/worker.gif>, acesso em 13/02/2008]

O pólen fornece a maioria dos nutrientes fundamentais para a produção de geléia real, a qual alimenta a abelha-rainha e as larvas das operárias nos primeiros dias de vida. Consiste na fonte de proteínas para a colméia, sendo responsável pelo bom desenvolvimento de glândulas, organismos vitais, tecidos, enfim para o crescimento individual das abelhas e de toda colônia (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997; VILLANUEVA, *et al.*, 2002). Portanto, o pólen tem grande importância na apicultura: como fonte de proteínas, gorduras, minerais e vitaminas para as abelhas e como produto excedente do apiário (WITHERELL, 1975; BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2006). Entretanto, nem todos os grãos de pólen têm igual valor nutritivo para as abelhas,

pois eles diferem em sua composição química de planta para planta. Abelhas alimentadas com determinados tipos de pólen, desenvolvem-se mais rapidamente do que com outros tipos (MORETI *et al.*, 2002). As abelhas conseguem melhor balanço nutricional pelo consumo de vários tipos de polens e sobrevivem mais tempo, pois os polens de diferentes plantas não têm o mesmo efeito fisiológico (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; BARRETO *et al.*, 2006).

2.1.3 Palinologia

Palinologia é uma palavra que deriva dos radicais latinos “pollen”, “pulvis” (pó, farinha fina) e do grego “logos” (conhecimento, palavra) e representa o ramo da Botânica que estuda o pólen através do tempo e sua morfologia (ZAFRA, 1979). As camadas que envolvem o grão de pólen possuem formas muito variadas (rugosas, lisas, com ou sem ornamentações), que permitem realizar as classificações sistemáticas, diferenciando assim as espécies botânicas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CORNEJO, 1994).

O conjunto de plantas úteis para as abelhas como fornecedoras de néctar, pólen e resinas é definido, pela maioria dos autores, como flora apícola. O Brasil possui uma abundante e variada flora apícola, capaz de produzir méis de primeira qualidade, com cores e sabores bastante diferenciados, e ainda, proporcionar ao apicultor outros produtos facilmente comercializados, como pólen e própolis. Entretanto, muitas informações a respeito da época de floração, abundância e importância das plantas apícolas como fornecedoras de pólen, néctar e/ou resinas para as abelhas, são ainda necessárias para que os apicultores possam utilizá-las no manejo dos apiários (MORETI *et al.*, 2002). E, devido à diversificada flora polínica, certamente, inúmeras espécies botânicas ainda não foram observadas pelo produtor apícola ou descritas na literatura científica (BARRETO *et al.*, 2006).

O valor potencial (capacidade produtiva) de um pasto apícola depende da quantidade de plantas apícolas presentes na área (ou da porcentagem da área total recoberta pela planta de interesse), do grau de homogeneidade ou heterogeneidade do pasto, da época ou estação do ano em que ocorre a florada principal para que esta seja melhor aproveitada e da duração do florescimento (MORETI *et al.*, 2002).

Os grãos de pólen variam quanto à forma, tamanho, cor e aparência e, por isso, na prática, podem ser utilizados para identificar o gênero das plantas e algumas vezes, as espécies vegetais (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; SÁNCHEZ, 2004; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005). E, por isso, a presença do pólen no mel e em outros produtos da colméia como cera e própolis, constitui um importante indicador da sua origem geográfica, principalmente, e da origem botânica (MORETI *et al.*, 2002). Na Figura 3 pode-se visualizar as diferentes cores das bolotas de pólen apícola.

Figura 3. Bolotas de pólen.

[Foto: Alexandre Bera]

2.2 Pólen Apícola

2.2.1 Definição e funções

Segundo a Instrução Normativa N° 3, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001), define-se pólen apícola como o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colméia.

O pólen apícola é coletado por uma grade de retenção, caindo em um recipiente coletor, conjunto este denominado de coletor de pólen (Figura 4). No final da coleta encontram-se reunidas as bolotas de grãos de coloração variável, indicando as diversas comunidades botânicas colecionadas pelas abelhas, formando uma mistura conhecida por “mix” polínico, sendo esse material removido pelo

apicultor para o beneficiamento, comercialização e consumo humano e animal (BARRETO *et al.*, 2006).

Figura 4. Coleta de pólen (Apiário Trianoski – PRONATU).

[Foto: Illana Louise]

De acordo com a Instrução Normativa N° 3 (BRASIL, 2001), o pólen apícola pode ser classificado conforme o teor de umidade para efeito de comercialização. Pólen apícola é o produto coletado na sua forma original e pólen apícola desidratado é o produto que passa pelo processo de desidratação, seguindo os procedimentos adequados de tratamento, com temperatura inferior a 42°C, e com teor de umidade inferior a 4% (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

2.2.2 Composição físico-química e valor nutricional

Os alimentos, por seu caráter biológico, podem conter diferentes teores de nutrientes em função da variedade, safra, solo, clima, produção, formulação, entre outros; desta forma, variações encontradas não podem ser consideradas erros (MENEZES *et al.*, 2003). Portanto, a variabilidade de dados é fato decorrente da própria natureza do objeto deste estudo – composição de alimentos.

A composição química do pólen também varia com a espécie vegetal, bem como as condições ambientais, idade e estado nutricional da planta quando o pólen está se desenvolvendo, em diferentes localidades, entre estações do ano e em diferentes anos (FUNARI *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2006). Além disso, as bolotas de pólen podem apresentar-se de várias cores, variando de branco e creme

para marrom escuro, apresentando-se amarelo, laranja, vermelho, esverdeado e graus de cinza, e isto depende da sua origem botânica e também da composição química destas substâncias (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005).

Em geral, os valores reportados em relação à composição química do pólen variam de 7,5 a 35% de proteínas; 15 a 50% de açúcares; 18% de amido e 5% de lipídeos, o que lhe confere um baixo valor calórico. Os ácidos graxos também estão presentes no pólen, entre eles os ácidos mirístico, linoléico, oléico, esteárico e o palmítico em maior quantidade. Bastos *et al.* (2004) analisaram 14 amostras desidratadas de pólen apícola e constataram uma composição variada de ácidos graxos, sendo que todas as amostras continham os ácidos oléico, linoléico e araquídico e apenas uma delas não apresentava o ácido palmítico. Os teores de ácidos graxos insaturados variaram de 18,6 a 55,9%, sugerindo que o pólen representa uma boa fonte destes compostos para a dieta. Todos os aminoácidos essenciais são encontrados no pólen, sendo a prolina o mais abundante (CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997; KRELL, 1996). Segundo Donadieu (1979) *apud* Barreto *et al.* (2006), grande parte da composição protéica do pólen se apresenta na forma de aminoácidos livres, sendo eles: ácido glutâmico, arginina, cistina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina, muitos desses essenciais.

Outros componentes encontrados em menor quantidade no pólen são os minerais (K, Na, Ca, Mg, P, S, traços de Al, B, Cl, Cu, I, Fe, Mn, Ni, Si, Ti e Zn), enzimas, terpenos, ácidos nucleicos e reguladores de crescimento (KRELL, 1996). Além disso, possui não só as vitaminas antioxidantes (vitaminas C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A) como as do complexo B e vitamina D (MUNIATEGUI *et al.*, 1990; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997; BARRETO *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2006). De acordo com Funari *et al.* (2003), os polens coletados na região de Botucatu, Estado de São Paulo, apresentaram elevadas porcentagens de nutrientes e podem ser utilizados como suplemento nutricional na alimentação humana.

Estudos internacionais demonstraram que a composição do pólen é variável, sendo 20% e 14% de proteínas, 37% e 71% de carboidratos totais, 5% e 7% de lipídeos, 3% e 2% de cinzas, segundo Krell (1996) e Villanueva *et al.* (2002), respectivamente. Campos *et al.* (2008), ao analisarem várias referências internacionais de composição centesimal do pólen apícola desidratado, relataram valores de proteínas, lipídeos, carboidratos totais e cinzas variando de 10 a 40%, 1 a 13%, 13 a 55% e 2 a 6%,

respectivamente. Na Tabela 1 está apresentada a composição química em diferentes amostras de pólen apícola brasileiro, segundo alguns autores.

Tabela 1. Composição química apresentada por alguns autores em diferentes amostras de pólen apícola brasileiro.

Componentes	Referências					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Umidade (%)	-	8,78	24,1	7,4	3,96	23,6
Proteínas (%)	21	21,20	26,2	21	15,78	21,4
Fibra bruta (%)	NA	NA	1,1	NA	4,60	NA
Açúcares totais (%)	NA	NA	NA	NA	37,36	28,4
Lipídeos (%)	3,0	8,80	5,1	7,0	3,82	3,6
Cinzas (%)	3,0	2,79	2,6	2,4	2,89	2,9

(1) = REIS e MARCHINI, 2000 (Piracicaba – SP);

(2) = BASTOS *et al.*, 2003 (Estados de SP e MG);

(3) = FUNARI *et al.*, 2003 (Botucatu – SP);

(4) = ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005 (Região Sul do Brasil);

(5) = BARRETO *et al.*, 2006 (várias regiões do Brasil);

(6) = MARCHINI, REIS e MORETI, 2006 (Piracicaba – SP);

NA = não analisado.

2.2.3 Produção do pólen apícola

Alguns fatores influenciam a produção satisfatória de pólen apícola, tais como: a qualidade e condições da rainha, que deve ser jovem, sadia e de alta postura; o estado sanitário e nutricional da colméia; o conhecimento técnico por parte do apicultor, para que as colméias sejam dispostas em locais adequados e que sejam realizados os trabalhos de manutenção e revisão das mesmas; o conhecimento da flora e do calendário apícola regional a fim de se obter resultados satisfatórios durante a coleta; e, as condições climáticas favoráveis à prática apícola (CORNEJO, 1994).

As etapas de produção do pólen apícola são: congelamento, descongelamento gradual e desidratação em estufa (40°C), ventilação em túnel de ar seco para a remoção de partículas leves, seguido da etapa de limpeza e o envase (SALOMÉ e SALOMÉ, 1998; BARRETO *et al.*, 2005). O produto final poderá ser envasado de forma fracionada para ser destinado imediatamente ao mercado consumidor, ou ser

armazenado em tambores de papelão contendo internamente um saco plástico atóxico (BARRETO *et al.*, 2005). De acordo com Cornejo (1994), o pólen deve ser seco, limpo, desinfetado, macerado e depois envasado.

Os maiores produtores de pólen apícola no mundo são China, Estados Unidos, México, Argentina, Austrália e Espanha (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; EATON e LAW, 2000). A Espanha é o principal país exportador da Comunidade Européia, sendo um dos primeiros a estabelecer normas para a padronização do pólen apícola (BARRETO *et al.*, 2006).

No Brasil, a produção de pólen apícola iniciou-se de forma modesta no final da década de 80. Nos dias atuais, o mercado favorável ao consumo de produtos naturais, complementares à dieta ou com efeitos terapêuticos, vem estimulando e promovendo a produção desta modalidade da cadeia produtiva apícola (BARRETO *et al.*, 2005). Os números da produção de pólen brasileiro são estimados na ordem de 200 toneladas ao ano, sendo os maiores Estados produtores: Bahia, Santa Catarina e Paraná (BARRETO, 2004).

Barreto *et al.* (2006) ao realizar uma coleta de dados para caracterizar o perfil da produção do pólen apícola brasileiro, mostraram em seus resultados a existência de dois importantes pólos produtivos no país: a região Sul, tendo Santa Catarina como principal Estado produtor, e o Nordeste, tendo a Bahia como principal produtor. Os autores verificaram ainda que, existem regiões brasileiras não produtoras de pólen, porém com alto potencial produtivo como os Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Ceará; os quais relataram que, ao longo do ano, as colméias produtoras de mel apresentavam grande estocagem de pólen nos alvéolos das áreas de cria, levando os apicultores a instalarem coletores apenas para impedirem sua estocagem.

Quanto à rota de comercialização do pólen apícola, os Estados brasileiros, em sua maioria, produzem para o seu abastecimento interno. O Estado do Paraná comercializa pólen principalmente para os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A Bahia atende a demanda dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul e Distrito Federal. Santa Catarina, além de distribuir o produto em praticamente todos os Estados do Brasil, conta com um produtor exportando para Colômbia e Uruguai (BARRETO *et al.*, 2006).

A Confederação Brasileira de Apicultura (CBA) informou que, até 2004, a organização da Apicultura Brasileira apresentou dezesseis Federações e

Associações Apícolas, compreendendo os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Tocantins, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Paraíba e Ceará (BARRETO *et al.*, 2006).

2.2.4 Controle de qualidade do pólen apícola

É crescente a preocupação de consumidores e países desenvolvidos com a qualidade dos alimentos e a conseqüente redução dos riscos à saúde. Segundo Bogdanov *et al.* (2004), o pólen vem ganhando destaque como um alimento diferenciado que possui efeitos benéficos à saúde humana e, devido ao seu alto teor de proteínas, o pólen pode perder o valor nutricional rapidamente se manipulado ou armazenado incorretamente.

Além do Brasil, apenas alguns países como Espanha, Suíça, Argentina e França têm reconhecido legalmente o pólen como um complemento alimentar e apresentando seu padrão de identidade e qualidade, assim como os limites de cada parâmetro a ser analisado. Embora comercializado em muitas lojas de alimentos saudáveis, o pólen não é considerado um aditivo alimentar pela "Food and Drug Administration" (FDA) dos Estados Unidos e não tem sido comercializado com padrões especiais (KRELL, 1996; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005).

A regulamentação brasileira sobre a qualidade do pólen apícola desidratado foi publicada em 19 de Janeiro de 2001, Instrução Normativa Nº 3 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Apícolas (BRASIL, 2001). Na Tabela 2 estão descritos os limites preconizados pela legislação brasileira para a produção do pólen apícola.

Tabela 2. Composição química e requisitos para o pólen apícola de acordo com legislação brasileira (BRASIL, 2001).

Requisitos	Resultados
Aroma	Característico, de acordo com origem floral.
Cor	Característica, de acordo com origem floral.
Aspecto	Grãos heterogêneos de forma e tamanhos variados, tendendo a esféricos.
Sabor	Característico
Umidade	Fresco: máximo 30% Desidratado: máximo 4 %
Cinzas	Máximo de 4%; m/m, na base seca.
Lipídeos	Mínimo de 1,8%; m/m, na base seca.
Proteínas	Mínimo de 8%; m/m, na base seca.
Açúcares totais	14,5% a 55,0%; m/m, na base seca.
Fibra bruta	Mínimo de 2%; m/m, na base seca.
Acidez livre	Máximo de 300 mEq/kg
pH	4 a 6

Entretanto, muitas questões básicas ainda deverão ser esclarecidas para assegurar a qualidade do produto para o consumo, a partir do monitoramento da produção e armazenamento do mesmo (BARRETO *et al.*, 2006). Segundo Barreto *et al.* (2005), na legislação em vigor, vários regulamentos específicos ainda não foram elaborados, como por exemplo, para a questão dos possíveis contaminantes orgânicos e inorgânicos. Além disso, provavelmente pela falta de respaldo científico, a Regulamentação Brasileira não prevê qual o prazo de validade do pólen apícola desidratado. Barreto *et al.* (2005), ao realizar o levantamento de informações quanto à embalagem de acondicionamento do pólen apícola desidratado proveniente de sete diferentes Estados brasileiros, observaram que 59% das amostras eram comercializadas em embalagens de vidro e 41% em embalagens plásticas (potes ou

sacos) e encontraram nos rótulos das embalagens prazos de validade do produto variando de seis meses a três anos.

Não existem dúvidas sobre as ações benéficas do pólen apícola à saúde humana; porém, há questões básicas pendentes a serem esclarecidas visando assegurar a qualidade do produto para o consumo, a partir do monitoramento da produção, elaboração e armazenamento do mesmo (BARRETO *et al.*, 2006).

A *International Honey Commission* (IHC) preocupada com o fato de não haver padrão internacional para o pólen apícola, criou um grupo de estudo, para que baseado em padrões nacionais de cada país se proponha um padrão de identidade e qualidade mundial para este produto. O presente trabalho faz parte desta atividade e foi parcialmente apresentado no Congresso Mundial de Apicultura – APIMONDIA, em Melbourne, Austrália, em 2007.

2.2.5 Estabilidade do pólen apícola

Existe uma série de fatores que influenciam na estabilidade dos nutrientes durante sua manipulação, processamento e armazenamento. Uns são intrínsecos do alimento e outros do ambiente que os rodeiam. Os fatores intrínsecos são as propriedades do produto final tais como: pH e acidez total, oxigênio disponível, os nutrientes, microflora natural e remanescente pós-processo, compostos bioquímicos do alimento como as enzimas e uso de aditivos químicos. Os fatores ambientais incluem o perfil tempo/temperatura durante o processamento, controle da temperatura durante o armazenamento e distribuição, exposição à luz, contaminação microbiana durante o processamento, armazenamento e distribuição, a atmosfera dentro da embalagem, o tratamento térmico durante a preparação final e a manipulação. A interação destes fatores pode inibir ou estimular um número de processos que limita a vida útil de um produto. O valor nutricional de um alimento resulta da somatória total de perdas que vão desde o início da cadeia de produção até o consumidor final. A severidade dos processos na elaboração dos produtos finais influi gradualmente na deterioração dos nutrientes (KILCAST e SUBRAMANIAN, 2000 *apud* TORRES *et al.*, 2003).

Como o pólen apícola apresenta em sua composição alto teor de umidade, que provoca sua rápida fermentação e deterioração (HERBERT Jr. e SHIMANUKI, 1978),

o processo de desidratação é indispensável. O teor de umidade é utilizado para o controle biológico no armazenamento e a comercialização do produto (SILVA *et al.*, 2001). Segundo Cecchi (2003), a determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos, pois está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição podendo afetar os seguintes itens: estocagem, embalagem e processamento. Apesar dos índices de umidade no pólen fresco serem variáveis, dependendo do período de produção, tais variações deveriam desaparecer após o período de processamento que inclui a etapa de desidratação do produto até que sua umidade atinja o máximo de 4%. A grande variedade verificada no teor de água do pólen apícola sugere heterogeneidade entre os produtores de pólen quanto ao nível de conhecimento e emprego da tecnologia de processamento (BARRETO *et al.*, 2005). Além disso, um incremento da temperatura de desidratação aumenta a velocidade de desidratação, porém também incrementa a taxa de reações indesejáveis, como a perda de vitaminas, e mudanças desfavoráveis na textura. Condições severas de desidratação podem produzir a ruptura de células, pondo em contato enzimas e substratos, promovendo reações deteriorativas (RINCÓN, 2003).

O pólen apícola, assim como outros alimentos ricos em proteínas, pode perder o valor nutricional rapidamente se armazenado de forma incorreta (CORNEJO, 1994). Tanto do ponto de vista organoléptico quanto nutricional, o congelamento do alimento é o melhor método de preservação do mesmo. A temperatura deve ser ajustada entre o ótimo e o prático, sendo usualmente de -18°C. Não há perdas durante o congelamento, exceto da vitamina C e desta apenas entre 0 e 10% (RINCÓN, 2003). Segundo Cornejo (1994) e Krell (1996), à temperatura ambiente, o pólen fresco perde sua qualidade em poucos dias. Congelado, as perdas aumentam muito após um ano, porém se for desidratado a pelo menos 10% (preferencialmente 5%) de umidade, pode ser mantido por meses sob temperatura ambiente e protegido da luz solar direta.

