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

Estabilidade de vitaminas do complexo B
em pólen apícola

Vanilda Aparecida Soares de Arruda

Dissertação para a obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian

São Paulo
2009

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

Estabilidade de vitaminas do complexo B
em pólen apícola

Vanilda Aparecida Soares de Arruda

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian

São Paulo
2009

Ficha catalográfica

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

A779e Arruda, Vanilda Aparecida Soares de
Estabilidade de vitaminas do complexo B em pólen apícola /
Vanilda Aparecida Soares de Arruda. -- São Paulo, 2009
105p.

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

Orientador: Almeida-Muradian, Ligia Bicudo de

1. Vitamina : Ciência dos Alimentos 2. Complexo B 3. Bromatologia
I. T. II. Almeida-Muradian, Ligia Bicudo de, orientador.

641.18 CDD

Vanilda Aparecida Soares de Arruda

Estabilidade de vitaminas do complexo B
em pólen apícola

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
1º. examinador

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

São Paulo, 15 de junho de 2009.

“Viver é como andar de bicicleta: É
preciso estar em constante movimento
pra manter o equilíbrio.”

Albert Einstein

A José Fernandes e Maria de
Fátima, pais amados, pela dedicação e
amor incondicional; pela confiança,
compreensão e por acreditar em
meus sonhos.

Aos meus queridos irmãos
Vanderson e Vanderci pelo carinho,
apoio e compreensão em todos os
momentos difíceis, pelas alegrias e
companheirismo.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

E foi mais rápido do que parecia ser... Sofrimento, conquistas, crescimento, lamentações, mas também muitos risos, gestos de amizade, de companheirismo e tantos agradecimentos a serem feitos...

Primeiramente, à Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian, por sua confiança, por acreditar em meu potencial, pelo carinho com que me recebeu e orientou na realização desta pesquisa, por todos os conselhos. Obrigada pelos conselhos e por me ensinar a valorizar meu trabalho e idéias.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas de mestrado concedidas.

À PRONATU Laboratório de Produtos Naturais LTDA, pela parceria para o desenvolvimento do projeto e por nos proporcionar uma visita em campo tão importante e acolhedora. Agradeço em especial à Fabrícia, Farmacêutica Responsável sempre prestativa e acessível, pelo intermédio na parceria e também por acreditar no projeto.

À Dra. Ortrud Monika Barth e seu orientado Alex da Silva Freitas, do Instituto Oswaldo Cruz, por colaborarem na análise polínica, pela atenção e valiosas contribuições.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental DA FCF/USP pelos ensinamentos transmitidos. Em especial aos professores Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Beatriz Rosana Cordenunsi, Maria Inês Genovese, Ursula Maria Lanfer Márquez pelo apoio e ensinamentos durante a realização do nivelamento para ingresso no mestrado.

À minha banca de qualificação: Dra. Adriana Zerlotti Mercadante e Dra. Elaine Cristina Pinto Moreschi, pela atenciosa correção deste trabalho e sugestões.

Às funcionárias Rosa, Lurdinha e Eli, que tanto trabalharam pela ordem, organização e limpeza do laboratório.

Aos demais funcionários: Elaine, Jorge, Edilson, Mônica, Cléo e Isabel pela atenção, carinho e eficiência no desempenho dos seus trabalhos tão importantes para a Pós-Graduação; Cida e Josefa, pela alegria proporcionada aos momentos de descontração regados a café.

À querida amiga Elaine Apolinário que tanto me incentivou a cursar o mestrado e acreditou em minha capacidade, muito obrigada! Você foi um anjo.