Barreto *et al.* (2006), ao avaliarem a vida de prateleira do pólen apícola desidratado concluiu que a mesma é variável em função da temperatura de armazenamento e que as análises físico-químicas devem ser acompanhadas das análises organolépticas. Pelas análises organolépticas, o pólen tornou-se impróprio para o consumo aos 240 dias a temperatura ambiente (média anual de 25,81°C), sofrendo processo de escurecimento e tornando-se amargo por reação de Maillard.

As amostras mantidas a -12°C foram as que apresentaram maior durabilidade, sendo rejeitadas após 360 dias. Com relação às análises físico-químicas, as amostras de pólen permaneceram dentro dos parâmetros estabelecidos na legislação vigente, com exceção da acidez livre e açúcares totais.

Devido à importância nutricional e funcional dos componentes presentes nos alimentos, é necessário controlar e supervisionar os distintos processos de elaboração, de tal forma que se garanta que os alimentos processados forneçam ao consumidor todos os nutrientes em sua forma mais disponível, além de cobrir seus requerimentos e conservar suas propriedades organolépticas (TORRES *et al.*, 2003).

2.2.6 Consumo de pólen e importância para a saúde dos humanos

Um novo paradigma dieta-saúde tem sido desenvolvido nos últimos anos, enfatizando os aspectos positivos da dieta e identificando os componentes fisiologicamente ativos que contribuem na prevenção de alguma enfermidade (RINCÓN, 2003). Segundo Barreto *et al.* (2006), o pólen apresenta numerosas propriedades terapêuticas e medicinais devido ao seu conteúdo de aminoácidos, sua riqueza em minerais, vitaminas, ácidos graxos essenciais, enzimas e substâncias bioativas. Ao longo dos anos, o pólen tem sido utilizado internacionalmente devido a seus efeitos benéficos à saúde. Um dos efeitos atribuídos ao pólen é sua habilidade de reduzir os danos causados pelo envelhecimento, além de melhorar a saúde, de aumentar a energia vital e melhorar o sistema imunológico das pessoas (CORNEJO, 1994; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997). Os benefícios cientificamente comprovados associados ao consumo de pólen apícola, se relacionam a problemas da próstata (KRELL, 1996; SHOSKES e MANICKAM, 2003), a dessensibilização frente às alergias, ao ganho de peso em animais com alimentação suplementada de pólen apícola, efeito bacteriostático e bactericida, proteção contra efeitos adversos dos raios X nos tratamentos com uso de radiação (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996; EATON e LAW, 2000) e possui ação sobre o sistema digestivo regulando o seu funcionamento e equilibrando a flora intestinal (SALOMÉ e SALOMÉ, 1998).

Porém, muitos efeitos benéficos atribuídos ao consumo de pólen apícola descritos na literatura não têm comprovação científica, como o relato de desempenho

de atletas, de vitalidade da pele, melhora e cura da acne, anemia, úlceras, hipertensão, resfriados entre outros (KRELL, 1996). Campos, Cunha e Markham (1997) relatam ainda que o pólen apícola apresenta atividade antioxidante ou anti-radicais livres, o que atribui ao pólen apícola propriedades regenerativas para o organismo e vida longa aos usuários freqüentes desse produto.

Atualmente, a maior utilidade do pólen apícola é como suplemento alimentar natural, embora não deva ser considerado um alimento perfeito, já que possui baixos teores de lipídeos e conseqüentemente de vitaminas lipossolúveis. Porém, o valor nutricional do pólen apícola deve ser de particular interesse para aqueles que têm uma dieta desbalanceada ou deficiente e para a comunidade científica, diante dos potenciais benefícios deste produto para a sociedade (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996). A recomendação diária para consumo de pólen é de 5 a 25g (CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997; BASTOS *et al.*, 2003) e seu valor calórico é cerca de 235 a 274kcal/100g em amostras brasileiras (BARRETO *et al.*, 2006).

2.3 Vitaminas

2.3.1 Definição e funções

O conceito de vitamina é relativamente novo quando comparado aos de outros nutrientes, como proteína ou gordura. Seu surgimento marcou o nascimento do campo da nutrição como ciência há somente 100 anos. Por séculos se soube que certas doenças estavam relacionadas à dieta: o escorbuto poderia ser prevenido consumindo-se vegetais verdes ou frutas; a cegueira noturna poderia ser tratada com fígado; o beribéri estava associado à grande dependência de arroz polido como o principal alimento; etc. Porém, apenas em 1906 foi publicada a primeira elaboração de um conceito de micronutriente essencial num momento em que se pensava que a boa nutrição envolvia apenas proteínas, gorduras, carboidratos e minerais (COMBS, 2002).

A palavra vitamina tem origem latina, cujo termo “vita” significa “vida” e o término “min” é um agregado científico cujo significado é “essencial” (SÁNCHEZ, 2004). Portanto, as vitaminas são micronutrientes essenciais que contribuem para o crescimento normal e a manutenção da saúde (BIANCHINI e PENTEADO, 1999).

O termo vitamina surgiu para descrever um grupo de micronutrientes essenciais que geralmente satisfazem os seguintes critérios: um componente orgânico distinto das gorduras, carboidratos e proteínas; um componente natural dos alimentos no qual é usualmente encontrado em quantidades mínimas; não sintetizado pelo hospedeiro em quantidades adequadas para atingir as necessidades fisiológicas normais; essencial, também usualmente em quantidades mínimas, para a função fisiológica normal (ou seja, manutenção, crescimento, desenvolvimento, reprodução); e, por sua ausência ou subutilização, causa uma síndrome de deficiência específica (COMBS, 2002). As vitaminas são quantitativamente os compostos minoritários dos alimentos. Em geral, não são sintetizadas pelo organismo e algumas em quantidades insuficientes, por isso, se têm que obtê-las principalmente através dos alimentos. Compreendem um grupo amplo de compostos orgânicos que do ponto de vista nutritivo denominam-se micronutrientes essenciais e as funções que desempenham são múltiplas (TORRES *et al.*, 2003).

As vitaminas são classificadas quanto à solubilidade em lipossolúveis e hidrossolúveis. As primeiras constituem um grupo de substâncias químicas, com estrutura variada, solúveis em solventes orgânicos, que podem ser armazenadas na gordura corpórea e atingir níveis tóxicos. São lipossolúveis as vitaminas A, D, E e K. As vitaminas hidrossolúveis, de maneira geral, não são armazenadas em quantidades significativas no organismo, e compreendem as vitaminas do complexo B e a vitamina C (BIANCHI *et al.*, 2006; COMBS, 2002). As funções das vitaminas são determinadas por suas propriedades químicas e físicas associadas (COMBS, 2002).

As 13 famílias de vitaminas compreendem duas a três vezes o número de vitâmeros importantes, que são as formas múltiplas (todos os isômeros e análogos ativos) das vitaminas. O tipo de função metabólica de um vitâmero em particular depende de sua distribuição tecidual/celular e atividade química, ambas as funções direta ou indireta de sua estrutura química (COMBS, 2002).

Vitaminas antioxidantes:

Geralmente em nossa dieta consumimos antioxidantes reconhecidos como nutrientes essenciais e antioxidantes não nutritivos. Entre os antioxidantes nutritivos temos a vitamina E, a vitamina C ou ácido ascórbico, vitamina A e seu precursor

β -caroteno e a vitamina B₂ ou riboflavina, importante co-fator em sistemas enzimáticos antioxidantes (RINCÓN, 2003).

Estudos epidemiológicos indicam que carotenóides, vitamina C e vitamina E estão entre os constituintes da dieta postulados como tendo papel preventivo no câncer e doenças cardíacas. Portanto, tem sido feita recomendações para aumentar a ingestão diária de frutas e vegetais ricos nesses nutrientes (ABUSHITA *et al.*, 2000).

2.3.2 Vitamina C

Introdução:

A vitamina C é o fator antiescorbútico, originalmente isolado do tecido supra-renal, laranjas e repolho. Apesar do escorbuto ter sido descrito pela primeira vez durante as Cruzadas e ocorrer comumente entre exploradores e viajantes, a relação específica entre o escorbuto, alimentos cítricos e ácido ascórbico não foi estabelecida até o século XX (COMBS, 2002). Sua importância cresceu ao longo do tempo, grande parte por causa das descobertas de seu potencial antioxidante (SILVA e COZZOLINO, 2007).

A vitamina C é também conhecida como ácido ascórbico, L-ácido ascórbico, ácido deidroascórbico, ascorbato e vitamina antiescorbútica (SILVA e COZZOLINO, 2007); sendo um derivado da hexose sintetizada por vegetais e animais que possuem a enzima *L-gulonolactona oxidase* a partir da glicose e galactose via ácido glucurônico (COMBS, 2002; SILVA e COZZOLINO, 2007). Na natureza, encontra-se sob duas formas: ácido L-ascórbico e o ácido L-deidroascórbico sendo o primeiro o de maior atividade vitamínica dentro deste grupo (TORRES *et al.*, 2003).

O ascorbato é a forma biologicamente ativa da vitamina C e pode ser reversivelmente oxidado formando semideidroascorbato e radical ascorbato. Este último, quando oxidado, forma o deidroascorbato. O semideidroascorbato pode ser bioquimicamente ativo, mas é mais provável que sua atividade esteja baseada na redução a ascorbato. A ação do deidroascorbato se dá do mesmo modo, ou seja, de forma indireta (SILVA e COZZOLINO, 2007).

Estrutura:

O termo vitamina C é usado para descrever genericamente todos os compostos que apresentam quantitativamente a atividade biológica do ácido ascórbico, o composto natural principal com a atividade da vitamina C (RIOS e PENTEADO, 2003). A molécula do ácido ascórbico (Figura 5) tem na sua fórmula estrutural dois grupos enólicos, o que lhe confere poder redutor (BADOLATO *et al.*, 1996).

Figura 5. Estrutura química do ácido L-ascórbico.

Funções:

A vitamina C atua em muitas funções metabólicas como um cofator enzimático, um agente protetor e um reagente com transição de íons metálicos. Cada uma destas funções envolve a propriedade química mais importante do ácido ascórbico de óxido-redução (COMBS, 2002; TORRES *et al.*, 2003). Como o ácido árcorbico perde elétrons facilmente e devido a sua oxidação monovalente reversível ao radical ascorbil, ele pode servir como um sistema redox bioquímico envolvido em muitas reações de transporte de elétrons, incluindo aquelas envolvidas na hidroxilação da prolina e lisina para a biossíntese de colágeno, na degradação de 4-hidroxifenilpiruvato, na síntese de norepinefrina, a partir da dopamina, e na dessaturação de ácidos graxos (COMBS, 2002; SILVA e COZZOLINO, 2007).

A vitamina C também tem ação na conversão do colesterol em ácidos biliares e no metabolismo iônico de minerais. O papel do ácido ascórbico como redutor biológico pode ser ligado também a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. Por ser solúvel em água, acredita-se que a vitamina C faça parte da primeira linha de defesa do organismo, e, por ter facilidade em doar elétrons, possui também ação antioxidante. Sua ação pode ser em espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, oxigênio singlete e hipoclorito. Os produtos de oxidação do ascorbato não apresentam toxicidade e são facilmente regenerados pelos redutantes glutatona e

NADP e/ou NADPH (SILVA e COZZOLINO, 2007). Devido a isto, a vitamina C ajuda a prevenir a oxidação das moléculas solúveis em água e também, indiretamente, protege as vitaminas A e E da oxidação (TORRES *et al.*, 2003).

Além disso, a vitamina C tem a função de reduzir o ferro férrico em ferroso no trato intestinal para facilitar a absorção e está envolvida na transferência de ferro da transferrina plasmática para ferritina hepática; também, promove a resistência a infecções através da atividade imunológica dos leucócitos, da produção de interferon, do processo de reação inflamatória ou da integridade das membranas mucosas (COMBS, 2002). Deve-se ainda salientar a ação do ascorbato na inibição da formação de nitrosaminas, reações entre nitritos e aminas naturalmente presentes nos alimentos sob as condições ácidas do estômago (SILVA e COZZOLINO, 2007).

O ascorbato, sendo um forte agente redutor, afeta o potencial redox do organismo. Sua ação como antioxidante se dá em razão de sua capacidade de “varrer” os radicais, reagindo com o radical superóxido e um próton para gerar peróxido de hidrogênio, ou com um radical hidroxila para gerar água. Em cada instante o produto formado é o radical monodeidroascorbato. Pode também reduzir o radical tocoferoxil, formado pela interação de α -tocoferol na membrana com peróxidos lipídicos. O ascorbato pode captar os radicais oxigênio, que de outra forma reagiriam para formar peróxidos lipídicos. Entretanto, em altas concentrações, o ascorbato pode ter ação pró-oxidante, reduzindo o oxigênio molecular a superóxido, podendo então ser oxidado a monodeidroascorbato (SILVA e COZZOLINO, 2007).

Estabilidade:

A vitamina C é a mais lábil das vitaminas e por isso, sua retenção é usada como índice de qualidade para a predição da vida útil dos alimentos (TORRES *et al.*, 2003). Entretanto, a qualidade do ácido ascórbico em produtos naturais é influenciada por uma série de fatores, tais como o tipo de solo, a forma do cultivo, as condições climáticas, procedimentos agrícolas para a colheita, modo de cocção e estocagem (BADOLATO *et al.*, 1996; SOUZA FILHO *et al.*, 1999; SILVA e COZZOLINO, 2007).

A perda do ácido ascórbico inicia-se logo após a colheita das frutas ou legumes, principalmente sob o efeito da ação enzimática. Portanto, é de se esperar que o teor vitamínico não seja constante durante o processamento de alimentos

industrializados, ocorrendo degradação parcial do ácido ascórbico até se chegar ao produto final (BADOLATO *et al.*, 1996). A maior perda ocorre durante o processamento e o armazenamento devido a oxidação, a qual é acelerada pela luz, oxigênio, calor, incremento de pH, atividade de água, presença de íons cobre e de sais de ferro (TORRES *et al.*, 2003).

A vitamina C é rapidamente perdida na cocção dos alimentos, devido principalmente à sua solubilidade em água (SILVA e COZZOLINO, 2007). Badolato *et al.* (1996) ao analisarem amostras de sucos naturais e industrializados (maracujá, goiaba, abacaxi, caju e uva), verificaram teores menores de ácido ascórbico nos sucos industrializados que nos das respectivas frutas naturais, apontando o processamento industrial desses sucos como sendo o responsável pela perda da vitamina. Souza Filho *et al.* (1999) ao avaliarem a estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados, concluíram que houve perda desta vitamina durante o processamento e armazenamento das amostras devido à aplicação de calor durante as etapas de branqueamento (23,3% de perda) e tratamento térmico (33,7% de perda).

A mínima temperatura de reação para a degradação da vitamina C é 23°C. Assim, para reter a vitamina C deve-se prestar atenção adequada na temperatura de armazenamento e conteúdo de oxigênio no envase. Adicionalmente, o peróxido de hidrogênio residual, proveniente da pré-esterilização do envase, pode acelerar a degradação do ácido ascórbico (RINCÓN, 2003).

O congelamento é o melhor método de conservação e preservação dos alimentos. Entretanto, há uma perda lenta de vitamina C em muitos alimentos a -18°C comparado com perdas de cinco vezes mais a -10°C (exceto para o suco de laranja onde as perdas são as mesmas nas duas temperaturas) (RINCÓN, 2003). De acordo com Yamashita *et al.* (2003), após quatro meses de armazenamento, as acerolas estocadas a -12°C e -18°C apresentaram uma perda de 43% e 19%, respectivamente, em relação ao teor inicial da vitamina C.

Recomendações:

A recomendação mínima para vitamina C foi estabelecida no estudo de Sheffield, que mostrou que uma ingestão de 5 a 10mg/dia era adequada para prevenir o desenvolvimento de escorbuto ou para curar os sinais clínicos. Entretanto, com esse nível de ingestão os indivíduos tinham dificuldades na cicatrização de

feridas, portanto a ingestão mínima necessária deveria ser 20mg/dia (SILVA e COZZOLINO, 2007). A base da Recomendação Dietética Adequada ou *Recommended Dietary Allowance* - RDA (1989) de 60mg foi a razão de *turnover* fracional médio observado de 3,2% de reservas corporais da ordem de 20mg/Kg de peso corporal/dia, admitindo-se uma absorção incompleta de ascorbato da dieta e variações individuais (SILVA e COZZOLINO, 2007).

Os valores diários recomendados de acordo com a Ingestão Dietética de Referência (IDR) ou *Dietary References Intakes* (DRI, 2000) para vitamina C é de 90mg para homens e mulheres a partir de 19 anos. As necessidades de vitamina C são maiores em períodos de gestação e lactação, perante doenças inflamatórias crônicas e agudas, após cirurgias e em pacientes com queimaduras graves (SILVA e COZZOLINO, 2007).

Há pouca evidência de qualquer toxicidade da alta ingestão dessa vitamina, embora alguns problemas potenciais possam existir. Doses de um grama têm sido consumidas sem efeitos adversos conhecidos, ao passo que dois gramas ou mais podem causar gastroenterite transiente ou diarreia osmótica em alguns indivíduos. A maioria dos efeitos adversos atribuídos à vitamina C, incluindo pedras renais de oxalato e excesso de ferro, não tem sido estabelecida em uma base factual (SILVA e COZZOLINO, 2007).

Hipovitaminose C:

Embora não haja um órgão específico para o armazenamento de vitamina C no organismo, os sinais de deficiência em indivíduos bem nutridos apenas se desenvolvem após 4 a 6 meses de baixa ingestão (geralmente menores que 10mg/dia), quando as concentrações plasmáticas e dos tecidos diminuem consideravelmente (SILVA e COZZOLINO, 2007).

Os primeiros sintomas de deficiência em vitamina C são esquimoses e petéquias. As esquimoses se tornam mais proeminentes, desenvolvendo hiperqueratose folicular, seguida de hemorragia ocular. Sintomas proeminentes são anormalidades psicológicas, como histeria e depressão. Fadiga e letargia são sintomas tardios. A deficiência em vitamina C, diferentemente da maioria das vitaminas, está associada com doenças específicas, sendo o escorbuto a principal delas. Os sintomas ocorrem quando o ascorbato corpóreo é depletado abaixo de 0,2mg/100mL no plasma (SILVA e COZZOLINO, 2007).

2.3.3 Vitamina E

Introdução:

A vitamina E foi descoberta nos anos 1920 como um fator lipossolúvel necessário para prevenir a morte fetal e a reabsorção em roedores. Quando quimicamente identificada, a vitamina foi chamada tocoferol, do grego *tokos* (parto) e *pherein* (suportar) (COMBS, 2002). O termo vitamina E incluem oito compostos lipossolúveis que se encontram na natureza, quatro deles são os tocoferóis e quatro os tocotrienóis (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003; TORRES *et al.*, 2003; COZZOLINO, 2007).

A vitamina E é conhecida hoje como possuidora de um papel fundamental no metabolismo normal de todas as células. Portanto, sua deficiência pode afetar vários sistemas orgânicos diferentes. Sua função está relacionada a vários outros nutrientes e fatores endógenos que, coletivamente, comprometem um sistema que protege contra os efeitos potencialmente prejudiciais das espécies reativas de oxigênio, que são formadas metabolicamente ou encontradas no ambiente (COMBS, 2002). Segundo Cozzolino (2007), a vitamina E é o principal antioxidante da membrana celular, capaz de inibir a ação dos radicais livres e, dessa forma, prevenir a propagação da peroxidação lipídica.

Estrutura:

O termo vitamina E se refere a uma família de oito compostos homólogos, que possuem um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral de natureza isoprênica, constituída por 16 átomos de carbono, sendo responsável pela lipossolubilidade da vitamina E. São os tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -) que possuem uma cadeia lateral saturada e os tocotrienóis (α -, β -, γ - e δ -) que apresentam uma cadeia lateral insaturada, com três duplas ligações nas posições 3', 7' e 11' (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003; COZZOLINO, 2007). Os diferentes isômeros destes compostos (α -, β -, γ - e δ -) diferem entre si pelo número e pela posição de grupos metil no anel cromanol. Assim, os α isômeros possuem grupos metil nas posições 5, 7 e 8 do anel, os β isômeros destes compostos nas posições 5 e 8, os γ nas posições 7 e 8 e os δ apenas na posição 8 do anel (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003). A estrutura do alfa-tocoferol pode ser visualizada na Figura 6.

Figura 6. Estrutura química do α -tocoferol.

Além desses compostos, existe a forma sintética da vitamina E, que consiste em uma mistura dos isômeros de ocorrência natural, tocoferóis e tocotrienóis, RRR- α -tocoferol (inicialmente chamado de d- α -tocoferol), α -tocoferol sintético, o qual consiste dos oito isômeros possíveis em quantidades praticamente iguais (*all rac- α -tocoferol* inicialmente chamado dl- α -tocoferol); ou seus ésteres (COZZOLINO, 2007).

O α -tocoferol é o composto mais conhecido e biologicamente mais ativo da vitamina E (TORRES *et al.*, 2003). Ele se apresenta como um óleo viscoso, inodoro e de cor amarelo-claro, sendo praticamente insolúvel em água e solúvel em óleos vegetais e solventes orgânicos como álcool, acetona, clorofórmio e éter. Sua absorção em ultravioleta é fraca (absorção máxima obtida em 292 e 298nm), sendo empregada principalmente a fluorescência como método de quantificação (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

Funções:

A vitamina E é o antioxidante lipossolúvel mais importante na célula. Localizada nos locais hidrofóbicos das membranas biológicas ela protege os fosfolipídios insaturados da membrana da degeneração oxidativa devido às espécies de oxigênio altamente reativas e outros radicais livres. A vitamina E desempenha esta função através de sua capacidade de reduzir tais radicais a metabólitos não prejudiciais – um processo chamado de “varredura” de radicais livres (MALLET *et al.*, 1994; COMBS, 2002; COZZOLINO, 2007).

Segundo Mallet *et al.* (1994), o α -tocoferol é um dos mais conhecidos e o mais eficiente antioxidante lipossolúvel de ocorrência natural. Em seu trabalho ele observou um coeficiente de correlação determinado por análise de regressão linear de 0,93 entre a concentração de α -tocoferol e a atividade antioxidante de vegetais folhosos.

Numerosas investigações têm sido dedicadas a atividade antioxidante do α -tocoferol, seja isolado ou em associação com sinergistas tal como o ácido ascórbico de ocorrência naturalmente comum (MALLET *et al.*, 1994). O tocoferol age de maneira catalítica como um antioxidante na membrana, interagindo não enzimaticamente com o ascorbato na fase aquosa da superfície da membrana. O radical tocoferoxil formado pela reação do α -tocoferol, pela reação com ascorbato para gerar o radical monodeidroascorbato, que por sua vez pode ser reduzido novamente para ascorbato ou pode sofrer dismutação para gerar deidroascorbato e ascorbato (COZZOLINO, 2007).

A sua função antioxidante sugere que a vitamina E e os nutrientes relacionados podem ser importantes coletivamente na proteção contra condições relacionadas ao estresse oxidativo, tais como envelhecimento, poluição do ar, artrite, câncer, doença cardiovascular, catarata, diabetes e infecções (COMBS, 2002). Entretanto, atualmente se acredita que a vitamina E possua outras funções além da sua indiscutível ação antioxidante (COZZOLINO, 2007)

Estabilidade:

A luz, o oxigênio e o calor são fatores que causam a perda de vitamina E durante o processamento e o armazenamento por sua função como antioxidante (TORRES *et al.*, 2003). A relativa estabilidade de lipídios hidroperóxidos em baixas temperaturas conduz a perdas de vitamina E durante o armazenamento (RINCÓN, 2003). De acordo com Abushita *et al.* (2000), ao analisarem a perda de tocoferóis durante o processamento da pasta de tomate, mostraram que houve uma perda de 20,3% do conteúdo de α -tocoferol durante o processamento térmico. Entretanto, de acordo com Bianchini-Pontuschka e Penteado (2003), a vitamina E é muito estável ao calor, não sendo destruída durante o cozimento normal de carnes e verduras.

Albalá-Hurtado *et al.* (2000), ao analisarem a estabilidade das vitaminas durante o período de estocagem de um ano em leites infantis líquidos e em pó (reconstituição de 15%), não encontraram diferença significativa no conteúdo de vitamina E nos leites armazenados nas três condições de temperatura (20, 30 e 37°C).

Recomendações:

A recomendação para ingestão de vitamina E (DRIs), elaborada para a população dos Estados Unidos e Canadá, foi baseada em estudos de indução da

deficiência em humanos e na correlação entre hidrólise do eritrócito induzida pelo peróxido de hidrogênio e a concentração de α -tocoferol no plasma (COZZOLINO, 2007). De acordo com a DRI (2000) a ingestão diária recomendada para vitamina E é de 15mg/dia para homens e mulheres acima de 14 anos.

Quantidades elevadas de ácidos graxos poliinsaturados na dieta podem aumentar as necessidades de vitamina E, pois quanto maior o número de ligações insaturadas, maior a possibilidade de peroxidação de ácidos graxos decorrentes da ação de radicais livres sobre eles. Considera-se que seja necessário de 0,4 a 0,5mg vitamina E/g ácido graxo poliinsaturado na dieta. Entretanto, esse não é um problema na prática, desde que os alimentos fontes de ácidos graxos poliinsaturados sejam também naturalmente ricos em tocoferóis e tocotrienóis (COZZOLINO, 2007).

A vitamina E tem muito pouca toxicidade. A Organização Mundial da Saúde estabeleceu uma ingestão diária aceitável entre 0,15 e 2,0mg α -tocoferol/kg de peso corporal, e ingestão habitual de suplementos de até 720mg/dia (comparados com uma média de ingestão diária de 8 a 12mg/dia) (COZZOLINO, 2007).

Hipovitaminose E:

A deficiência de vitamina E não é comum. Casos de deficiência foram observadas em animais experimentais, resultando em falha reprodutiva (esterilidade em ratos machos e reabsorção dos embriões no útero de fêmeas grávidas), danos hepáticos e renais e anormalidades neurológicas (COZZOLINO, 2007; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003). Em humanos, a deficiência ocorre principalmente em crianças prematuras de baixo peso e em pacientes com anormalidades na absorção de gorduras (COZZOLINO, 2007).

Em estudos de depleção, muitos meses são necessários antes que apareça qualquer queda significativa na concentração do tocoferol circulante nos indivíduos, indicando que as reservas nos tecidos são relativamente grandes. A deficiência também pode ocorrer por causa de anormalidades genéticas na α -TTP, que causa a síndrome de deficiência grave, cujos sintomas são principalmente neurológicos e incluem perda dos reflexos do tendão, ataxia cerebelar, disartria e retardo mental (COZZOLINO, 2007). Em prematuros, cujas reservas da vitamina são inadequadas, a deficiência em vitamina E provoca redução da vida média dos eritrócitos, que pode

progredir aumentando a hemólise intravascular e causando anemia hemolítica (COZZOLINO, 2007; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

2.3.4 Carotenóides

Introdução:

Os carotenóides são pigmentos naturais e constituem uma classe de fitoquímicos que têm recebido grande atenção nos últimos anos (AGOSTINE-COSTA *et al.*, 2003). São encontrados em animais (crustáceos, peixes, pássaros) e em vegetais (fotossintéticos e não fotossintéticos), sendo responsáveis pelas colorações que variam do amarelo ao vermelho (SANT'ANNA e PENTEADO, 1996; YUYAMA *et al.*, 2007). São encontrados ainda em algas, bactérias, fungos e leveduras (YUYAMA *et al.*, 2007).

Estes pigmentos têm despertado o interesse de estudiosos de diversas áreas há mais de um século devido ao fato de que, quando presente nos alimentos, além de contribuir com a cor, alguns pigmentos carotenóides exercem atividade pró-vitáminica A, desempenhando, portanto um importante papel nutricional; principalmente em países onde a deficiência de vitamina A é considerada um problema de saúde pública (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003).

Os carotenóides são compostos por mais de 400 substâncias diferentes, de ocorrência natural, sintetizadas por uma grande variedade de microorganismos fotossintéticos. O seu precursor comum, o fitoeno, um hidrocarboneto de 40 carbonos, é convertido em compostos mais insaturados α , β , γ e δ -carotenos. Aproximadamente 50 carotenóides possuem ação biológica de vitamina A e o de maior atividade *in vivo* é o β -caroteno, um dímero do retinol (BEITUNE *et al.*, 2003). Os carotenóides também devem possuir pelo menos um anel de β -ionona não substituído para serem coletivamente chamados de carotenóides pró-vitamínicos A (YUYAMA *et al.*, 2007). Estes carotenóides, capazes de serem convertidos em vitamina A desempenham um importante papel na prevenção de Síndromes de Deficiência de Vitamina A ou *Vitamin A Deficiency Syndrome* (VADS), que causa xeroftalmia bem como distúrbios de crescimento na primeira infância (AGOSTINE-COSTA *et al.*, 2003).

Pelo seu papel como corante natural e suas funções biológicas (atividade pró-vitáminica A, fortalecimento do sistema imunológico e prevenção de doenças

degenerativas), os carotenóides têm sido considerados entre os constituintes mais importantes dos alimentos (KIMURA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

Estrutura:

A estrutura básica dos carotenóides é um tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico e linear, sendo formado a partir de oito unidades isoprênicas de cinco unidades de carbonos. Este esqueleto básico pode sofrer modificações por hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração da dupla ligação, encurtamento da extensão da cadeia, reordenamento, isomerização, introdução de funções oxigenadas ou por combinação desses processos, resultando em uma diversidade de estruturas (YUYAMA *et al.*, 2007). Quimicamente, os carotenóides são divididos em dois grupos: hidrocarbonetos, composto de carotenos (α , β , e γ -caroteno); e, derivados oxigenados, composto de xantofilas ou oxicarotenóides (criptoxantina, luteocromo, 5, 6, 5', 6', diepóxi- β -caroteno) (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003).

Todos os carotenóides podem ser formalmente derivados da estrutura acíclica $C_{40}H_{56}$, tendo uma longa cadeia central de duplas ligações conjugadas, que constituem o sistema cromóforo que confere cores à maioria dos carotenóides (DAVIES, 1976; ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003). A estrutura dos carotenóides confere propriedades muito especiais e notáveis que são a base de suas funções variadas e ações em todas as espécies de organismos vivos (OLIVER e PALOU, 2000).

Um anel β não substituído com uma cadeia poliênica de 11 carbonos é a condição imprescindível exigida para a atividade da vitamina A. Inserem-se nesse grupo as frações β -criptoxantina, γ -criptoxantina, γ -caroteno e o α -caroteno com 50% da bioatividade do β -caroteno, o qual possui dois anéis β -ionona não substituído em ambos os lados da cadeia e, portanto, possuindo a mais alta atividade pró-vitâmica A (YUYAMA *et al.*, 2007; ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003).

O β -caroteno (Figura 7) é um pó cristalino marrom-avermelhado, cuja fórmula empírica é $C_{40}H_{56}$, insolúvel em água e glicerol e solúvel em álcool, óleos, gorduras, éter e acetona; com menor solubilidade em clorofórmio e benzeno. Seu peso molecular é de 536,9 e seu ponto de fusão é de 176 a 182°C. Segundo suas propriedades espectrofotométricas, os valores de $E^{1\%}_{1cm}$ em éter de petróleo a 450nm é 2.592 (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003).

Figura 7. Estrutura química do β -caroteno.

Funções:

São vários os artigos publicados sobre os benefícios dos carotenóides para a saúde humana. Dentre as funções relacionadas a eles pode-se citar a atividade pró-vitâmica A, a fotoproteção, a ligação com radicais livres e a modulação imunológica (OLIVER e PALOU, 2000; ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003).*

A função mais conhecida dos carotenóides é a sua capacidade de ser metabolicamente convertido em retinóides, são os chamados pró-vitâmicos A (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003). Quanto a vitamina A, ela tem três funções metabólicas conhecidas: como grupo prostético dos pigmentos visuais, carreador de unidade manosil na síntese de glicoproteínas hidrofóbicas e como um hormônio com ação no núcleo, no controle da proliferação celular e na diferenciação (YUYAMA *et al.*, 2007). Segundo Almeida-Muradian e Penteado (2003), a vitamina A está envolvida com a visão, reprodução, crescimento, sistema iminológico, diferenciação tissular, manutenção e desenvolvimento de tecidos epiteliais, e também exerce efeito sobre o crescimento normal das estruturas ósseas e dos dentes durante o desenvolvimento.

Os carotenóides funcionam como antioxidantes naturais e têm capacidade de proteger as membranas, DNA e outros constituintes celulares contra danos oxidativos (AGOSTINE-COSTA *et al.*, 2003). Oshima *et al.* (1996) mostraram em seu estudo que a suplementação com β -caroteno e luteína inibe a oxidação mediada por oxigênio *singlet* de lipoproteína de baixa densidade no plasma humano, reduzindo assim o risco de doenças cardiovasculares. O conhecimento da ação protetora dos carotenóides contra danos oxidativos e dos diversos mecanismos através dos quais exercem esta ação, permite justificar seu efeito benéfico à saúde, no tratamento de certas patologias associadas a danos celulares, principalmente a processos oxidativos (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003). Segundo Oliver e Palou (2000) bem como Porcu e Rodriguez-Amaya (2006), além da atividade pró-vitâmica A de

alguns destes pigmentos naturais, eles têm sido associados com a redução do risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, tais como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular. A ação antioxidante dos carotenóides também tem importância na indústria alimentícia. Passoto *et al.* (1998), verificaram em seu estudo que o óleo de soja adicionado de β -caroteno apresentou índices de peróxidos reduzidos em relação ao respectivo controle, considerando as medidas de 72 horas.

Assim, os carotenóides têm sido considerados entre os constituintes mais importantes dos alimentos e suas fontes alimentares bem como a determinação de sua composição são bastante pesquisadas e estudadas.

Estabilidade:

Muitos fatores afetam a concentração e a composição dos carotenóides na planta. O valor nutritivo dos alimentos na forma em que são consumidos depende em grande parte dos métodos de plantio e colheita, da variedade da planta, do processo de industrialização, do armazenamento e das técnicas utilizadas para o seu preparo (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003).

Devido à insaturação da molécula, a maior razão de perda dos carotenóides durante o processamento e o armazenamento dos alimentos é a oxidação enzimática ou não enzimática (AGOSTINE-COSTA *et al.*, 2003; YUYAMA *et al.*, 2007). Muitos fatores, tais como exposição à luz e ao oxigênio, tipo de matriz alimentícia, presença de enzimas, disponibilidade de água e presença de antioxidantes e/ou pró-oxidantes podem influenciar neste processo (OLIVER e PALOU, 2000; AGOSTINE-COSTA *et al.*, 2003). Portanto, sua biopotência pode ser reduzida pela presença de elementos de transição (ferro férrico, cobre cúprico) e protegida pelo uso de vitamina ou antioxidantes sintéticos (COMBS, 2002). A oxidação dos carotenóides tem como consequência uma perda total de sua atividade vitamínica (TORRES *et al.*, 2003). A isomerização é uma das propriedades amplamente conhecidas dos carotenóides (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003) e a isomerização das pró-vitaminas A *trans* a isômeros *cis*, especialmente com a utilização do calor, reduz o valor da vitamina A nos alimentos na mesma proporção que a oxidação. Portanto, o processamento dos alimentos afeta de sobremaneira a absorção de carotenóides (YUYAMA *et al.*, 2007).

Segundo Almeida-Muradian e Penteado (2003) bem como Costa e Penteado (1996), o tratamento térmico provoca modificações na estrutura molecular desses compostos, alterando também sua atividade pró-vitâmica. Alguns pesquisadores mostraram que houve perda no conteúdo de carotenóides após o cozimento (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 1992; COSTA e PENTEADO, 1996; SANT'ANNA e PENTEADO, 1996). Entretanto, de acordo com Yuyama *et al.* (2007), estudos demonstram que a cocção aumenta o conteúdo de carotenóides em vegetais, possivelmente por causa da facilidade de extrações da matriz, ocasionada pelo rompimento da parede celular da planta e pela descomplexação da proteína. Portanto, os resultados da influência da cocção na biodisponibilidade de carotenóides ainda são controversos.

Porcu e Rodriguez-Amaya (2006) mostraram que o conteúdo de carotenóides em amostras de acerolas processadas (polpa congelada e suco da fruta) foi marcadamente menor que aqueles encontrados na fruta fresca. E eles explicam que, uma vez que a polpa congelada não foi submetida a tratamento térmico, este baixo valor foi aparentemente devido a oxidação enzimática. Entretanto, Agostine-Costa *et al.* (2003) ao estudarem a estabilidade dos carotenóides, concluíram em seu estudo que a polpa de acerola apresentou uma retenção relativamente boa dos carotenóides pró-vitâmicos A após o congelamento e a estocagem por um período de 11 meses, conforme procedimento comercial praticado em algumas pequenas indústrias do Nordeste do Brasil.

Há registro na literatura de degradação total da atividade dos carotenóides quando a farinha de mandioca amarela é armazenada por seis meses em sacos plásticos transparentes, em temperatura ambiente e exposta à luz. A farinha de pupunha armazenada em sacos de papel opaco para evitar a incidência de luz e mantida em condições ambientais com médias de temperatura e umidade relativa de 25,8°C e 84%, respectivamente, pelo período de sete meses, demonstrou degradações significativas dos carotenóides (YUYAMA *et al.*, 2007).

Recomendações:

Poucos estudos diretos têm sido realizados para se determinar as necessidades de vitamina A. A recomendação fisiológica mínima para homens adultos de acordo com a Estimativa do Requerimento Médio ou *Estimated Average Requirement* (EAR) é de 627 µg/dia de equivalentes de retinol (YUYAMA *et al.*, 2007).

De acordo com a DRI (2000), a ingestão diária recomendada para vitamina A é de 900µg/dia para homens e de 700µg/dia para mulheres. Embora exista alguma evidência de que o β -caroteno e outros carotenóides possam ter ação antioxidante benéficas além de sua atividade pró-vitáminica A, não há recomendações nutricionais visando este efeito (YUYAMA *et al.*, 2007).