Às funcionárias da Nestlé Brasil Elaine, Ana Elisa, Erika e Juliana, pelo treinamento e informações oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

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 Aline Pereira, dedicada aluna de iniciação científica, pela ajuda preciosa nos experimentos, pela companhia nos momentos trabalhosos e pesados do dia-a-dia e, principalmente, pelas conversas, risadas e amizade.
- À Luciana Tedesco Yoshime, colega especial, pelo exemplo de responsabilidade, dedicação e praticidade. Obrigada pela ajuda, sugestões, ensinamentos, palavras de apoio e incentivo que foram indispensáveis em tantos momentos.
- À Otília Teixeira, Daniela Borrmann, Simone Faria, Isabel Massaretto e Bárbara Bicalho pela amizade, momentos de descontração e por me mostrar que a vida acadêmica não se resumia ao laboratório.
- À Juliana Andrade, amiga sem igual, por todos os abraços acolhedores e amorosos.
- À Cristina e Nádia pelo carinho, companhia e conversas regadas a café;
- Aos meus estimados amigos (Tatiana Libbório, Luciana, Elaine, Tatiana Santos, Kelly, Priscila Dantas, Bruno, Michel e Rubens) pelo carinho e por proporcionar momentos de tanta alegria e descontração.
- Aos meus tios (Clóvis e Júscia) e primos (Jusciana e Clóvis Henrique) por todos os programas de domingo em família, que foram tão importantes.
- Àqueles que participam ou participaram do grupo apícola: Graziela Sousa, Alexandre Bera, Fernando Barion, Victor Silva, Renato Souza e especialmente, à Illana Melo (companheira no trabalho com o pólen e amiga), pela ajuda, conversas e companheirismo na jornada de trabalho.
- Finalmente, agradeço a todos os amigos e familiares que estando próximos ou distantes, contribuíram carinhosamente torcendo pela realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Pólen.....	3
2.1.1 Definição e funções.....	3
2.1.2. Importância do pólen para as abelhas.....	5
2.2.3. Palinologia.....	6
2.2. Pólen apícola.....	8
2.2.1. Definição e funções.....	8
2.2.2. Composição físico-química e valor nutricional.....	9
2.2.3. Produção do pólen apícola.....	11
2.2.4. Controle de qualidade do pólen apícola.....	12
2.2.5. Estabilidade do pólen apícola.....	13
2.2.6. Consumo de pólen e benefícios para a saúde humana.....	14
2.3. Vitaminas.....	15
2.3.1. Vitamina B ₁ (Tiamina).....	18
2.3.2. Vitamina B ₂ (Riboflavina).....	22
2.3.3. Niacina (Vitamina PP ou B ₃).....	26
2.3.4. Vitamina B ₆ (Piridoxina).....	30
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Material.....	36
4.1.1. Amostragem.....	36
4.1.2. Preparo e armazenamento das amostras.....	39
4.1.3. Padrões e reagentes.....	41
4.1.4. Equipamentos.....	42
4.2. Métodos.....	42

4.2.1. Determinação da umidade.....	42
4.2.2. Extração simultânea das vitaminas B ₁ , B ₂ , vitâmeros da B ₆ e niacina.....	43
4.2.3. Condições cromatográficas.....	44
4.2.3.1. Determinação da vitamina B ₁ (Tiamina), com reação pré-coluna.....	44
4.2.3.2. Determinação da vitamina B ₂ (Riboflavina).....	45
4.2.3.3. Determinação da vitamina PP através dos vitâmeros niacina e niacinamida.....	46
4.2.3.4. Determinação da vitamina B ₆ através dos vitâmeros piridoxol, piridoxal e piridoxamina.....	48
4.2.4 Análise polínica (microscópica).....	49
4.2.4.1. Preparo da amostra de pólen apícola.....	49
4.2.4.2. Preparo das lâminas para microscopia.....	49
4.2.5. Validação dos métodos cromatográficos.....	50
4.2.6. Análise da composição centesimal.....	52
4.2.7 Análise Estatística.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Cromatogramas obtidos nas análises das vitaminas em amostras de pólen apícola desidratado.....	55
5.2. Validação dos métodos de análise para as vitaminas.....	59
5.3. Análise do pólen apícola <i>in natura</i> e desidratado.....	68
5.4 Composição centesimal do pólen desidratado.....	75
5.5 Análise polínica.....	77
5.6. Análise do pólen apícola desidratado após estocagem.....	80
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS	92

Resumo

ARRUDA, V.A.S. **Estabilidade de vitaminas do complexo B em pólen apícola.** 2009. 120p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2009.

RESUMO

O pólen além de ser a principal fonte de alimento não líquido, para as abelhas, tem sido utilizado como um suplemento da dieta humana. Apesar de muitos autores afirmarem que os produtos apícolas são ricos em nutrientes, pouco se sabe sobre a composição do pólen apícola especialmente em relação à presença das vitaminas do complexo B. De forma original este estudo teve por objetivo avaliar a estabilidade das vitaminas do complexo B (B_1 , B_2 , B_6 e PP) incluindo seus vitâmeros, durante o período de um ano de estocagem, em amostras de pólen apícola desidratado. Verificou-se também o efeito do processamento sobre o conteúdo dessas vitaminas além da possível influência dos tipos polínicos sobre a composição centesimal e conteúdo vitamínico. Foram analisadas concentrações das vitaminas no tempo zero e após 4, 8 e 12 meses, estocadas sob três condições distintas: em temperatura ambiente (com e sem exposição à luz) e em freezer. As vitaminas, após a extração simultânea, foram quantificadas por CLAE, com detecção por fluorescência. Todas as vitaminas propostas foram encontradas nas amostras analisadas e o processo de desidratação não interferiu no conteúdo das mesmas ($p < 0,05$). As variações foram (base seca): 0,59 a 1,09 mg/100g para vitamina B_1 ; 1,73 a 2,56 mg/100g para a vitamina B_2 ; 6,43 a 15,34 mg/100g para a vitamina PP e 0,33 a 0,68 mg/100g para a vitamina B_6 . Todas as amostras foram classificadas como pólen heterofloral, em função da grande variabilidade dos tipos polínicos presentes. Após um ano de estocagem pode-se afirmar que a concentração da vitamina B_1 se manteve constante enquanto que para as demais vitaminas o decaimento da concentração foi dependente do tempo de armazenamento e não da condição de estocagem das amostras ($p < 0,05$). Todas as amostras foram consideradas fonte da vitamina B_2 . Foi possível explicar matematicamente, através de equações de regressão linear oriundas da análise multivariada, a influência do tempo de armazenamento nas concentrações das vitaminas B_6 e PP, com explicabilidade de 76 e 60% respectivamente.

Palavras-chave: Pólen apícola, Complexo B, Estabilidade, Vitaminas.

Abstract

ARRUDA, V.A.S. **Stability of the B complex vitamins in bee pollen**. 2009. 120p. Pharmaceutical Science School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2009.

ABSTRACT

Pollen is the main source of non liquid food for bees and it has been used as a supplement for human diet. Although many authors cited that bee products are rich in nutrients, it is known a little about the composition of bee pollen and, in particular, the presence of the B vitamin complex in this product. This original study has the objective of evaluate the stability of B complex vitamins (B₁, B₂, B₆ and PP), including its vitamers for a period of one year of storage in dried samples of bee pollen. It was also analyzed the effect of processing on vitamin content and the possible influence of polinic types on proximate composition and vitamin content. Samples were analyzed at time zero, after 4, 8 and 12 months. They were stored under three different conditions: room temperature (with and without exposure to light) and freezer. The vitamins were quantified by HPLC with fluorescence detection after simultaneous extraction. All proposed vitamins were found in the analyzed samples and the dehydration process did not interfere in vitamin content ($p < 0.05$). The variations were (dry basis): 0.59 to 1.09 mg/100g for vitamin B₁; 1.73 to 2.56 mg/100g for vitamin B₂; 6.43 to 15.34 mg/100g for vitamin PP and 0.33 to 0.68 mg/100g for vitamin B₆. All samples were classified as heterofloral pollen, according to the big variability of polinic types. After one year of storage, it can be stated that vitamin B₁ concentration remained constant, while for the other vitamins, the concentration loose was dependent on time and not on the storage condition ($p < 0.05$). All samples were considered Vitamin B₂ source. It was possible to explain mathematically, through linear regression equations of multivariate analysis, the influence of storage time in the concentrations of vitamin B₆ and PP, they were explained as 76 and 60% respectively.