Corretamente, a vitamina A contida nos alimentos é expressa em termos de equivalentes de retinol, ou seja, a soma das vitaminas provenientes do retinol pré-formado e dos carotenóides (YUYAMA *et al.*, 2007). Por causa da baixa absorção dos carotenos e da clivagem incompleta para gerar retinol, é geralmente aceito que 12µg de β -caroteno sejam equivalentes a 1µg de retinol ou equivalente de retinol (RE) ou uma atividade de equivalente de retinol (ERA) e que 24µg de outros carotenóides sejam equivalentes a 1µg de retinol (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

Como a conversão de carotenóides para retinol é muito limitada, a intoxicação nesses casos é muito difícil. O acúmulo de carotenóides parece não ter efeitos adversos, embora o plasma, a gordura corporal e a pele possam apresentar hipercarotenemia (YUYAMA *et al.*, 2007). Segundo Almeida-Muradian e Penteado (2003), a hipercarotenemia é caracterizada por uma coloração amarela da pele e uma alta concentração dos carotenóides no plasma, que desaparecem gradualmente quando é diminuído o consumo dos carotenóides.

Hipovitaminose A:

A hipovitaminose A ocorre devido à reduzida ingestão de alimentos ricos em vitamina A por tempo prolongado, promovendo redução nas reservas endógenas deste nutriente. Esta é uma doença que afeta as estruturas de diversos órgãos, sendo o olho o exemplo mais evidente, podendo produzir alterações oculares que se manifestam interna ou externamente (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003).

A deficiência em vitamina A é um dos maiores problemas de nutrição e saúde pública em muitos países, afetando cerca de 190 milhões de indivíduos no mundo. Globalmente, pelo menos 40 milhões de pré-escolares são deficientes em vitamina A, e cerca de 13,8 milhões apresentam sinais de danos oculares como resultado dessa deficiência (YUYAMA *et al.*, 2007). O Brasil é um dos países onde vários estudos detectaram a prevalência de hipovitaminose A em algumas regiões (SANT'ANNA e PENTEADO, 1996; YUYAMA *et al.*, 2007), sobretudo na região Nordeste do Brasil, identificada como a mais grave da América Latina. Estudos

clínicos, bioquímicos e dietéticos nesta região apontam a hipovitaminose A como principal causa de xerofthalmia (YUYAMA *et al.*, 2007).

Assim, alimentos considerados ricos em carotenóides pró-vitamínicos A podem servir como fonte alternativa e barata da vitamina A em alguns países em desenvolvimento, devido aos preços elevados dos alimentos de origem animal (COSTA e PENTEADO, 1996). Portanto, uma das medidas de longa duração para o controle da deficiência em vitamina A é o encorajamento a produção doméstica e ao consumo de frutas e vegetais ricos em carotenóides (YUYAMA *et al.*, 2007). Então, devido à relevância dos carotenóides com atividade pró-vitáminica A em saúde pública é imprescindível a geração de técnicas analíticas eficazes na determinação do conteúdo desses carotenóides em alimentos.

2.4 Vitaminas no pólen apícola

Muitos autores afirmam que os produtos apícolas são ricos em nutrientes e vitaminas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1997; KRELL, 1996; MORETI *et al.*, 2002; SÁNCHEZ, 2004; BARRETO *et al.*, 2006). Segundo Schmidt e Buchmann (1992), o pólen é rico em vitaminas do complexo B (tiamina, niacina, riboflavina, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina) e carotenos precursores da vitamina A, porém, apresenta quantidade não significativa de vitamina C e das vitaminas lipossolúveis. Já Barreto *et al.* (2006), afirmam que no pólen apícola são encontradas vitaminas como ácido pantotênico e nicotínico, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico e pequena quantidade de vitaminas D e E, além de enzimas, coenzimas e pigmentos. Entretanto, existem poucos trabalhos científicos que analisam o teor vitamínico do mel e dos outros produtos apícolas, como é o caso do pólen.

Publicação sobre carotenos no pólen da Espanha, relatadas por Muniategui *et al.* (1990), mostraram valores de 0,49 a 242,6µg por grama de amostra (peso seco) para carotenóides totais e uma média de 10µg de β-caroteno. Já Szczesna *et al.* (1991), ao analisar amostras (n=2) de pólen provenientes da Polônia, encontraram valores de 0 e 10,8mg/100g de amostra para pró-vitamina A e de 12,8 e 15,21mg/100g de amostra de vitamina C.

Com respeito ao Brasil, Almeida-Muradian *et al.* (2005), ao analisarem o conteúdo de carotenóides totais em amostras (n=10) de pólen apícola desidratado coletado no sul do Brasil, encontraram valores que variaram de quantidades traços a 489,2µg por grama de amostra (peso seco). Estes autores detectaram ainda a ausência de β-caroteno (pró-vitamina A) e vitamina C (ácido ascórbico); afirmando que a ausência dessas vitaminas pode ser explicada por sua sensibilidade a altas temperaturas a qual pode ter sido usada no processo de secagem das bolotas de pólen.

Oliveira (2006), ao avaliar o conteúdo de vitaminas no pólen apícola coletado em Pindamonhangaba – SP encontrou valores de vitaminas das amostras frescas (n=5) coletadas em abril de 2005 variando de 273,9 a 364,7µg/g de vitamina C; 31,1 a 42,5µg/g de vitamina E, assim como de 56,3 a 198,9µg/g de β-caroteno. Essas amostras, mesmo desidratadas, foram consideradas fonte deste carotenóide. Já as amostras frescas de pólen apícola coletadas em outubro de 2005 variaram de 13,5 a 17,9µg/g para a vitamina E e de 537,3 a 560,3µg/g para a vitamina C. Essas amostras foram consideradas fonte de vitamina C, visto que mesmo desidratadas, forneceram 15% do valor recomendado de desta vitamina C, na sua porção diária. Foi observada ainda, ausência de β-caroteno nas amostras de pólen apícola coletadas em outubro de 2005.

O conteúdo de vitaminas do pólen e demais alimentos pode sofrer alteração com o processamento e a estocagem (ALBALÁ-HURTADO *et al.*, 1997). Oliveira (2006), ao avaliar o teor destas vitaminas em pólen fresco e seu comportamento após o processo de desidratação, concluiu em seu estudo que ocorreram perdas nos teores das vitaminas C e E durante o armazenamento do pólen fresco em freezer. Concluíram também que houve perda das vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β-caroteno, como pró-vitamina A) após o processo de desidratação do pólen e que as amostras de pólen tiveram variação no teor vitamínico conforme a época de coleta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a estabilidade das vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A) em amostras de pólen apícola desidratado durante o período de um ano.

3.2 Objetivos específicos

- Obter dados analíticos nacionais sobre o valor vitamínico e nutricional (composição centesimal) do pólen apícola desidratado, a fim de agregar valor a este produto;
- Avaliar o efeito do processo de desidratação do pólen apícola nos teores das vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A);
- Avaliar a estabilidade das vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A) no pólen apícola desidratado, durante o período de um ano, quando estocado à temperatura ambiente, expostos a luz e protegidos da luz;
- Avaliar a estabilidade das vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A) no pólen apícola desidratado, durante o período de um ano, quando estocado em freezer;
- Caracterizar o pólen apícola, com base na análise microscópica (polínica) e correlaciona-la com o conteúdo de vitaminas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostragem

Amostras preliminares:

Primeiramente, em 2006, foram adquiridos seis lotes diferentes de amostras comerciais de pólen apícola desidratado, recém fabricados, diretamente de entrepostos distintos de comercialização de produtos apícolas brasileiros. De acordo com a disponibilidade do fabricante, foram coletadas amostras frescas (antes da secagem) do mesmo lote das amostras desidratadas. A tabela 6 mostra as informações principais sobre os lotes preliminares.

Tabela 3. Informações das amostras preliminares de pólen apícola.

Lotes	Data de coleta	Local	Desidratação	Embalagem
1	Março/2006	São Paulo	Estufa Ballardin®	Vidro
2	Abril/2006	Paraná	NI	Plástico colorido
3	Abril/2006	Santa Catarina	NI	Saco plástico transparente
4	Maio/2006	Neópolis - SE	Estufa artesanal (madeira)	Saco plástico transparente
5	Agosto/2006	São Paulo	Estufa Ballardin®	Vidro
6	Março/2006	São Paulo	Estufa Ballardin®	Vidro

NI = Não informado.

Amostras definitivas:

Em 2007, foi estabelecida uma parceria com o entreposto de comercialização de produtos apícolas “PRONATU Laboratório de Produtos Naturais LTDA” localizado no Estado de São Paulo (cidade de Pariquera-Açu), que nos enviou seis lotes diferentes de amostras de pólen apícola desidratado, recém coletados, e enviados, após processamento e preparo para comercialização, ao Laboratório de Análise de Alimentos da FCF/USP devidamente embalados via sedex.

O fornecedor foi instruído a homogeneizar bem a amostra, retirar uma parte (200g) para nos enviar na forma *in natura*, e processar o restante. Ao final, foram acondicionados em embalagens plásticas transparentes de 45g ($\pm$ 35 embalagens por

lote), rotuladas de acordo com o procedimento habitual da empresa. Para o experimento, os lotes foram designados por letras do alfabeto (A, B, C, D, E e F).

Coleta e desidratação das amostras:

As amostras foram coletadas no apiário Trianoski, aos cuidados do apicultor Mauro Trianoski, no período de 23/02/2007 a 09/04/2007 com intervalo de uma semana entre os lotes. Foram utilizadas 15 colméias de abelhas *Apis mellifera*, contendo coletores de alvado em 14 colméias (Figura 8) e de cobertura em uma colméia. Do apiário até a empresa, o pólen ainda úmido foi transportado em sacos plásticos transparentes de polietileno virgem. Foi realizada uma visita, bem como a participação nas etapas de coleta e desidratação de um dos lotes, o que permitiu a familiaridade com o manejo apícola e a produção de imagens.

O apiário fica instalado em zona de Mata Atlântica, no Vale do Ribeira e a coleta foi realizada pela empresa (PRONATU) em parceria com os pequenos produtores que estão iniciando a apicultura na região, devido um trabalho comunitário com os moradores da região em que a empresa forneceu equipamentos, cursos e realiza a compra do produto (pólen apícola) para a comercialização.

Figura 8. Colméia de abelhas *Apis mellifera* com coletor de alvado (A) e coleta de pólen (B).

Na empresa, cada amostra foi homogeneizada para retirada de 200g do pólen fresco para ser enviada ao laboratório e o restante foi submetido ao processo de secagem em estufa da marca Ballardin® (Figura 9) ajustada a temperatura de 45°C durante aproximadamente seis horas. As amostras desidratadas foram encaminhadas ao laboratório nas embalagens (plástico transparente) finais de comercialização.

Figura 9. Estufa (Ballardin®) com amostra de pólen.

Preparo e armazenamento das amostras:

Os lotes de pólen apícola frescos recebidos foram imediatamente analisados e os lotes de pólen desidratado foram divididos conforme segue abaixo:

- a) 04 embalagens foram analisadas de imediato logo após o recebimento, para compor o Tempo 0;
- b) 08 embalagens foram também armazenadas em freezer, para constituírem o grupo de amostras armazenadas em freezer no período de um ano, sendo que foram realizadas análises seis meses após a aquisição (Tempo 1) e após um ano de acondicionamento (Tempo 2);
- c) 08 embalagens foram armazenadas no laboratório em prateleiras à temperatura ambiente, para constituírem o grupo de amostras armazenadas em temperatura ambiente expostas à luz no período de um ano, sendo realizadas análises seis meses após a aquisição (Tempo 1) e após um ano de acondicionamento (Tempo 2);
- d) 08 embalagens foram também armazenadas no laboratório em prateleiras a temperatura ambiente, sendo que foram protegidas da exposição à luz utilizando papel alumínio, para constituírem o grupo de amostras armazenadas em temperatura ambiente protegidas da luz no período de um ano, sendo que foram realizadas análises seis meses após a aquisição (Tempo 1) e após um ano de acondicionamento (Tempo 2).

Todos os lotes de pólen apícola desidratado foram mantidos nas embalagens originais do fabricante (Figura 10).

Figura 10. Amostras de pólen armazenadas nas embalagens originais.

4.1.2 Reagentes

Todos os solventes usados para separação dos carotenóides e do α -tocoferol em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram de grau HPLC e da marca Merck. Outros solventes orgânicos e químicos utilizados nos procedimentos de extração e na análise da vitamina C e da composição centesimal foram de padrão analítico da marca Synth. Os padrões de α -tocoferol, β -caroteno e ácido ascórbico foram comercializados pela Sigma Chemical CO, St. Louis, USA.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da umidade

Primeiramente, foram realizados testes com seis métodos diferentes para determinação da umidade das amostras de pólen apícola desidratado, previamente moídas, analisadas em triplicata. A determinação da umidade foi realizada por métodos gravimétricos convencionais, tomando por base a perda de massa da amostra, por dessecação até peso constante (de I a V) e por método volumétrico (VI):

- I. Secagem em estufa convencional da marca FANEM[®], regulada para 100°C (peso da amostra de aproximadamente 2g);
- II. Secagem em estufa à vácuo da marca FANEM[®], regulada para 70°C (peso da amostra de aproximadamente 2g);
- III. Secagem em ambiente de baixa atividade de água, utilizando-se dessecador com ácido sulfúrico em estufa a 40°C (peso da amostra de aproximadamente 2g);
- IV. Secagem sob radiação infravermelha, em equipamento composto por balança eletrônica de precisão Micronal (B160), adaptada com secador infravermelho Mettler Toledo (LP16), ajustando-se a intensidade da radiação emitida de modo que a amostra atingisse 85°C (peso da amostra de aproximadamente 1g);
- V. Liofilização, utilizando-se equipamento da marca Edwards[®] modelo EC Super Modulyo, a temperatura de -40°C por 26 horas e vácuo final inferior a 4×10^{-1} Torr, segundo as normas do fabricante.
- VI. Karl Fischer, utilizando-se aparelho da Mettler Toledo (DL38) baseado na quantidade de reagente de Karl Fischer (com seu respectivo fator de correção) necessária para titular a água presente na alíquota da amostra ensaiada.

Após as análises dos vários métodos escolheu-se para uso nas amostras definitivas a determinação da umidade pelo método IV. As amostras frescas e desidratadas foram primeiramente maceradas em almofariz e homogeneizadas em moinho analítico, respectivamente; e cerca de um grama destas foram submetidos à temperatura de 85°C na balança de infravermelho, conforme descrito por Cornejo (1994) e Oliveira (2006). Foram realizadas análises em triplicata de cada amostra.

4.2.2 Determinação da vitamina C (ácido ascórbico)

Para determinação da vitamina C foi utilizado o método titulométrico (AOAC, 1995; OLIVEIRA, 2006) que se baseia na redução do 2-6-diclorofenol-indofenol

(DCFI) pelo ácido ascórbico. O DCFI em meio básico ou neutro é azul, em meio ácido é rosa e sua forma reduzida é incolor.

Segundo Badolato *et al.* (1996), a determinação analítica da vitamina C em frutas e sucos, assim como no pólen apícola, é problemática devido a vários fatores como: interferentes na reação, instabilidade do ácido ascórbico e condições próprias do produto, relacionadas a seus pigmentos naturais. Então, como a molécula do ácido ascórbico tem na sua fórmula estrutural dois grupos enólicos, o que lhe confere poder redutor, esta propriedade de oxi-redução pode ser empregada como reação fundamental para a quantificação do teor de vitamina C. Nesse caso teve-se de usar concomitantemente um pHmetro com eletrodo de óxido-redução acoplado para a determinação do ponto de viragem.

Extração:

Foram pesadas cerca de cinco gramas de amostra em tubos de centrífuga e homogeneizada em turrax com solução de ácido metafosfórico e ácido acético em água (3% ácido metafosfórico e 8% ácido acético). Os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante retirado e transferido para balão volumétrico de 50mL. O resíduo foi novamente centrifugado, após ter sido homogeneizado com nova porção da solução de ácido metafosfórico. Decorrida a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionado ao balão volumétrico contendo o sobrenadante anterior.

Titulação:

A solução, contendo a vitamina C, foi então titulada com DCFI. Para otimizar a titulação, foi utilizado um agitador magnético e um aparelho de medição de pH Micronal (B 474), equipado com um eletrodo de óxido redução Mettler-Toledo (PT4805-57/120). O ponto final da titulação é caracterizado pela inflexão da curva de titulação, observando-se as variações de mV ocorridas durante o processo. Para a quantificação da vitamina C, foi realizada a titulação de uma solução padrão com concentração conhecida, paralelamente à titulação da amostra.

4.2.3 Determinação da vitamina E (α -tocoferol)

O método utilizado para a determinação da vitamina E em pólen apícola foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Presoto, Rios e Almeida-Muradian (2000) e Oliveira (2006). Foram utilizados aproximadamente cinco gramas de amostra e as análises realizadas em triplicata.

Extração:

Inicialmente, as amostras foram submetidas à extração exaustiva com acetona fria, utilizando um agitador mecânico (turrax). Em seguida, o material foi submetido à filtração à vácuo em filtro de vidro sinterizado e o filtrado transferido para funil de separação contendo éter de petróleo (P.E. 30°C - 60°C). A solução foi lavada cinco vezes com água destilada para completa remoção da acetona. O extrato etéreo foi recolhido, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado em evaporador rotatório a vácuo (temperatura aproximada de 35°C). O resíduo obtido, contendo α -tocoferol, foi totalmente evaporado em atmosfera de nitrogênio, ressuspenso em 5 ou 10mL de fase móvel, filtrado em membrana de 0,22 μ m e injetado no cromatógrafo.

Condições cromatográficas:

Foi utilizado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu composto por um sistema de uma bomba (LC-20AT), um injetor manual e um detector de fluorescência (RF-10AXL), programado para 295nm de excitação e 330nm de emissão. Para a separação foi utilizada uma coluna de sílica Shim-pack CLC-Sil (M) 25cm com fase móvel previamente filtrada e degaseificada, composta de hexano e álcool isopropílico (99:1) e fluxo de 1,0mL/min. O α -tocoferol foi identificado por comparação do tempo de retenção do padrão sintético e a quantificação realizada através de padronização externa, por comparação das áreas dos picos de amostra e do padrão.

4.2.4 Determinação dos carotenóides totais, β -caroteno e teor pro-vitamínico A

Foram utilizados dois métodos distintos para a quantificação do β -caroteno: cromatografia em coluna aberta (CCA), conforme descrito por Rodriguez-Amaya (2001) e Oliveira (2006), e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseado no procedimento descrito por Ribeiro *et al.* (2007), com algumas adaptações.

Extração (CCA e CLAE):

A extração dos carotenóides foi realizada de acordo com Rodriguez-Amaya (2001) e Oliveira (2006). As amostras de pólen apícola (aproximadamente cinco gramas) foram submetidas à extração exaustiva com acetona fria (um total de aproximadamente 180mL por amostra), utilizando um agitador mecânico (turrax). Em seguida, o material foi submetido à filtração à vácuo em filtro de vidro sinterizado e o filtrado transferido para um funil de separação contendo éter de petróleo (P.E. 30°C - 60°C). A solução foi lavada, pelo menos cinco vezes, com água destilada para completa remoção da acetona. O extrato etéreo foi recolhido, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado em evaporador rotatório a vácuo (temperatura $\leq 35^\circ\text{C}$).