Keywords: bee pollen, B complex, Stability, Vitamins.

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. Grãos de pólen apícola.....	7
Figura 4. Coleta de pólen apícola.....	8
Figura 5. Estrutura molecular da vitamina B ₁	19
Figura 6. Estrutura molecular da vitamina B ₂	23
Figura 7. Estrutura molecular da vitamina PP.....	26
Figura 8. Estrutura molecular da vitamina B ₆	31
Figura 9. Colméia de abelhas <i>Apis mellifera</i> com coletor de alvado e coleta de pólen.....	37
Figura 10. Estufa (Ballardin®) com amostra de pólen.....	38
Figura 11. Armazenamento das amostras de pólen apícola em temperatura ambiente e em freezer	40
Figura 12. Sistema cromatográfico utilizado para determinação de vitamina PP.....	47
Figura 13. Cromatogramas característicos da vitamina B ₁	55
Figura 14. Cromatogramas característicos da vitamina B ₂	56
Figura 15. Cromatogramas característicos da vitamina PP.....	57
Figura 16. Cromatogramas característicos da vitamina B ₆	58
Figura 17. Gráficos de linearidade e variação de resposta com massa injetada das vitaminas B ₁ e B ₂	61
Figura 18. Gráficos de linearidade e variação de resposta com massa injetada dos vitâmeros da vitamina PP.....	61
Figura 19. Gráficos de linearidade e variação de resposta com massa injetada dos vitâmeros da vitamina B ₆	62
Figura 20. Tipos polínicos encontrados nas amostras desidratadas de pólen apícola.....	79
Figura 21. Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₁ durante a estocagem, em pólen apícola.....	82
Figura 22. Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B ₂ durante a estocagem, em pólen apícola.....	84

Figura 23.	Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina PP durante a estocagem, em pólen apícola.....	86
Figura 24.	Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₆ durante a estocagem, em pólen apícola.....	88

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Composição química apresentada por alguns autores em diferentes amostras de pólen apícola desidratado brasileiro.....	9
Tabela 2 - Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos, lactentes e crianças (BRASIL, 2005).....	34
Tabela 3 - Dados obtidos no estudo de linearidade das vitaminas B ₁ e B ₂	59
Tabela 4 - Dados obtidos no estudo de linearidade dos vitâmeros da vitamina PP.....	60
Tabela 5 - Dados obtidos no estudo de linearidade dos vitâmeros da vitamina B ₆	60
Tabela 6 - Faixa de trabalho para as vitaminas e vitâmeros.....	63
Tabela 7 - Dados obtidos no estudo de linearidade dos vitâmeros para sensibilidade.....	63
Tabela 8 - Limite de detecção e quantificação dos métodos para determinação das vitaminas.....	64
Tabela 9 - Dados da recuperação de padrão em amostras de pólen apícola para as vitaminas B ₁ e B ₂	65
Tabela 10 - Dados da recuperação de padrão em amostras de pólen apícola para os vitâmeros da vitamina PP.....	65
Tabela 11 - Dados da recuperação de padrão em amostras de pólen apícola para os vitâmeros da vitamina B ₆	65
Tabela 12 - Dados do estudo de precisão dos métodos para as vitaminas B ₁ e B ₂	66
Tabela 13 - Dados do estudo de precisão dos métodos para os vitâmeros da vitamina PP.....	66
Tabela 14 - Dados do estudo de precisão dos métodos para os vitâmeros da vitamina B ₆	67
Tabela 15 - Umidade das amostras de pólen apícola <i>in natura</i> e desidratado.....	68
Tabela 16 - Concentrações das vitaminas B ₁ e B ₂ em pólen apícola <i>in natura</i> e desidratado.....	69
Tabela 17 - Concentrações da vitamina PP e dos seus vitâmeros, nas amostras de pólen apícola <i>in natura</i> e desidratado	71