Na análise do tempo zero, antes da evaporação, o extrato etéreo foi transferido para balão volumétrico e realizada a leitura das absorbâncias das soluções dos carotenóides totais, utilizando-se um espectrofotômetro com duplo feixe da marca Shimadzu (UV-1650 PC) ajustado à 450nm. Em seguida, o extrato etéreo foi evaporado e o resíduo foi submetido à atmosfera de nitrogênio e encaminhado para a análise cromatográfica.

Cromatografia de Coluna Aberta (CCA) - Utilizada nas análises do tempo 0:

O resíduo obtido na evaporação (após a extração), contendo os carotenóides totais, foi transferido para uma coluna de vidro 20x2cm, previamente empacotada com a fase estacionária (MgO:Hyflosupercel na proporção de 1:2), com auxílio de pequenas porções de éter de petróleo. Como fase móvel foi utilizado éter de petróleo puro ou um gradiente de éter etílico (1 a 5%) em éter de petróleo, conforme necessário. Após a separação dos carotenóides em bandas na coluna aberta, as porções contendo o β -caroteno foram cuidadosamente retiradas e transferidas para cadinhos com placa de vidro sinterizado onde foram lavadas à vácuo com pequenas

porções de acetona. O filtrado foi transferido para um funil de separação, contendo éter de petróleo e lavado com água destilada pelo menos cinco vezes, para completa remoção da acetona. O extrato etéreo foi recolhido, seco com sulfato de sódio anidro e filtrado. Em seguida foi realizado um espectro de varredura entre 350 e 550nm em espectrofotômetro duplo feixe e o β -caroteno foi identificado e quantificado segundo a fórmula (Davies, 1976) a seguir:

$$\frac{\mu\text{g de carotenóide/g de amostra}}{100 \times E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{peso da amostra}} = \frac{\text{absorbância máxima} \times \text{volume da solução} \times 10^6}{100 \times E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{peso da amostra}}$$

Onde:

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de Absortividade (2592 para β -caroteno).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

Atualmente, a técnica mais empregada para análise de carotenóides é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Segundo Almeida-Muradian e Penteado (2003), a CLAE tem substituído as demais técnicas de análise de carotenóides por apresentar vantagens como rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, melhor capacidade de resolução, precisão e sensibilidade. Diante disto, com a possibilidade de realizar as análises de estabilidade dos carotenóides após seis meses de armazenamento através da CLAE, pela instalação de um novo detector (diode array), foi realizado um teste de equivalência entre os métodos de CCA e CLAE. Foi utilizado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu composto por um sistema de uma bomba (LC-20AT), um injetor manual e um detector de UV – visível com arranjos de fotodiodo (SPD-M20A), programado para leitura em 450nm. Para a separação foi utilizada uma coluna C₁₈ Shim-pack VP-ODS (25cm com 5 μ m) com fase móvel previamente filtrada e degaseificada, composta de metanol, acetato de etila e acetonitrila (70:20:10, respectivamente) e fluxo de 1,2mL/min. O β -caroteno foi identificado por comparação do tempo de retenção do padrão sintético e a quantificação realizada através de padronização externa, por comparação das áreas dos picos de amostra e do padrão.

Cálculo do teor pro-vitamínico A:

O valor pró-vitamínico A foi calculado de acordo com o preconizado pela *Dietary Reference Intakes* (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001) onde, 12 μ g de β -caroteno equivale a 1 μ g de retinol ou equivalente de retinol (RE) ou ainda, 1 atividade de equivalente de retinol (RAE).

4.2.5 Pureza dos padrões (α -tocoferol e β -caroteno)

Segundo Oliver e Palou (2000) bem como Almeida-Muradian e Penteado (2003), um problema inerente à determinação de carotenóides por CLAE é a dificuldade de se obter e manter padrões puros, uma vez que são altamente instáveis e, portanto sofrem rápida degradação, e assim requerem algum passo adicional de purificação. Neste trabalho, foram utilizados padrões comerciais tanto de α -tocoferol como do β -caroteno. Entretanto, o padrão de α -tocoferol foi primeiramente confirmado através de varredura em espectrofotômetro entre 190 a 350nm e sua absorbância foi medida em 292nm a fim de confirmar a concentração do mesmo. Já o β -caroteno foi confirmado através de varredura em espectrofotômetro entre 350 a 550nm e sua absorbância foi medida em 450nm. A partir daí, foi realizada uma curva de calibração (curva padrão) pelo método de padronização externa com cinco pontos de acordo com as concentrações confirmadas em espectro.

4.2.6 Validação dos métodos cromatográficos (α -tocoferol e β -caroteno)

Linearidade:

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa de trabalho, onde se inserem as respostas das amostras (RIBANI *et al.*, 2004). Para a determinação da linearidade do método uma série de cinco soluções com cinco níveis de concentrações diferentes de padrão foi preparada em triplicata e injetada três vezes. Com os valores das áreas dos picos e das concentrações foi desenvolvida a análise de regressão linear.

Exatidão (Teste de recuperação):

A exatidão é o parâmetro da validação que expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (LANÇAS, 2004). Para demonstrar a exatidão do método foi realizado um estudo de recuperação, ou seja, foi feita adição de uma quantidade conhecida de padrão (25 e 50%) a uma das amostras, cujo teor de vitaminas já havia sido determinado anteriormente. Esta amostra foi submetida ao mesmo processo de extração para determinação da vitamina e após os resultados obtidos nesta análise foi realizado o cálculo de recuperação.

Precisão (teste de repetibilidade):

O parâmetro de precisão expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). A precisão da metodologia foi demonstrada através do estudo de repetibilidade, onde uma mesma amostra foi analisada seis vezes no decorrer de um dia. Dos resultados obtidos foi observado a adequação dos limites de desvio-padrão e coeficiente de variação.

4.2.7 Análise da composição centesimal

Determinação de umidade:

Foi realizada pelo processo de liofilização utilizando o equipamento da marca Edwards® modelo EC Super Modulyo, a temperatura de -40°C por 26 horas e vácuo final inferior a 4×10^{-1} Torr, segundo as normas do fabricante. O princípio do processo de liofilização é a separação por sublimação, sendo assim, a água é removida como vapor da substância congelada. Este processo tem como objetivo preservar a qualidade do produto além de minimizar algumas reações de degradação que ocorre durante a secagem, como exemplos, a reação de Maillard, desnaturação de proteínas e reações enzimáticas (LIAPIS *et al.*, 1985; BOSS, 2004).

Determinação do nitrogênio total - proteínas:

Foi determinado através do método Micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para transformação do nitrogênio total em proteínas (AOAC, 1995; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

Determinação do extrato etéreo - lipídeos:

Foi determinada em extrator intermitente de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

Determinação do resíduo mineral fixo - cinzas:

Foi realizada por gravimetria após incineração do material em mufla a 550°C, até peso constante. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

4.2.8 Análise polínica (microscópica)

A análise polínica foi realizada em trabalho colaborativo com especialista da área (Profa. Dra. Ortrud Monika Barth Schatzmayr do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz - RJ), na qual o material passa pelo processo de acetólise e posterior preparo das lâminas, conforme Erdtman (1952).

Preparo da amostra de pólen:

Foram pesados dois gramas de pólen apícola seco, bem misturado (cerca de 300 bolotas, dependendo do tamanho). No caso do pólen úmido a massa foi homogeneizada previamente. Foram então selecionadas 25 bolotas proporcionalmente às diferentes cores, transferidas para tubo de centrífuga de 15mL de capacidade e adicionados 10mL de álcool etílico a 70%. As bolotas foram maceradas, homogeneizadas utilizando ultrassom por 5 minutos e repartidas em dois tubos de centrífuga de 15mL. Em seguida, realizou-se a centrifugação por 15 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos por cerca de 30 segundos antes de retornar à posição normal. Foram adicionados novamente 10mL de álcool etílico a 70% a cada tubo de centrífuga e o procedimento repetido. Ao final, foram adicionados ao sedimento 5mL de água glicerinada (solução de 1:1 de água destilada e glicerol) e após 30 minutos, centrifugado novamente. Desta vez, o sobrenadante foi descartado rapidamente e os tubos foram invertidos sobre papel absorvente para escorrer bem todo o líquido.

Preparo das lâminas para microscopia:

O sedimento obtido no fundo do tubo de centrífuga foi misturado com auxílio de um estilete. Na ponta dele foi espetado um bloquinho de cerca de $0,5\text{mm}^3$ de gelatina glicerizada e encostado no sedimento. O cubinho com o sedimento aderido foi transferido para o centro de uma lâmina de microscopia e aquecido suavemente ($<56^\circ\text{C}$), misturando a gelatina glicerizada com o sedimento recolhido, com auxílio do estilete. A lâmina foi coberta com uma lamínula $22\times 22\text{mm}$ e adicionados lateralmente à lamínula raspas de parafina para vedar a área ocupada pela gelatina glicerizada. As lâminas foram limpas, etiquetadas e observadas em microscópio de luz fotônica.

Os tipos polínicos foram identificados por comparação com a literatura (BARTH, 1989, MORETI *et al.*, 2002) e contagem sucessiva de 300 grãos para o cálculo das porcentagens de cada um dos tipos polínicos na amostra.

4.2.9 Tratamento estatístico dos dados

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown-Forsythe). Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias, as seguintes análises estatísticas foram realizadas:

- a) Teste *t* de Student, para comparar as médias das concentrações de vitaminas no pólen fresco e desidratado, avaliando a perda durante o processamento;
- b) Análise de Variância Unidimensional (One-way ANOVA) seguida do Teste de Tukey, para comparar os seis métodos de análise de umidade (100°C , 70°C à Vácuo, H_2SO_4 , Infravermelho, Liofilizador e Karl Fischer);
- c) Análise de Correlação de Pearson entre os 10 tipos polínicos e os nutrientes estudados (vitaminas e composição centesimal). Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a

homogeneidade das variâncias, o teste estatístico não-paramétrico de Correlação de Spearman foi adotado.

- d) Análise de Variância Bidimensional (Two-way ANOVA) seguida do teste de Duncan, para as comparações com relação à estabilidade das vitaminas (C, E e β -caroteno) do pólen apícola nas diferentes condições de tempo (0, 6 e 12 meses) e de armazenamento (luz, escuro e freezer).

Os resultados foram expressos como média dos resultados $\pm$ desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 8.0 e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.2.10 Tratamento dos resíduos químicos

Os resíduos químicos gerados foram encaminhados para serem descartados, junto a Comissão de Descartes Laboratoriais do programa de tratamento de resíduos químicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostras preliminares (ano de 2006)

5.1.1 Análise do pólen *in natura* e desidratado

Foram adquiridos seis lotes de pólen apícola desidratado (pelo produtor), três deles contendo também amostras *in natura*, diretamente de entrepostos de comercialização de produtos apícolas do Brasil. Nos testes realizados foram identificadas as três vitaminas propostas (vitamina C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A), porém os resultados parciais mostraram variações quantitativas e qualitativas com relação às vitaminas antioxidantes nos diferentes lotes e indicaram que ocorreram perdas durante o processo de desidratação, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Umidade e concentração de vitaminas antioxidantes nas amostras preliminares de pólen *in natura* e desidratadas.

Lotes	Umidade (%)	Vitamina C ($\mu\text{g/g}$)	Vitamina E ($\mu\text{g/g}$)	β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	Valor pró-vitamínico A ($\mu\text{g de retinol /g}$)
1 <i>In natura</i>	$22,03 \pm 0,34$	NE	$20,53 \pm 2,27$	$9,52 \pm 0,31$	0,79
Desidratado	$2,37 \pm 0,16$	NE	$17,80 \pm 0,96$	$7,11 \pm 0,71$	0,59
2 <i>In natura</i>	$18,70 \pm 0,27$	NE	$44,83 \pm 3,15$	$23,57 \pm 0,33$	1,96
Desidratado	$2,06 \pm 0,02$	450 ± 20	$20,48 \pm 1,13$	$19,47 \pm 0,25$	1,62
3 <i>In natura</i>	-	-	-	-	-
Desidratado	$1,73 \pm 0,04$	NE	$71,17 \pm 2,06$	$9,63 \pm 0,39$	0,80
4 <i>In natura</i>	-	-	-	-	-
Desidratado	$4,27 \pm 0,25$	380 ± 30	$9,86 \pm 0,36$	$4,89 \pm 0,25$	0,41
5 <i>In natura</i>	$12,34 \pm 0,66$	204 ± 10	$67,49 \pm 6,40$	$14,10 \pm 1,39$	1,17
Desidratado	$1,73 \pm 0,06$	215 ± 19	$80,61 \pm 13,46$	$11,34 \pm 0,36$	0,95
6 <i>In natura</i>	-	-	-	-	-
Desidratado	$3,77 \pm 0,04$	NE	$15,29 \pm 4,68$	$1,36 \pm 0,11$	0,11

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão. NE (não encontrado).

Com relação à umidade, os resultados estão de acordo com a legislação brasileira (máximo de 30% para amostras frescas e 4% para as desidratadas).

No primeiro lote, o processo de desidratação do pólen apícola foi responsável por uma perda de aproximadamente 25% do conteúdo de beta-caroteno e 13% do conteúdo de vitamina E. Já no segundo lote, houve perda de aproximadamente 17% do conteúdo de beta-caroteno e de 54% do conteúdo de vitamina E. Neste lote foi detectada a presença de vitamina C (0,45mg/g) apenas na amostra desidratada, provavelmente a vitamina C se degradou na amostra fresca durante a estocagem em freezer, fato este já ocorrido em trabalho anterior (OLIVEIRA, 2006). Mesmo assim, este lote foi considerado fonte desta vitamina uma vez que forneceu 11,3mg em uma porção de 25g de pólen. De acordo com a ingestão diária de referência (IDR) ou *dietary reference intake* (DRI, 2000), o consumo de vitamina C deve ser de 90mg/dia para homens e de 75mg/dia para mulheres e 15% deste valor consiste em 13,5 e 11,3mg de vitamina C para homens e mulheres, respectivamente.

Não foi possível a obtenção de amostra *in natura* referente aos lotes 3, 4 e 6. No lote 5, o processo de desidratação do pólen apícola foi responsável por uma perda de aproximadamente 20% do conteúdo de beta-caroteno. Entretanto, não foi observada perda da vitamina C nem da vitamina E, sendo encontrado no pólen desidratado 5% a mais de vitamina C e 16% a mais de vitamina E comparado ao pólen fresco. Pode ter ocorrido que no entreposto fornecedor ao retirar parte da amostra fresca antes do processamento, o lote não foi homogeneizado suficientemente causando essa discrepância nos dados.

5.1.2 Análise polínica

Na Tabela 5 estão apresentados os tipos polínicos dos lotes obtidos. Verificou-se que o Myrtaceae tipo *Myrcia* apareceu como pólen dominante em três amostras (lotes 3, 5 e 6) enquanto os tipos *Cammelina* (lote 4) e *Poaceae* (lote 1) apareceram como pólen dominante em apenas um lote. O Asteraceae tipo *Eupatorium* apareceu como pólen acessório em duas amostras (lotes 1 e 2) e o Asteraceae tipo *Bidens* em uma amostra (lote 2). O Arecaceae tipo *Cocos* só aparece na proporção de pólen isolado importante, em quatro lotes (lotes 3, 4, 5 e 6), indicando que pode se tornar fonte de coleta de pólen se ocorrer em grande quantidade nas áreas de produção.

Tabela 5. Porcentagens de tipos polínicos obtidos nas amostras preliminares desidratadas de pólen apícola.

Família	Frequência (%)					
Gênero / Espécie	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
Arecaceae tipo <i>Astrocaryum</i>	<1 (PI)				<1 (PI)	
Arecaceae tipo <i>Cocos</i>			5 (PII)	5 (PII)	5,7 (PII)	5 (PII)
Arecaceae tipo <i>Geonoma</i>		10 (PII)				
Asteraceae tipo <i>Bidens</i>		40 (PA)		<1 (PI)	<1 (PI)	
Asteraceae tipo <i>Eupatorium</i>	40 (PA)	40 (PA)		<1 (PI)	3,5 (PII)	
Asteraceae tipo <i>Vernonia</i>					3,4 (PII)	
Bignoniaceae tipo <i>Tabebuia</i>						5 (PII)
Cactaceae				1 (PI)		
<i>Cammelina</i>				70 (PD)		
Labiatae tipo <i>Ocimum</i>			3 (PII)			
Mimosaceae tipo <i>Mimosa</i>						
<i>scabrella</i>		<1 (PI)		<1 (PI)		
Mimosaceae tipo <i>Mimosa</i>						
<i>caesalpineafolia</i>				<1 (PI)		
Myrtaceae tipo <i>Myrcia</i>		<1 (PI)	90 (PD)		85 (PD)	90 (PD)
<i>Poaceae</i>	50 (PD)				<1 (PI)	
<i>Trema</i>	<1 (PI)				<1 (PI)	
NI	<1 (PI)	<1 (PI)	<1 (PI)	<1 (PI)	<1 (PI)	

PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%); PII = pólen isolado importante (de 3% a 15%); PI = pólen isolado ocasional (< 3%); NI = não identificado.

5.1.3 Análises do pólen desidratado após quatro meses de estocagem

Os lotes anteriormente analisados (1º semestre de 2006) foram estocados, após as análises iniciais (Tempo 0) de três formas diferentes: 1) temperatura ambiente com exposição a luz; 2) temperatura ambiente protegido da luz; 3) freezer. As amostras foram armazenadas em frascos fornecidos pelo próprio entreposto de comercialização. Após quatro meses de estocagem, as amostras foram reavaliadas com relação aos teores das três vitaminas em estudo (vitamina C, E e β -caroteno), conforme mostram as tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 6. Teor de Vitamina C ($\mu\text{g/g}$) em amostras preliminares desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.

	Temperatura Ambiente		Freezer
	Luz	Escuro	
Lote 2			
Média* ± Desvio Padrão	275 ± 10	301 ± 10	479 ± 20
% de perda (Tempo 0 = 0,448)	39	33	-
Lote 4			
Média* ± Desvio Padrão	223 ± 10	190 ± 10	301 ± 10
% de perda (Tempo 0 = 0,383)	42	50	21

* Média de análises em triplicata.

Obs.: Os lotes 1 e 3 não foram analisados quanto a vitamina C, uma vez que não apresentaram tal vitamina no tempo 0. O lote 5 não foi analisado devido a observação de resultados discrepantes nos primeiros lotes e, portanto, decidiu-se reiniciar o trabalho.

Tabela 7. Teor de Vitamina E ($\mu\text{g/g}$) em amostras preliminares desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.

	Temperatura Ambiente		Freezer
	Luz	Escuro	
Lote 1			
Média* ± Desvio Padrão	7,23 ± 1,15	15,21 ± 1,51	16,27 ± 1,62
% de perda (Tempo 0 = 17,80)	59	15	9
Lote 2			
Média* ± Desvio Padrão	22,25 ± 2,78	18,42 ± 0,88	27,93 ± 0,40
% de perda (Tempo 0 = 20,48)	-	10	-
Lote 3			
Média* ± Desvio Padrão	56,22 ± 1,91	53,07 ± 1,62	65,97 ± 0,23
% de perda (Tempo 0 = 71,18)	21	25	7
Lote 4			
Média* ± Desvio Padrão	8,47 ± 0,20	8,93 ± 0,82	12,04 ± 0,79
% de perda (Tempo 0 = 9,86)	14	9	-

* Média de análises em triplicata.