Tabela 18 -	Concentrações da vitamina B₆ e dos seus vitâmeros, nas amostras de pólen apícola <i>in natura</i> e desidratado.....	73
Tabela 19 -	Análise físico-química das amostras de pólen desidratado e as especificações da regulamentação Brasileira (BRASIL, 2001), Argentina (KRELL, 1996; ARGENTINA, 1990) e Francesa (BOGDANOV, 2004).....	75
Tabela 20 -	Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado.....	77
Tabela 21 -	Concentrações da vitamina B₁ em amostras desidratadas de pólen apícola, após 12 meses de estocagem.....	81
Tabela 22 -	Concentrações da vitamina B₂ em amostras desidratadas de pólen apícola, após 12 meses de estocagem.....	83
Tabela 23 -	Concentrações da vitamina PP em amostras desidratadas de pólen apícola, após 12 meses de estocagem.....	85
Tabela 24 -	Concentrações da vitamina B₆ em amostras desidratadas de pólen apícola, após 4 meses de estocagem.....	87

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 objeto da polinização, para muitos insetos, e especialmente para as abelhas, o pólen é a principal fonte de proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas (WITHERELL, 1975; BARTH, 1989; MORETI *et al.*, 2002).

Os grãos de pólen recolhidos das flores são colocados nas corbículas e transportados 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 tem sido utilizado há muito tempo, principalmente entre os adeptos da alimentação natural, como um suplemento da dieta humana (DADANT, 1966), provavelmente pela riqueza em relação a proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais (SCHAUSE, 1998, SILVEIRA, 1996).

Apesar de muitos autores afirmarem que os produtos apícolas são ricos em nutrientes e vitaminas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996; KRELL, 1996; SÁNCHEZ, 2004), pouco se sabe sobre o teor vitamínico do mel e dos outros produtos apícolas, como é o caso do pólen.

Alguns trabalhos brasileiros foram realizados visando a caracterização, processamento, coleta, preparo e comercialização de pólen apícola, como os de Alves (1995), Barreto (2002), Barreto *et al.* (2000), Barreto e Funari (2003), Funari *et al.* (1994), Funari (1997), Funari *et al.* (1998), Moreti (1995), Salomé e Salomé (1998), Sampaio (1994), Schause (1994), Reis (2001), Rocha *et al.* (2002) e Wiese (1982). Em todos os estudos foram efetuadas análises bromatológicas. Nos trabalhos de Almeida-Mudarian *et al.* (2005), e Oliveira (2006) além da composição química, foram analisadas a vitamina C, carotenóides totais e β -caroteno (pró-vitamina A) em amostras comerciais de pólen apícola, enquanto que as vitaminas do complexo B não foram analisadas.

O pólen apícola vem ganhando destaque como um alimento diferenciado promovendo efeitos benéficos à saúde humana, especialmente utilizado na apiterapia. Como nos demais alimentos ricos em proteínas, o pólen pode perder o valor nutricional rapidamente se manipulado ou armazenado incorretamente (BOGDANOV,

2004). Para evitar problemas com a qualidade deste produto, foram desenvolvidos padrões de identidade e qualidade descritos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), apesar da norma não dizer nada a respeito do prazo de validade para o produto.

O conhecimento da composição química de nutrientes em alimentos é de fundamental importância para o estabelecimento de dietas adequadas aos indivíduos, para a recomendação de uma alimentação balanceada a grupos populacionais e desenvolvimento de novos produtos (LAJOLO, 1995).