Tabela 8. Teor de β -caroteno ($\mu\text{g/g}$) em amostras preliminares desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.

	Temperatura Ambiente		Freezer
	Luz	Escuro	
Lote 1			
Média* ± Desvio Padrão	4,08 ± 0,15	4,51 ± 0,09	6,21 ± 0,27
% de perda (Tempo 0 = 7,11)	43	37	13
Lote 2			
Média* ± Desvio Padrão	8,33 ± 0,46	8,61 ± 0,58	23,66 ±0,40
% de perda (Tempo 0 = 19,57)	57	56	-
Lote 3			
Média* ± Desvio Padrão	3,67 ± 0,38	4,49 ± 0,40	8,75 ± 0,19
% de perda (Tempo 0 = 9,63)	61	53	9
Lote 4			
Média* ± Desvio Padrão	0,75 ± 0,03	2,26 ± 0,23	2,46 ± 0,17
% de perda (Tempo 0 = 4,89)	84	54	50

* Média de análises em triplicata.

Os resultados obtidos nas tabelas 6, 7 e 8 são conflitantes, conforme pode-se observar graficamente nas Figuras 11 e 12. As porcentagens de perda da vitamina E e do β -caroteno em cada uma das diferentes formas de estocagem não seguem o mesmo padrão entre os lotes, como era esperado.

Figura 11. Teor de Vitamina E em amostras desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.

Figura 12. Teor de β -caroteno em amostras desidratadas de pólen apícola após quatro meses de estocagem.

Diante disto, percebeu-se que vários fatores poderiam ter influenciado em tais resultados como:

- As diferenças entre os períodos (mês/semestre) de coleta do pólen;
- As diferenças entre os locais/regiões da coleta do pólen, bem como da florada;
- As diferenças entre os processamentos (tipo de estufa, tempo e temperatura) nos diferentes entrepostos;
- Falta de homogeneidade das amostras, tanto ao retirar a porção fresca quanto ao retirar a porção desidratada para as embalagens;
- As diferenças entre as embalagens (vidro, plástico, acrílico alaranjado) enviadas por cada entreposto de comercialização;
- Melhoramento das metodologias com a experiência do analista;
- Uso de reagentes de diferentes marcas.

Assim, devido às incertezas relatadas acima, reiniciamos os experimentos com novos lotes tomando-se os devidos cuidados a fim de evitar a influência de tais variáveis no estudo. Os novos lotes foram adquiridos de um único entreposto de comercialização (PRONATU), o qual permitiu a visita ao local para a realização de

uma das coletas do pólen que foi obtido de apenas um apiário, nos meses de fevereiro a abril de 2007 e, portanto, da mesma região e florada. Também foi evitada a influência de diferentes tipos de processamento, uma vez que o pólen foi desidratado no entreposto com a mesma metodologia (estufa, temperatura e tempo) para todos os lotes, além das embalagens para o armazenamento, que foram as mesmas (plástico transparente) para todos os lotes.

5.1.4 Comparação de métodos para a determinação de umidade

O teor de umidade do pólen apícola constitui em parâmetro de qualidade para este produto. A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes para a análise de alimentos, pois está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição podendo afetar os seguintes itens: estocagem, embalagem e processamento (CECCHI, 2003; GARCIA-AMOEDO e ALMEIDA-MURADIAN, 2002). Apesar disso, a regulamentação brasileira (BRASIL, 2001) sobre a qualidade do pólen apícola não é clara quanto à recomendação/padronização do método a ser utilizado, citando métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal. Um dos métodos de análise para amostras secas (AOAC, 1995), recomenda submeter-se aproximadamente 2g de amostra até peso constante a 95-100°C, assim como nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, cita que o aquecimento direto da amostra à estufa à 105°C é o processo mais utilizado para a análise de alimentos em geral (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). Segundo Serra-Bonvehí e Casanova (1987), a umidade do pólen tem sido medida por métodos diversos, que levam a resultados muito discrepantes. Por tal motivo, é importante um estudo comparativo dos métodos para caracterização da umidade do pólen apícola, a fim de contribuir com a legislação brasileira.

Foram comparados os dados utilizando-se seis diferentes procedimentos para a análise de umidade com as amostras coletadas em 2006 (n=6). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9 e na Figura 13 estão apresentados os valores médios de umidade das amostras, em relação aos diferentes métodos utilizados.

Tabela 9. Teor de umidade das amostras desidratadas de pólen apícola por seis métodos diferentes.

Lote	Umidade (%)*					
	100°C	70°C (vácuo)	H ₂ SO ₄	Infravermelho	Liofilizador	Karl Fischer
1	11,54 ± 0,46	6,61 ± 0,07	6,02 ± 0,09	4,44 ± 0,02	4,24 ± 0,09	4,48
2	10,61 ± 0,32	7,60 ± 0,10	7,32 ± 0,05	4,85 ± 0,05	5,30 ± 0,11	5,87
3	9,69 ± 0,15	7,03 ± 0,07	6,55 ± 0,06	4,57 ± 0,05	4,55 ± 0,11	6,92
4	11,82 ± 0,37	7,83 ± 0,07	6,71 ± 0,03	5,84 ± 0,03	4,20 ± 0,11	6,08
5	9,19 ± 0,02	6,40 ± 0,07	4,72 ± 0,09	3,72 ± 0,05	2,65 ± 0,15	9,27
6	7,28 ± 0,10	6,13 ± 0,20	4,58 ± 0,09	4,57 ± 0,02	2,80 ± 0,05	5,78

* Resultados expressos em Média ± Desvio padrão de análises em triplicata, exceto para o método de Karl Fischer, que foi realizado em duplicata.

Figura 13. Valores médios de umidade encontrados em amostras desidratadas de pólen apícola por seis processos diferentes.

É possível observar que, de modo geral, nos processos dos quais o calor é empregado (1 e 2), os valores de umidade são maiores que nos outros processos, com exceção das amostras expostas à radiação infravermelha (3), onde há aplicação de calor, porém por um curto intervalo de tempo.

De acordo com o teste de Tukey realizado, podem-se observar quais dos valores médios encontrados não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, conforme mostra a Tabela 10.

Tabela 10. Diferenças estatísticas entre os métodos de análise de umidade, de acordo com o teste de Tukey.

Método	Umidade	Tukey HSD test			
		1	2	3	4
Liofilizador	3,96 %	****			
Infra vermelho	4,67 %	****			
H ₂ SO ₄	5,98 %		****		
Karl Ficher	6,40 %		****	****	
70°C	6,93 %			****	
100°C	10,02 %				****

Conforme a indicação da análise estatística, o método que emprega radiação infravermelha se equivale ao método de secagem por liofilizador, tendo obtido os menores valores de umidade, comparado aos outros métodos. No caso do método infravermelho, este tem a vantagem de ser mais rápido e poderia ser mais vantajoso para as análises de controle de qualidade de um laboratório mais equipado onde o número de amostras geralmente é grande. Segundo Cecchi (2003), a secagem por radiação infravermelha é mais efetiva que a secagem em estufas e envolve penetração de calor dentro da amostra, encurtando o tempo de secagem. Este método, embora exponha as amostras a um aumento de temperatura, o faz por períodos curtos, fato este, que poderia contribuir para a integridade das mesmas (GARCIA-AMOEDO e ALMEIDA-MURADIAN, 2002).

Serra-Bonvehí e Casanova (1987), ao estudar métodos de análise de umidade em amostras de pólen apícola da Espanha, obtiveram os resultados médios conforme mostra a Tabela 11. E em sua conclusão aceita Karl Fischer e estufa à vácuo como os métodos mais indicados para análise de umidade do pólen, e como opcional o Infra-vermelho.

Tabela 11. Comparação das médias de umidade encontradas neste trabalho com as encontradas por Serra-Bonvehí e Casanova (1987) em amostras da Espanha.

Método	Umidade (%)	
	Serra-Bonvehí e Casanova (1987)	Neste trabalho
Estufa a 105-110°C	13,4 (n=31)	10,02 (n=6)
Estufa a vácuo a 65°C	5,9 (n=31)	6,93 (n=6)
Karl Fischer	4,7 (n=3)	6,40 (n=6)
Infra-vermelho	5,2 (n=3)	4,67 (n=6)
H ₂ SO ₄	-	5,98 (n=6)
Liofilizador	-	3,96 (n=6)

Silva *et al.* (2001) ao testar três métodos de análise de umidade do pó e farelo de algaroba observaram equilavência entre o método convencional (estufa a 105°C), e por radiação infravermelha; isto ocorreu provavelmente devido a característica da amostra que é submetida à secagem prévia com temperaturas altas para obtenção do pó.

Sob as condições do método convencional (estufa a 105°C), os resultados obtidos foram que as amostras apresentaram coloração castanho-escuro ao final do processo, os quais são características de reações de escurecimento. Essas características também foram observadas, porém em menor proporção, no método de estufa a vácuo a 70°C, conforme mostra a Figura 14.

Figura 14. Amostras de pólen após aplicação de métodos para a determinação de umidade.

Acredita-se que esta característica é devido à ocorrência da reação de Maillard. Além disso, os valores de umidade observados nesses métodos são maiores, podendo ser devido à perda de compostos voláteis além da água durante o aquecimento. Esses acontecimentos também foram observados por Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian (2002) ao analisarem amostras de geléia real por diferentes métodos de secagem. Segundo Cecchi (2003), na evaporação em estufa a 100°C até peso constante, pode ocorrer uma superestimação da umidade por perda de substâncias voláteis ou por reações de decomposição. Serra-Bonvehí e Casanova (1987), ao analisar as amostras de pólen submetidas a métodos de secagem diferentes, observou que à estufa convencional a 105-110°C houve uma perda maior de glicose, frutose e α -aminoácidos livres quando comparados a outros métodos de secagem.

5.2 Amostras definitivas (ano de 2007)

5.2.1 Análise do pólen *in natura* e desidratado

No ano de 2007 foram adquiridos seis lotes de pólen apícola (designados pelas letras A, B, C, D, E e F), contendo amostras *in natura* e desidratada (pelo produtor), diretamente do entreposto de comercialização de produtos apícolas “PRONATU Laboratório de Produtos Naturais LTDA”, localizado no estado de São Paulo.

Primeiramente, foi realizada a análise de umidade das amostras, cujos resultados estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12. Umidade das amostras de pólen *in natura* e desidratadas.

Lotes	Umidade (%)*	
	<i>In natura</i>	Desidratado
A	19,39 ± 0,22	3,62 ± 0,14
B	18,42 ± 0,62	4,34 ± 0,07
C	16,69 ± 0,50	5,74 ± 0,24
D	14,35 ± 0,58	4,75 ± 0,16
E	17,40 ± 0,35	4,64 ± 0,13
F	13,01 ± 0,42	3,72 ± 0,16

* Os resultados estão expressos em Média ± Desvio Padrão de análises em triplicata.

Com relação à umidade, os resultados das amostras frescas estão de acordo com a legislação brasileira (máximo de 30%), contudo, a maioria das amostras secas (n=4) esteve um pouco acima do preconizado pela legislação (máximo de 4%). Os resultados apresentaram uma pequena variabilidade nas médias, que, de acordo com Marchini, Reis e Moreti (2006), pode ser explicado por ser o pólen um material altamente higroscópico e, portanto, grandemente afetado pelas condições ambientais. Oliveira (2006), ao analisar amostras de pólen coletadas no estado de São Paulo nos meses de abril e outubro de 2005 encontrou valores de umidade que variaram entre 8,5 e 17,3% para as amostras frescas e 2,5 e 3,5% para as amostras desidratadas. Esta autora utilizou o método de radiação infravermelha, semelhante a esta pesquisa. Já Barreto *et al.* (2006), encontraram teores de umidade nas amostras desidratadas de pólen apícola provenientes de diferentes regiões

brasileiras variando de 2,09 a 6,75%, o qual foi analisado de acordo com o manual de normas técnicas do Instituto Adolfo Lutz.

Nas análises realizadas foram identificadas as três vitaminas propostas neste trabalho (vitamina C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A), como mostra as Tabelas 13 e 14. Para evitar o efeito da quantidade de água (umidade) das amostras na quantificação das vitaminas, os valores estimados foram expressos em base seca (por grama de matéria seca).

Tabela 13. Concentração das vitaminas C e E nas amostras de pólen *in natura* e desidratadas e sua perda após o processamento.

Lotes	Vitamina C (g/g)*			Vitamina E (g/g)*		
	<i>In natura</i> **	Desidratado **	Aumento aparente (%)	<i>In natura</i>	Desidratado	Perda (%)
A	14 $\pm$ 0,25	114 $\pm$ 1,62	87,7	43,00 $\pm$ 3,61	38,64 $\pm$ 2,72	10,2
B	52 $\pm$ 2,47	124 $\pm$ 3,94	58,1	19,43 $\pm$ 1,70	16,27 $\pm$ 0,38	16,3
C	119 $\pm$ 1,96	340 $\pm$ 11,4	65,0	25,94 $\pm$ 2,21	20,54 $\pm$ 1,30	20,8
D	67 $\pm$ 0,46	126 $\pm$ 4,88	46,8	22,47 $\pm$ 0,65	18,42 $\pm$ 0,47	18,0
E	15 $\pm$ 0,76	127 $\pm$ 2,08	88,2	28,18 $\pm$ 1,12	21,06 $\pm$ 1,76	25,3
F	62 $\pm$ 2,16	144 $\pm$ 4,49	56,9	37,19 $\pm$ 1,42	32,27 $\pm$ 1,53	13,2

* As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

** Médias com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

No presente trabalho foram obtidas concentrações de vitamina C variando entre 14 e 119 $\mu\text{g/g}$ nas amostras frescas e entre 114 e 340 $\mu\text{g/g}$ nas amostras desidratadas. Observa-se que a concentração de vitamina C das amostras frescas, ou seja, aquelas com umidade mais elevada encontram-se menores que das amostras processadas dos mesmos lotes, com diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,037325$). Suspeita-se que o ácido ascórbico, que é mais instável em solução, tenha sido degradado rapidamente nas amostras frescas durante a sua estocagem, no dia de secagem do pólen, transporte para o laboratório e do armazenamento em freezer que antecederam às análises (total de aproximadamente 5 a 6 dias). Este fato também foi observado por Oliveira (2006), que encontrou teores maiores de vitamina C nas amostras desidratadas de pólen apícola, concluindo que durante o período de armazenamento do pólen apícola fresco em freezer ocorreram perdas de vitamina C e que o processo de desidratação,

embora promova perda vitamínica, sucessivamente a este fato, auxilia na conservação dos teores desta vitamina.

O resultado encontrado neste trabalho se assemelha aos descritos por Szczesna *et al.* (1991), que observaram valores médios de vitamina C de $140\mu\text{g/g}$ ($n=2$) em amostras polonesas de pólen apícola. Já Oliveira (2006) encontrou resultados superiores ao analisar o conteúdo de vitamina C nas amostras de pólen ($n=10$) provenientes da cidade de Pindamonhangaba, São Paulo, apresentando valores que variaram de 273,9 a $560,3\mu\text{g/g}$ nas amostras frescas e de 152,8 e $542,2\mu\text{g/g}$ nas amostras processadas.

A concentração de vitamina E do pólen apícola variou entre 19,43 e $43,00\mu\text{g/g}$ nas amostras frescas e entre 16,27 e $38,64\mu\text{g/g}$ nas amostras processadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2006) variando de 13,5 e $42,5\mu\text{g/g}$ nas amostras frescas e de 8,2 e $32,4\mu\text{g/g}$ nas amostras processadas.

O processo de desidratação do pólen apícola foi responsável por uma perda média de 18,7% do conteúdo de vitamina E; entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras frescas e processadas, de acordo com o teste *t* de Student, com valor de *p* igual a 0,370908.

De acordo com a Portaria nº 31 do Ministério da Saúde, de 13 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998), nos termos de rotulagem, um alimento sólido será considerado fonte de determinada vitamina ou mineral se fornecer 15% da ingestão diária recomendada (IDR) na porção especificada do produto. De acordo com a IDR ou DRI (2000), o consumo de vitamina C deve ser de 90mg/dia para homens e de 75mg/dia para mulheres e 15% deste valor consiste em 13,5 e 11,3mg de vitamina C para homens e mulheres, respectivamente. Já para vitamina E, a IDR é de 15mg/dia para adultos e 15% deste valor consistiriam na ingestão de 2,25mg de vitamina E por porção. Como a porção de consumo diária recomendada para o pólen apícola desidratado é de até 25g, de acordo com nossos resultados, ele forneceria 2,85 a 8,50mg de vitamina C e 0,41 a 0,97mg de vitamina E diariamente, deste modo não poderia ser considerado fonte destas vitaminas.

Tabela 14. Concentração dos carotenóides totais, β -caroteno e seu valor pró-vitaminico A nas amostras de pólen *in natura* e desidratadas e sua perda pelo processamento.

Lotes	Carotenóides totais (g/g)*			β -caroteno (g/g)*			Pró-vitamina
	<i>In natura</i>	Desidratado	% (perda)	<i>In natura</i>	Desidratado	% (perda)	
A	42,77 $\pm$ 2,97	40,62 $\pm$ 4,89	5,0	6,96 $\pm$ 0,44	6,65 $\pm$ 0,29	4,5	0,55
B	27,08 $\pm$ 1,64	25,34 $\pm$ 1,20	6,4	3,77 $\pm$ 0,10	3,14 $\pm$ 0,09	17,5	0,26
C	36,31 $\pm$ 4,97	33,95 $\pm$ 2,95	6,5	5,95 $\pm$ 0,35	5,05 $\pm$ 0,03	15,1	0,42
D	344,6 $\pm$ 24,6	268,5 $\pm$ 14,9	22,1	99,27 $\pm$ 2,45	77,88 $\pm$ 5,01	21,6	6,48
E	138,4 $\pm$ 14,6	103,3 $\pm$ 9,2	25,4	29,84 $\pm$ 2,59	25,19 $\pm$ 1,80	15,6	2,10
F	137,1 $\pm$ 6,0	117,2 $\pm$ 16,8	14,5	22,13 $\pm$ 0,83	17,83 $\pm$ 1,91	19,4	1,49

* As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

A concentração de carotenóides totais do pólen apícola fresco variou entre 27,08 e 344,6 μ g/g e nas amostras processadas variou de 25,34 a 268,5 μ g/g. Quanto ao β -caroteno, os resultados variaram entre 3,77 e 99,27 μ g/g nas amostras frescas e entre 3,14 e 77,88 μ g/g nas amostras processadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2006) com concentrações de carotenóides totais variando de 4,6 a 178,7 μ g/g e de β -caroteno variando entre 32,3 e 90,48 μ g/g nas amostras processadas, chamando a atenção ainda para a ausência de β -caroteno nas amostras coletadas no mês de Abril de 2005. Já Muniategui *et al.* (1990), mostraram valores de 0,49 a 242,6 g/g de amostra para carotenóides totais e obtiveram em média 10 μ g/g de β -caroteno em amostras comerciais de pólen apícola da Espanha.

No presente trabalho, o processo de desidratação do pólen apícola foi responsável por uma perda média de 13,3% do conteúdo de carotenóides totais e de 15,6% no conteúdo de β -caroteno. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras frescas e processadas, de acordo com o teste t de Student, com valor de *p* igual a 0,719074 e 0,781811 para carotenóides totais e β -caroteno, respectivamente. Oliveira (2006) observou perda de 40,4% no conteúdo de carotenóides totais e de 56,5% no conteúdo de β -caroteno após o processamento do pólen (n=10), com diferença estatisticamente significativa. Já Szczesna *et al.* (1991) não observaram perda da pró-vitamina A após o processo de desidratação do pólen (n=1).

A porcentagem de β -caroteno encontrado no pólen apícola fresco variou de 14 a 29% em relação aos carotenóides totais. O valor pró-vitaminico A das amostras processadas variou entre 0,26 e 6,48 μ g de retinol (12 μ g de β -caroteno

correspondendo a 1 μ g de retinol). A ingestão diária recomendada para vitamina A é de 900 μ g/dia para homens e de 700 μ g/dia para mulheres (DRI, 2000), logo, em termos de rotulagem, apenas o lote D pode ser considerado fonte desta vitamina, através de quantidade de β -caroteno que apresenta. A porção diária recomendada de pólen apícola seco de 25g forneceria 162 μ g de retinol, ou seja, 18% da ingestão diária recomendada para homens e 23% para mulheres.

5.2.2 Análise polínica

A análise polínica permite identificar as principais fontes poliníferas utilizadas pelas abelhas, bem como, os períodos de produção de pólen no campo e possíveis épocas de carência (MORETI *et al.*, 2002). Na Tabela 15 podemos observar a frequência dos tipos polínicos dos lotes obtidos nas amostras de 2007.

Tabela 15. Porcentagens de tipos polínicos obtidos em amostras desidratadas de pólen apícola.

Família Gênero / Espécie	Frequência (%)*					
	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E	Lote F
Acacia	< 3 (PI)					
Areaceae tipo <i>Astrocaryum</i>	5 (PII)	3 (PII)	5 (PII)	10 (PII)	20 (PA)	10 (PII)
Asteraceae	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	20 (PA)
Cecropia				30 (PA)		10 (PII)
Eucalipto	< 3 (PI)					
Fabaceae (amarela)	< 3 (PI)			3 (PII)	< 3 (PI)	< 3 (PI)
Malvaceae		< 3 (PI)	< 3 (PI)		< 3 (PI)	
Mimosaceae tipo <i>Mimosa scabrella</i>					47 (PD)	
Mimosaceae tipo <i>Mimosa caesalpineafolia</i>	90 (PD)	95 (PD)	45 (PA)	< 3 (PI)	5 (PII)	10 (PII)
Myrtaceae tipo <i>Myrcia</i>		< 3 (PI)	45 (PA)	3 (PII)	< 3 (PI)	20 (PA)
Pachira (Bombacaceae)				< 3 (PI)		< 3 (PI)
Passifloraceae		< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	5 (PII)
Poaceae	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)		< 3 (PI)	< 3 (PI)
Trema	< 1 (PI)				3 (PII)	
NI				3 (PII)	< 3 (PI)	

* PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%); PII = pólen isolado importante (de 3% a 15%); PI = pólen isolado ocasional (< 3%); NI = não identificado.

Verifica-se que o tipo *Mimosa caesalpineafolia* apareceu como pólen dominante nos dois primeiros lotes (A, B). Enquanto o tipo *Mimosa scabrella* apareceu como pólen dominante em apenas um lote (E). Já os lotes C, D e F não apresentaram pólen dominante, apenas pólen acessório tipo *Mimosa caesalpineafolia* e *Myrcia* no lote C, *Cecropia* no lote D e *Myrcia* e *Asteraceae* no lote F. O tipo *Astrocaryum* aparece na proporção de pólen isolado importante, em todos os lotes, com exceção do lote E onde aparece como pólen acessório, indicando que pode se tornar fonte de coleta de pólen se ocorrer em grande quantidade nas áreas de produção. O mesmo acontece com o tipo *Mimosa caesalpineafolia* nos lotes E e F.

Nenhum dos lotes apresentou uma única taxonomia botânica, sendo todas as amostras consideradas pólen heteroflorais, o que lhes garantem propriedades variadas. Tal ocorrência também foi observada por Almeida-Muradian *et al.* (2005), que analisaram a taxonomia botânica de 10 amostras de pólen apícola provenientes do sul do Brasil e, apesar de serem designadas amostra de pólen monofloral pelo produtor, todas elas apresentaram mais de uma taxonomia. Os autores concluíram que o fato das bolotas de pólen apresentar apenas uma cor não indica que sejam necessariamente monofloral, ainda que elas possuam mais chances de serem de uma fonte monofloral quando comparados com amostras que apresentem várias cores.

Na Figura 15 estão apresentados os tipos polínicos observados em cada um dos lotes e a identificação de alguns tipos encontrados nas amostras.

Figura 15. Tipos polínicos encontrados nas amostras (A a F) desidratadas de pólen apícola.

5.2.3 Composição centesimal do pólen desidratado

O conhecimento da composição física e química do pólen apícola é importante para tipificar o produto obtido nas diferentes regiões. Os resultados das análises químicas de composição centesimal, bem como os dados da Regulamentação Brasileira (BRASIL, 2001), Argentina (KRELL, 1996; CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, 1990) e Francesa (BOGDANOV *et al.*, 2004) são mostradas na Tabela 16.

Tabela 16. Análise química das amostras desidratadas de pólen apícola e as Regulamentações Brasileira (BRASIL, 2001), Argentina (KRELL, 1996; CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, 1990) e Francesa (BOGDANOV, 2004).

Lotes	Análise Química* (%)			
	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Cinzas
A	2,56 ± 0,05	24,91 ± 0,88	4,81 ± 0,16	3,17 ± 0,00
B	2,03 ± 0,14	26,45 ± 0,52	4,46 ± 0,20	3,21 ± 0,01
C	2,99 ± 0,04	28,28 ± 0,44	4,53 ± 0,08	3,30 ± 0,03
D	2,18 ± 0,03	21,22 ± 0,18	5,69 ± 0,22	2,90 ± 0,00
E	2,82 ± 0,10	19,98 ± 0,12	5,27 ± 0,32	3,00 ± 0,00
F	1,50 ± 0,05	20,68 ± 0,33	5,18 ± 0,13	2,89 ± 0,01
Valor Médio	2,34 %	23,59 %	4,97 %	3,08 %
Regulamentação Brasileira (%)	Máximo de 4	Mínimo de 8	Mínimo de 1,8	Máximo de 4
Regulamentação Argentina (%)	Máximo de 8	15 a 28	-	Máximo de 4
Regulamentação Francesa (%)	Máximo de 6	10 a 40	1 a 10	2 a 6

* Resultados expressos em base seca através da média ± desvio padrão de análises em triplicata.

De acordo com a Tabela 16, podemos observar que todos os itens estão de acordo com as três especificações (Brasileira, Argentina e Francesa).

Almeida-Muradian *et al.* (2005), ao avaliar amostras desidratadas (n=10) de pólen apícola e coletadas na região sul do Brasil, obtiveram valores de 7,4% de umidade. Este valor é maior que a porcentagem média de umidade encontrada neste trabalho (2,34%). Conforme mostrado no item 5.2 (comparação dos métodos para a determinação de umidade), o método de análise utilizado na determinação de umidade influencia no resultado, uma vez que neste trabalho optou-se por análise através de liofilizador enquanto os autores utilizaram estufa a vácuo. Bastos *et al.* (2003)

também encontraram valores elevados de umidade (média de 8,78%) nas amostras desidratadas de pólen apícola provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Nas amostras estudadas, foi encontrada uma variação de 20,68 a 28,28% de proteína bruta. Resultados similares foram apresentados por: Bastos *et al.* (2003), que encontraram 21,2% de proteínas em amostras de pólen apícola dos estados de São Paulo e Minas Gerais; Funari *et al.* (2003), 26,2% em amostras provenientes de Botucatu/SP; Almeida-Muradian *et al.* (2005), 21,0% em amostras do sul do Brasil; Marchini, Reis e Moreti (2006), 21,4% nas amostras de Piracicaba/SP.

O valor médio de lipídeos totais apresentado neste trabalho foi de 4,97%, semelhante ao encontrado por Funari *et al.* (2003) nas amostras de Botucatu/SP, de 5,1%. Enquanto que Bastos *et al.* (2003) e Almeida-Muradian *et al.* (2005) relataram valores mais altos do que o apresentado neste trabalho, 8,8% e 7,0% respectivamente. Já Barreto *et al.* (2006), ao analisarem amostras de pólen provenientes de várias regiões do Brasil, e Marchini, Reis e Moreti (2006), que analisaram amostras de Piracicaba/SP, apresentaram valores mais baixos: 3,82% e 3,60%, respectivamente.

Com relação ao teor de cinzas, resultados semelhantes foram observados por Bastos *et al.* (2003), Barreto *et al.* (2006) e Marchini, Reis e Moreti (2006) que encontraram valores de 2,79%, 2,89%, 2,90%, respectivamente.

5.2.4 Correlação entre os tipos polínicos e os nutrientes analisados

Realizando-se análise estatística de correlação entre os tipos polínicos e os nutrientes estudados, constatou-se:

- a) Com relação à vitamina C, houve uma forte associação positiva ($r=0,95$) entre a sua concentração e a porcentagem do tipo polínico Myrtaceae tipo *Myrcia* ($p<0,05$). Enquanto o tipo Passifloraceae mostrou uma correlação positiva importante ($r=0,67$), porém apenas marginalmente significativa ($p<0,10$). Isto indica que maiores porcentagens destes tipos polínicos podem estar associadas a maiores concentrações de vitamina C nas amostras de pólen apícola;

- b) Com relação à vitamina E, houve ausência de correlações significativas, sugerindo que os tipos polínicos encontrados nas amostras estudadas não interferem nas concentrações desta vitamina;
- c) Com relação aos carotenóides totais e ao β -caroteno, observou-se perfis semelhantes nas associações com alguns tipos polínicos específicos, conforme mostra a Tabela 17.

Tabela 17. Correlação entre os carotenóides totais e β -caroteno com alguns tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.

Tipo Polínico	Coeficiente de correlação (r)	
	Carotenóides Totais	β - Caroteno
Arecaceae tipo <i>Astrocaryum</i>	0,79*	0,88**
Cecropia	0,84**	0,94**
Fabaceae	0,92**	0,92**
Mimosaceae tipo <i>Mimosa caesalpineafolia</i>	- 0,73**	- 0,94**
Poaceae	- 0,65**	- 0,65**

As correlações entre os tipos polínicos e os carotenóides totais e β -caroteno foram realizadas pela Correlação de Pearson ou Spearman, quando apropriado.

** Correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

* correlações marginalmente significativas ($p < 0,10$).

De acordo com a tabela apresentada, sugere-se que maiores porcentagens dos tipos polínicos Arecaceae tipo *Astrocaryum*, Cecropia e Fabaceae estão fortemente associados a maiores concentrações tanto de carotenóides totais quanto de β -caroteno nas amostras de pólen apícola. Enquanto que maiores teores dos tipos Mimosaceae tipo *Mimosa caesalpineafolia* e Poaceae estão fortemente associados a menores quantidades destes nutrientes;

- d) Com relação às proteínas, houve uma forte associação negativa ($r = -0,81$) entre o seu conteúdo e a porcentagem do tipo polínico Arecaceae tipo *Astrocaryum* ($p < 0,05$), indicando que maiores porcentagens deste tipo polínico pode estar associada a maiores concentrações de proteínas nas amostras de pólen apícola;

- e) Com relação aos lipídeos, houve forte associação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre a sua porcentagem e as dos tipos polínicos Arecaceae tipo *Astrocaryum* ($r = 0,88$) e Fabaceae ($r = 0,93$). Isto indica que quanto maior a presença destes tipos polínicos maior será o conteúdo de lipídeos no pólen apícola. Já o tipo polínico Mimosaceae tipo *Mimosa caesalpineafolia* mostrou uma forte correlação negativa ($r = -0,94$) e significativa ($p < 0,05$) com a concentração de lipídeos, sugerindo que maiores porcentagens deste tipo polínico está associado a menores quantidades de lipídeos no pólen apícola;
- f) Com relação às cinzas, houve ausência de correlações significativas, sugerindo que os tipos polínicos encontrados nas amostras estudadas não interferem nas suas concentrações.

5.2.5 Comparação da metodologia para análise de β -caroteno (CCA x CLAE)

Segundo Kimura e Rodriguez-Amaya (2003), a cromatografia em coluna aberta (CCA) é uma boa técnica para determinação quantitativa e também muito útil para separação e purificação de carotenóides para serem utilizados como padrões nos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entretanto, a CLAE é uma técnica com maior poder de resolução, mais reprodutível com coluna reutilizável e realizada sob condições controladas, sem exposição indevida ao ar e à luz, além de possibilitar a análise de um grande número de amostras e menor tempo. Diante disto, com a possibilidade de analisar as amostras de pólen após seis meses de estocagem por CLAE, foram realizados testes para comprovar a compatibilidade dos métodos e poder dar continuidade ao experimento com utilização da CLAE para análise do β -caroteno em substituição a CCA. Os resultados obtidos com os testes de comparação dos métodos mostram que não existe diferença estatisticamente significativa ($p = 0,591696$) entre eles, de acordo com o teste t de Student, e estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Comparação do conteúdo de β -caroteno ($\mu\text{g/g}$) no pólen apícola, usando CCA e CLAE.

Lote (Amostra)	Método*	
	CCA	CLAE
A (Freezer)	5,92 $\pm$ 0,39	5,11 $\pm$ 0,33
A (Escuro)	3,59 $\pm$ 0,20	3,13 $\pm$ 0,07
A (Luz)	3,52 $\pm$ 0,29	3,30 $\pm$ 0,28

* Resultados expressos em base seca através da média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicata, não apresentando diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste *t* de Student.

Porcu e Rodriguez-Amaya (2006), ao analisar amostras de acerola, mostraram que o conteúdo de β -caroteno obtido pelos métodos de cromatografia em coluna aberta e cromatografia líquida de alta eficiência não diferiram significativamente, atestando a confiança de ambos os métodos para quantificação de β -caroteno. Almeida-Muradian *et al.* (1998) também observaram equivalência entre os métodos de CCA e CLAE ao analisar amostras de vegetais folhosos ($n=5$). O mesmo foi observado por Adewusi e Bradbury (1993) ao analisar o conteúdo de carotenóide na mandioca, concluindo em seu estudo que o método de CCA é adequado para determinação de carotenóides majoritários em alimentos, uma vez que não houve diferença dos resultados quando analisados por CLAE.

5.2.6 Validação dos métodos cromatográficos

A validação dos métodos cromatográficos foi realizada utilizando amostras desidratadas de pólen apícola e a Tabela 19 mostra os valores dos três parâmetros utilizados na validação dos procedimentos analíticos que foram aplicados para a determinação quantitativa do α -tocoferol e do β -caroteno.

Tabela 19. Parâmetros de validação da determinação por HPLC de α -tocoferol e do β -caroteno.

Parâmetros de validação	α -tocoferol	β -caroteno
Linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2,42 a 21,76 ($R^2 = 0,9995$)	2,20 a 44,17 ($R^2 = 0,9959$)
Precisão (coeficiente de variação)	1,5	4,4
Recuperação (%)	96,1	105,9

A linearidade dos seis pontos da curva de calibração do padrão de α -tocoferol e β -caroteno foi comprovada em uma larga variação de concentração. A análise de regressão dos dados analíticos mostrou uma resposta linear entre a área do pico e a concentração de cada material testado nas faixas examinadas.

Os ensaios de precisão, expressos em coeficiente de variação (CV) para seis replicatas medidas de uma mesma amostra comprovou a conclusão, acima mencionada, da acurácia dos métodos utilizados neste trabalho.

Com relação à recuperação da extração, uma amostra homogeneizada foi fortificada com os padrões (α -tocoferol e β -caroteno) e extraída pelo mesmo procedimento que as amostras não fortificadas. A porcentagem média (análise em triplicata) de recuperação obtida revela uma boa eficiência na extração e limites aceitáveis de perda experimental dos materiais testados.

5.2.7 Análises do pólen desidratado após um ano de estocagem

Os lotes analisados foram estocados de três formas diferentes: à temperatura ambiente com exposição à luz; à temperatura ambiente protegido da luz e em freezer. As amostras foram armazenadas em embalagens plásticas transparentes e rotuladas, conforme enviadas pelo entreposto de comercialização. Os resultados correspondentes às análises de vitamina C (ácido ascórbico), de vitamina E (α -tocoferol) e de β -caroteno após seis e doze meses de estocagem estão expressas nas tabelas 20, 21 e 22, respectivamente.

Tabela 20. Concentração de Vitamina C ($\mu\text{g/g}$) nas amostras desidratadas de pólen apícola após seis e doze meses de estocagem.

Condição*															
Lote		Tempo 0 µg/g		Luz				Escuro				Freezer			
				6 meses		12 meses		6 meses		12 meses		6 meses		12 meses	
				µg/g	Perda (%)	µg/g	Perda (%)	µg/g	Perda (%)	µg/g	Perda (%)	µg/g	Perda (%)	µg/g	Perda (%)
A	114 ± 1,62 ^a	53 ± 1,44 ^b	53,5	50 ± 2,80 ^b	56,5	64 ± 4,53 ^b	44,0	61 ± 4,04 ^b	46,3	76 ± 5,30 ^a	33,4	72 ± 9,84 ^b	37,2		
B	124 ± 3,94 ^a	84 ± 7,24 ^b	32,2	84 ± 5,16 ^b	31,8	84 ± 3,76 ^b	31,8	83 ± 0,53 ^b	33,1	99 ± 7,31 ^a	20,2	91 ± 12,8 ^b	26,6		
C	340 ± 11,5 ^a	148 ± 6,68 ^b	56,5	106 ± 2,26 ^b	68,8	90 ± 5,11 ^b	73,6	76 ± 5,72 ^b	77,7	301 ± 9,11 ^a	11,5	284 ± 2,39 ^b	16,6		
D	126 ± 4,88 ^a	47 ± 6,52 ^b	62,7	45 ± 3,07 ^b	64,0	47 ± 0,53 ^b	62,4	40 ± 1,32 ^b	68,6	91 ± 8,41 ^a	27,8	87 ± 4,88 ^b	30,7		
E	127 ± 2,08 ^a	52 ± 2,35 ^b	59,2	44 ± 2,82 ^b	65,4	44 ± 2,95 ^b	65,6	41 ± 3,52 ^b	67,9	98 ± 7,54 ^a	22,8	91 ± 5,87 ^b	28,3		
F	144 ± 4,49 ^a	79 ± 3,95 ^b	44,9	81 ± 4,17 ^b	43,8	75 ± 1,92 ^b	47,9	78 ± 4,21 ^b	46,0	125 ± 2,48 ^a	13,3	118 ± 6,21 ^b	18,4		

* Resultados expressos em base seca através da média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicata. Comparações da estabilidade do pólen nas diferentes condições de tempo e armazenamento realizadas por Two-way ANOVA seguida de Duncan. Diferenças estatisticamente significativas indicadas por letras diferentes nas colunas.