Em decorrência da carência de dados sobre a composição do pólen apícola nacional, no que se refere à presença das vitaminas do complexo B incluindo seus vitâmeros, composição centesimal, caracterização polínica ou ainda sobre sua estabilidade frente ao armazenamento, e a fim de agregar valor a este produto bem como colaborar com dados para a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, este trabalho se propõe obter todas as informações anteriormente citadas, além verificar a contribuição dos tipos polínicos no conteúdo das vitaminas, das cinzas, lipídeos, umidade e proteínas em amostras comerciais de pólen apícola desidratado e também o efeito do processamento sobre os teores das vitaminas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O pólen

2.1.1 Definição e funções

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas localizadas nas anteras dos estames das angiospermas, e que 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).

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 (Figura 1). 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).

Os grãos de pólen podem ser de diversas cores, variando entre o branco, amarelo, laranja, vermelho e tons mais escuros, dependendo da sua origem botânica e da composição química dos pigmentos encontrados na exina. Alguns compostos são hidrossolúveis, representados pelos flavonóides e outros lipossolúveis como carotenóides e xantofilas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005).

O pólen pode ser transportado pelo vento, pela água, pássaros, morcegos ou por insetos. Dentre estes estão as abelhas, que recolhem e aglutinam os grãos de pólen em pequenas bolotas, misturando a eles secreções salivares e uma pequena quantidade de néctar (KRELL, 1996; VILLANUEVA *et al.*, 2002).

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

Fonte: <http://cache.eb.m/eb/image?id=63305&rendTypeld=4co> e http://leavingbio.net/TheStructureandFunctionsofFlowers%5B1%5D_files/image007.gif.

O estímulo para as abelhas operárias adultas coletarem e armazenarem o pólen se dá por dois motivos: para a alimentação das larvas de operárias e zangões com mais de 3 dias de idade e para sua própria alimentação, consistindo na matéria-prima necessária para o bom desenvolvimento glandular e conseqüentemente a boa produção de cera, geléia real e outras substâncias (MORETI, 1997; ALVES *et al.*, 1997).

A coleta do pólen pelas abelhas é feita através das peças bucais e dos pêlos distribuídos em seu corpo. Os grãos de pólen, presos aos pêlos, são recolhidos pelas pernas anteriores e medianas e transferidos às pernas posteriores. Em seguida, são armazenados nas corbículas (cestas de pólen), que consistem em estruturas localizadas na altura da tíbia do terceiro par de pernas, como apresentado na Figura 2 (CORNEJO, 1994; MORETI, 1997).

Figura 2. Abelha com carga de pólen na corbícula.

Fonte: <http://www.nmhoney.com/nmhoney/Sub%20Files/pollenbee2.jpg>.

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).

As abelhas operárias visitam uma ou várias espécies florais a fim de obter um pólen completo, de acordo com o tamanho da bolota e do conteúdo nutricional. Desta forma, o pólen monofloral mantém as mesmas características organolépticas e bioquímicas da planta original, enquanto que o pólen heterofloral apresenta propriedades variadas (STANLEY e LINSKENS, 1974).

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 17% do peso da operária coletora.

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, pois a origem botânica do pólen interfere na quantidade de vitaminas, proteínas, carboidratos, minerais e açúcares (MORETI *et al.*, 2002).

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 (Figura 3) 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).

A coleta, a catalogação e a identificação taxonômica de espécies florais visitadas por abelhas de uma determinada região são importantes para os apicultores, que a partir daí podem identificar as fontes de alimentos, visando maximizar a utilização dos recursos disponíveis (MORETI, *et al.* 2000). Este tipo de trabalho consiste na elaboração de um herbário regional.

Foto: Vanilda Arruda

Figura 3. Grãos de pólen apícola.

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 o pólen e a 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). 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).