Diante das tabelas apresentadas, pode-se observar que a estocagem em freezer foi a condição mais eficiente na conservação das três vitaminas e a perda na estocagem a temperatura ambiente exposto a luz e protegido da luz foram semelhantes. Enquanto que, considerando as três condições estudadas, a vitamina E parece ser mais preservada durante a estocagem quando comparada a vitamina C e ao β -caroteno.

De acordo com a Tabela 20, podemos observar que a estocagem em temperatura ambiente, tanto nas amostras expostas quanto nas protegidas da luz, foi responsável por uma perda média de 50% na concentração de vitamina C. Quando expostas a luz, houve uma redução média de 52% e 55% após seis e doze meses de estocagem, respectivamente. E, quando protegidos da luz, essa perda foi semelhante: 54% e 59% após seis e doze meses de estocagem, respectivamente. Conforme o teste estatístico realizado, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre essas duas condições quando comparadas às concentrações da vitamina no tempo zero. Porém, não houve diferença entre os períodos de análises (6 e 12 meses) nas duas condições de estocagem a temperatura ambiente. Isto sugere que, quando estocada na temperatura ambiente, a vitamina C é rapidamente perdida, provavelmente devido às oscilações nas temperaturas, e após esta perda drástica inicial, torna-se um pouco estável ao longo da estocagem. Na Figura 16 estão apresentados os valores médios de vitamina C das amostras mostrando o comportamento da mesma em relação aos períodos de estocagem (6 e 12 meses).

Figura 16. Comportamento da vitamina C em amostras desidratadas de pólen apícola após 6 e 12 meses de estocagem.

Com relação às amostras que foram estocadas no freezer, as porcentagens médias de perda foram menores, cerca da metade (22% em 6 meses e 26% em 12 meses) quando comparadas as perdas ocorridas na estocagem a temperatura ambiente.

Entretanto, em relação às concentrações iniciais da vitamina C, só houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) após doze meses de estocagem em freezer. Estes resultados indicam que, levando-se em consideração a retenção da vitamina C como índice de qualidade e vida útil dos alimentos, é recomendável armazenar as amostras desidratadas de pólen apícola em freezer até o consumo.

Com relação à vitamina E, a Tabela 21 mostra que a estocagem nas condições estudadas não foi responsável por perdas drásticas em suas concentrações. Na condição de armazenamento em freezer, as porcentagens médias de redução foram de 5% e 13% após seis e doze meses, respectivamente. Já nas condições de temperatura ambiente, houve uma redução média dessa vitamina em torno de 10% após seis meses de estocagem, tanto quando exposto a luz como quando protegido da luz, e após doze meses de estocagem as perdas médias foram de 18% e 15% para exposto a luz e protegidos da luz, respectivamente.

Na tabela 22 está apresentado o comportamento do β -caroteno ao longo de um ano nas condições estudadas. Pode-se observar que, quando estocado na temperatura ambiente e protegido da luz, a porcentagem de perda do β -caroteno no pólen apícola variou de 39% a 91% após seis meses de armazenamento e de 59% a 76% após doze meses. Quando protegidos da luz, porém ainda em temperatura ambiente, as porcentagens foram semelhantes àsquelas encontradas quando expostos a luz, nos dois períodos estudados. Enquanto que, quando estocado em freezer, houve uma perda média de 11% e 12% da concentração de β -caroteno nas amostras após seis e doze meses, respectivamente, indicando que essa condição é a melhor forma de armazenamento do pólen apícola levando-se em consideração a preservação deste nutriente. Entretanto, de acordo com o teste estatístico empregado, não houve diferenças significativas entre as condições estudadas, nem entre os períodos (6 e 12 meses).

O único trabalho encontrado que relatam a estabilidade das vitaminas em pólen apícola foi realizado na Polônia por Szczesna *et al.* (1991), que mostraram perdas de 37% e 90% no conteúdo de vitamina C ($n=2$) após seis e doze meses, respectivamente, de estocagem a 20°C. Porém não houve perda desta vitamina quando as amostras foram armazenadas por seis meses a -20°C, mas sim após 12 meses de estocagem nessa temperatura (45%). Quanto à concentração de pró-vitamina A nas amostras ($n=1$) de pólen, os autores não observaram perdas após seis meses de estocagem em nenhuma das condições (20°C e -20°C) e encontraram apenas pequenas porcentagens de redução (3% e 5%) após doze meses nessas temperaturas (20°C e -20°C).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- As três vitaminas antioxidantes estiveram presentes nas amostras desidratadas de pólen, com concentrações variando entre 114 e 340 μ g/g de vitamina C; 16,27 e 38,64 μ g/g de vitamina E; e entre 3,14 e 77,88 μ g/g de β -caroteno. Porém, essas amostras não podem ser consideradas fontes destas vitaminas, com exceção apenas do lote D, que forneceu mais de 15% do valor pró-vitâmico recomendado de vitamina A na sua porção diária.
- A composição centesimal das amostras estudadas está de acordo com as especificações estabelecidas pela legislação brasileira em vigor (Instrução Normativa Nº 3, de 19/01/2001), bem como pelas legislações Argentina e Francesa.
- Não houve perdas significativas quanto aos teores de vitamina E e de β -caroteno durante o processo de desidratação. Entretanto, a concentração de vitamina C das amostras frescas foi significativamente menor que das amostras processadas, provavelmente devido à instabilidade do ácido ascórbico em solução, e por isso, embora o processo de desidratação promova perda vitamínica, sucessivamente a este fato, auxilia na conservação da vitamina C.
- Houve grande variabilidade dos tipos polínicos encontrados nas amostras e alguns deles estiveram fortemente correlacionados com os teores de vitamina C (Myrtaceae tipo *Myrcia*), de β -caroteno (Arecaceae, Cecropia e Fabaceae) e de lipídeos (Arecaceae e Fabaceae). Outros estiveram correlacionados de forma negativa, como é o caso dos tipos *Mimosa caesalpineafolia* e *Poaceae* com os níveis de β -caroteno, do tipo Arecaceae com as proteínas e do tipo *Mimosa caesalpineafolia* com os lipídeos.

- A estocagem em freezer foi a condição mais eficiente na conservação das três vitaminas e a perda na estocagem a temperatura ambiente exposto a luz e protegido da luz foram estatisticamente semelhantes.
- Considerando-se as três condições estudadas, a vitamina E parece ser a mais preservada durante a estocagem quando comparada a vitamina C e ao β -caroteno. Entretanto, Conforme o teste estatístico realizado, houve perdas significativas ($p < 0,05$) apenas para a vitamina C em todas as condições estudadas quando comparadas a sua concentração inicial (tempo 0).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABUSHITA, A.A.; DAOOD, H.G.; BIACS, P.A. Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.2075-2081, 2000.
- ADEWUSI, S.R.A.; BRADBURY, J.H. Carotenoids in Cassava: Comparison of Open-Column and HPLC Methods of Analysis. **J. Sci. Food Agric.**, v.62, p.375-383, 1993.
- AGOSTINE-COSTA, T.S.; ABREU, L.N.; ROSSETTI, A.G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. **Rev. Bras. Frutic.**, v.25, n.1, p.56-58, 2003.
- ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v.778, p.247-253, 1997.
- ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Stability of vitamins A, E, and B complex in infant milks claimed to have equal final composition in liquid and powdered form. **Journal of Food Science**, v.65, n.6, p.1052-1055, 2000.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.105-111, 2005.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; BERA, A.; FELSNER, M.L.; CANO, C.B. Produtos Apícolas. In: ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap.10, p.183-198.

* De acordo com a NBR 6023/10 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. Carotenoids and provitamin A value of some Brazilian sweet potato cultivars (*Ipomoea batatas* Lam.). **Rer. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, v.28, n.2, p.145-54, 1992.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. Carotenóides. In: PENTEADO, M.D.V.C. (org.). **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP: Manole, 2003. cap.1, p.1-52.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; RIOS, M.D.G.; SASAKI, R. Determination of provitamin A of green leafy vegetables by high performance liquid chromatography and open column chromatography. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.137, n.7, p.290-294, 1998.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1995.
- BADOLATO, M.I.C.B.; SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; ANTUNES, J.L.F. Estudo comparativo de métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas naturais e industrializados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.16, n.3, p.206-210, 1996.
- BARRETO, L.M.R.C. **Pólen apícola brasileiro: perfil da produção, qualidade e caracterização organoléptica**. Botucatu, 2004. 150p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista.
- BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Federal. **B. Indústr. Anim.**, v. 62, n. 2, p. 167-175, 2005.
- BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O.; DIB, A.P.S. **Produção de Pólen no Brasil**. Taubaté-SP: Cabral Editora e Livraria Universitária, 2006. 99p.
- BARTH, O.M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989. 150p.

- BASTOS, D.H.M.; BARTH, O.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S.; MICHELAN, M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **J. Apic. Res.**, v.43, n.2, p.35-39, 2004.
- BASTOS, D.H.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.62, n.3, p.239-244, 2003.
- BEITUNE, P.E.; DUARTE, G.; QUINTANA, S.M.; FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; VANNUCCHI, H. Hipovitaminose A: Cofator clínico deletério para o homem. **Medicina**, v.36, p.5-15, 2003.
- BIANCHI, M.L.P.; SILVA, C.R.; TIRAPEGHI, J. Vitaminas. In: TIRAPEGUI, J. e cols. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p.59-71.
- BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.V.C. Teores de retinol, β -caroteno e α -tocoferol em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, n.3, p.349-355, 1999.
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.D.V.C. Vitamina E. In: PENTEADO, M.D.V.C. (org.). **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP: Manole, 2003. cap.4, p.121-164.
- BOGDANOV, S.; BIERI, K.; GREMAUD, G.; IFF, D.; KÄNZIG, A.; SEILER, K.; STÖCKLI, H.; ZÜRCHER, K. (2004) **Swiss Food Manual** Chapter 23 B: Bienenprodukte: Pollen, BAG (Swiss Federal Office for Public Health), Berne.
- BOSS, E.A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel**. Campinas 2004. 129p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas.

BRASIL. Portaria n.31, de 13 de janeiro de 1998. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais, constante do anexo desta Portaria. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=64&word>. Acesso em: 14/08/08.

BRASIL. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=12479&word>. Acesso em: 14/08/08.

CAMPOS, M.G.R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v.47, n.2, p.156-163, 2008.

CAMPOS, M.G.; CUNHA, A.; MARKHAM, K.R. Bee pollen: composition, properties and application. In: MIZRAHI, A.; LENSKY, Y., eds. **Bee products: properties, applications and apitherapy**. New York: Plenum Press, 1997. p.93-100. (Proceedings of an International Conference on Bee Products: properties, applications, and apitherapy, held may 26-30, 1996, in Tel Aviv, Israel).

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003. 207p.

CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO de pólen. Artículo 785 – Resolucion 1550 de 12 de dezembro de 1990. Capitulo X, página 15. Disponível em: http://www.anmat.gov.ar/codigoa/CAPITULO_X_Azucarados_atualiz_06-03.pdf. Acesso em 31/01/2008.

COMBS, G.F. Vitaminas. In: MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002. cap.4, p.65-105.

- CORNEJO, L.G. **Pólen**: tecnologia de su produccion, procesado, y comercializacion. Buenos Aires: IPTEA, 1994. 114p.
- COSTA, M.A.L.; PENTEADO, M.D.V.C. Alterações decorrentes de dois tipos de cozimento sobre os teores de carotenóides pró-vitâmnicos A em escarolas (*Cichorium endivia* L.). **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.32, n.2, p.95-100, 1996.
- COZZOLINO, S.M.F. Vitamina E (tocoferol). In: _____. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2 ed. Atual. e ampl. Barueri, SP: Manole, 2007. cap.10, p.276-292.
- DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. (ed). **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. 2 ed. London, New York: Academic Press, 1976. v.2, p.38-165.
- DIETARY Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc (2000). Disponível em: <http://books.nap.edu/books/0309072794/html>. Acesso em: 09/08/08.
- EATON, C.V.; LAW, R. Marketing apitherapy products and the challenge of government regulation. **Bee World**, v.81, n.3, p.109-115, 2000.
- ELLIOT, J.G. Application of antioxidant in foods and beverage. **Food Technol.**, v.53, n.2, p.46-48, 1999.
- ERDTMAN, O.G.E. **Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms**. Watham: Chronica Botânica; Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1952. 539p.
- FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; FILHO, H.G.; CURI, P.R.; GOMES DIERCKX, S.M.A.; FUNARI, A.R.M.; OLIVEIRA ORSI, R. Composição bromatológica e mineral de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, v.11, n.2, p.88-93, 2003.

GARCIA-AMOEDO, L.H., ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real. **Quim. Nova**, v.25, n.4, p.676-679, 2002.

HERBET Jr., E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v.9, n.1, p.33-40, 1978.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018p.

INSTITUTE OF MEDICINE, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. **Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Washington, D.C., National Academy Press, 2001, 797p.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Estabelecimento das condições cromatográficas para análise de carotenóides em alimentos por CLAE: uma ciência ou uma arte? **Bol. SBCTA**, v.37, n.2, p.74-81, 2003.

KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. Rome: FAO, 1996. p.87-113. (FAO Agricultural Services Bulletin, v.124).

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p.

LIAPIS, A.I.; MILLMAN, M.J.; MARCHELLO, J.M. An analysis of the lyophilization process using a sorption-sublimation model and various operational policies. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v.31, n.10, p.1594-1604, 1985.

MALLET, J.F.; CERRATI, C.; UCCIANI, E.; GAMISANS, J.; GRUBER, M. Antioxidant activity of plant leaves in relation to their alpha-tocopherol content. **Food Chemistry**, v.49, p.61-65, 1994.

- MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.
- MENEZES, E.W.; GIUNTINI, E.B.; LAJOLO, F.M. A questão da variabilidade e qualidade de dados de composição de alimentos. **Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v.26, p.63-76, 2003.
- MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; SOUZA, V.C.; RODRIGUES, R.R. **Atlas do pólen de plantas apícolas**. Rio de Janeiro: Papel Virtual, 2002. 93p.
- MUNITEGUI, S.; SANCHO, M.T.; LOPEZ, J.; HUIDOBRO, J.F.; SIMAL, J. Determination of carotenes from bee-collected pollen by high performance liquid chromatography. **J. Apic. Res.**, v.29, n.3, p.147-150, 1990.
- OLIVEIRA, K.C.L.S. **Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadores do processo de desidratação**. São Paulo, 2006. 106p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods (Review). **Journal of Chromatography A**, v.881, p.543-555, 2000.
- OSHIMA, S.; OJIMA, F.; SAKAMOTO, H.; ISHIGURO, Y.; TERAOKA, J. Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen-mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p.2306-2309, 1996.
- PASSOTO, J.A.; PENTEADO, M.D.V.C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante do β -caroteno e da vitamina A: estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p.68-72, 1998.
- PORCU, O.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Variation in the carotenoid composition of acerola and its processed products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.1916-1920, 2006.

- PRESOTO, A.E.F.; RIOS, M.D.G.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. HPLC determination of alpha-tocoferol, beta-carotene and proximate analysis of Brazilian parsley leaves. **Boll. Chim. Ig.**, v.51, n.7, p.111-114, 2000.
- REIS, V.D.A.; MARCHINI, L.C. 2000. Análises físico-químicas de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis Mellifera* L.) em Piracicaba, São Paulo. *In: Anais XIII Congresso Brasileiro de Apicultura*, Florianópolis-SC. Cd. Rom.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CAMPOS, F.M.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.62, p.13-17, 2007.
- RINCÓN, A.M. Efecto de los procesos tecnológicos sobre la calidad nutritiva de frutas y vegetales. *In: GUERRA MODERNELL, M. (coord.). Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos*. Caracas, Venezuela: CYTED, 2003. cap.5, p.105-128.
- RIOS, M.D.G.; PENTEADO, M.D.V.C. Vitamina C. *In: PENTEADO, M.D.V.C. (org.). Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. Barueri, SP: Manole, 2003. cap.6 p.199-225.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington, D. C.: ILSI Press, 2001. 64p.
- SALOMÉ, J.A.; SALOMÉ, L.G. **Manual práctico de produção de pólen apícola**. Florianópolis: EPAGRI, 1998. 53p.
- SÁNCHEZ, E.T. **Polen: Producción Envasado y Comercialización**. Diproansa, 2004. 56p.

- SANT'ANNA, Z.M.; PENTEADO, M.D.V.C. Alterações dos carotenóides decorrentes do cozimento convencional e em forno microondas de três hortaliças. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.32, n.1, p.53-58, 1996.
- SCHMIDT, J.O.; BUCHMANN, S.L. Other products of hive. In: GRAHAM, J.M.; AMGROSE, J.T.; LANGSTROTH, L.L., eds. **The hive and the honey bee: a new book on beekeeping which contains the tradition of "Langstroth on the hive and the honeybee"**. Hamilton: Dadant, 1992. p.928-977.
- SERRA-BONVEHI, J.; CASANOVA, T.M. Estudio analítico para determinar la humedad del polen. **An. Bromatol.**, v.34, n.2, p.339-349, 1987.
- SHOSKES, D.A.; MANICKAM, K. Herbal and complementary medicine in chronic prostatitis. **World J. Urol.**, v.21, p.109-113, 2003.
- SILVA, S.A.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M.; ALENCAR, A.L.S.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J.M.O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Quím. Nova**, v.24, n.4, p.460-464, 2001.
- SILVA, V.L.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina C (Ácido Ascórbico). In: COZZOLINO, S.M.F. (org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2 ed. Atual. e ampl. Barueri, SP: Manole, 2007. cap.12, p.305-324.
- SOUZA FILHO, M.S.M.; LIMA, J.R.; SOUZA, A.C.R.; SOUZA NETO, M.A.; COSTA, M.C. Efeito do branqueamento, processo osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, n.2, p.211-213, 1999.
- STATISTICA 8.0 for Windows**, v. 1. Tulsa, OK: StatSoft Inc. Software, 2007.
- SZCZESNA, T.; RYBAK-CHIMIELEWSKA, H.; BORNUS, L. Effect of storage on variation of contents vitamin C and A in pollen collected bees. **Apiacta**, v.2, 1991.

- TORRES, A.; GUINAND, J.; GUERRA MODERNELL, M. Propiedades nutricionales y estabilidad de los componentes de los alimentos. In: GUERRA MODERNELL, M. (coord.). **Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos**. Caracas, Venezuela: CYTED, 2003. cap.1, p.1-18.
- VILLANUEVA, M.T.O.; MARQUINA, A.D.; SERRANO, R.B.; ABELLÁN, G.B. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.53, n.3, p.217-224, 2002.
- YAMASHITA, F.; BENASSI, M.T.; TONZAR, A.C.; MORIYA, S.; FERNANDES, J.G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.23, n.1, p.92-94, 2003.
- YUYAMA, L.K.O.; MARINHO, H.A.; ALENCAR, F.H.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina A (Retinol) e carotenóides. In: COZZOLINO, S.M.F. (org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2 ed. Atual. e ampl. Barueri, SP: Manole, 2007. cap.8, p.219-261.
- WITHERELL, P.C. Otros productos de la colmena. In: DADANT, E. **La colmena y la abeja mellifera**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1975. 684p.
- ZAFRA, A.O. **El Polen en su salud**. Puebla, Pue: Florimiel S. A., 1979. 60p.