As abelhas ao coletarem o néctar das flores para produção de mel carregam involuntariamente ou não, também o pólen, sendo este adicionado ao mel quando o néctar é regorgitado nos alvéolos. Desta maneira o pólen aparecerá no mel e em outros produtos da colméia como cera e própolis, constituindo um importante indicador da sua origem geográfica, principalmente, e da origem botânica (MORETI *et al.*, 2002).

2.2 O pólen apícola

2.2.1 Definição e funções

A Instrução Normativa nº. 03, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2001), que estabelece o Regulamento Técnico para Fixação de identidade e Qualidade dos produtos apícolas, define o pólen apícola como sendo 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 desidratado é definido como sendo o produto que passa por processo de desidratação, seguindo os procedimentos adequados de tratamento, com temperatura inferior a 42 °C, e com teor de umidade inferior a 4%.

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).

Foto: Vanilda Arruda

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

2.2.2 Composição físico-química e valor nutricional

A composição do pólen apícola varia entre espécies de plantas; também sofre a influência da idade, da condição nutricional da planta e das condições ambientais durante o seu desenvolvimento (HERBERT Jr. e SHIMANUKI, 1978).

A Tabela 1 apresenta a comparação entre alguns valores nutricionais do pólen apícola desidratado, obtidos por diversos pesquisadores.

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

Componente	Referências						
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)
Umidade (%)	-	8,78	24,1	7,4	3,96	23,60	2,34
Proteínas (%)	21,0	21,20	26,2	21,0	15,78	21,40	23,59
Fibra bruta (%)	NA	NA	1,1	NA	4,60	NA	NA
Açúcares totais (%)	NA	NA	NA	NA	37,36	28,4	NA
Lipídeos (%)	3,0	8,80	5,1	7,0	3,82	3,60	4,97
Cinzas (%)	3,0	2,79	2,6	2,4	2,89	2,90	3,08

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

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

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

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

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

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

G = MELO, 2008 (Pariquera-Açu – SP);

NA = não analisado.

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).

Em geral a média dos valores reportados em relação à composição química do pólen varia 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. Todos os aminoácidos essenciais são encontrados no pólen, sendo a prolina o mais abundante. Outros componentes encontrados em menor quantidade no pólen são as vitaminas (C, E, complexo B, carotenóides precursores de vitamina A), 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 (LOPER, *et al.*, 1980; IANUZZI, 1993; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996; KRELL, 1996).

Estudos internacionais demonstraram que a composição do pólen é variável, sendo 14% e 20 de proteínas, 37% e 71% de carboidratos totais, 5% e 7% de lipídeos, 2% e 3% 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.

Segundo Mizrahi e Lensky (1997), Krell (1996) Schmidt e Buchmann (1992) e Zafra (1979) o pólen apícola 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. Altos níveis de vitaminas do complexo B também foram reconhecidos em pólen apícola por Dutcher (1918).

Sanchez (2004) cita o valor de 5 µg/g de vitamina B₆ no pólen apícola enquanto Stanley, Linskens (1974) informam o intervalo de 3,1 a 6,8 µg/g (em base seca) para vitamina B₆ e 5,6 a 12,1 µg/g (em base seca) para a vitamina B₂, e também em 1983, Donadieu apresentou os intervalos de 16,30 a 19,20 µg/g para a vitamina B₂ e 0 a 9 µg/g (em base seca) para a vitamina B₆. Não existem trabalhos brasileiros que relatam o teor das vitaminas do complexo B em pólen apícola.

2.2.3 Produção do pólen apícola

Alguns fatores influenciam a produção satisfatória de pólen apícola, tais como: a qualidade e as condições da rainha, que deve ser jovem, sadia e de alta postura; o estado sanitário e nutricional da colméia deve ser adequado para se evitar enfermidades e queda na produção; 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; a flora e do calendário apícola regional a fim de se obter resultados satisfatórios durante a coleta, sendo o período da entressafra de mel o mais adequado e condições climáticas favoráveis à prática apícola (CORNEJO, 1994).

De acordo com Salomé e Salomé (1998), as etapas para produção de pólen apícola devem ser: o congelamento, a desidratação, a limpeza e o envase. Para Cornejo (1994), o pólen deve ser seco, limpo, desinfetado, macerado e depois envasado.

Como o pólen apícola apresenta em sua composição alto teor de umidade, o que provoca sua rápida fermentação e deterioração (HERBERT Jr, SHIMANUKI, 1978), o processamento de desidratação é indispensável. Os procedimentos de desidratação mais comumente utilizados pelos apicultores, para preservar o pólen e aumentar seu prazo de validade, é a desidratação ao ar livre ou o aquecimento artificial sendo este último o mais utilizado na produção para fins comerciais (COLLIN *et al.*, 1995).

Os maiores produtores de pólen apícola são a China, os Estados Unidos, o México, a Argentina, a Austrália e a Espanha (SCHMIDT, BUCHMANN, 1992; EATON e LAW, 2000).

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.

Em relação à rota de comercialização do pólen apícola, os Estados brasileiros, em sua maioria, produzem para o seu abastecimento interno. 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. O Estado do Paraná comercializa pólen principalmente para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. (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 da qualidade do pólen apícola

A regulamentação brasileira sobre a qualidade do pólen apícola (BRASIL, 2001) preconiza que o pólen apícola para ser comercializado no Brasil deve ter os seguintes requisitos físico-químicos: umidade (máximo: 30% para o pólen fresco e máximo: 4% para o pólen seco); cinzas (máximo: 4% m/m em base seca); lipídeos (mínimo: 1,8% m/m em base seca); proteínas (mínimo: 8% m/m em base seca); açúcares totais (14,5% a 55,0% m/m em base seca); fibra bruta (mínimo: 2% m/m em base seca) e pH (4 a 6) e acidez livre (máximo: 300mEq/Kg). Além de aroma e

cor característicos de acordo com a origem floral, os grãos devem ser heterogêneos de forma e tamanhos variados, tendendo a esféricos e o sabor deve ser característico.

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).

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).

2.2.5 Estabilidade do pólen apícola

O pólen apícola, assim como outros alimentos ricos em proteínas, pode perder o valor nutricional rapidamente se armazenado de forma incorreta. 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 (CORNEJO, 1994).

Portanto, ambientes secos, frios e escuros podem ser considerados ideais para armazenamento do pólen apícola a fim de preservar seu valor nutricional (CAMPOS, *et al.*, 2003).

Barreto *et al.* (2006), ao avaliarem a vida de prateleira do pólen apícola desidratado concluíram 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 em 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 apícola e benefícios para a saúde humana

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).

Os benefícios, cientificamente comprovados associados ao consumo de pólen apícola, que se relacionam com a prevenção de problemas da próstata (BUCK, REES e EBELING, 1989; KRELL, 1996; SHOSKES, 2002; SHOSKES e MANICKAM, 2003), na dessensibilização frente às alergias, ganho de peso em animais com alimentação suplementada de pólen apícola, efeito bacteriostático e bactericida e proteção contra efeitos adversos dos raios X nos tratamentos com uso de radiação (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; KRELL, 1996; EATON e LAW, 2000). Além disso, existem estudos comprovando a atividade benéfica do pólen apícola com relação a aterosclerose (WOJCICKI *et al.*, 1986) e neoplasias (ZHANG *et al.*, 1995). Porém, muitos efeitos benéficos, atribuídos ao consumo de pólen apícola pela literatura, não têm comprovação científica, assim como o relato de desempenho de atletas, de vitalidade da pele, melhora e cura da acne, anemia, úlceras, hipertensão, resfriados entre outros (KRELL, 1996).

De acordo com Nagai *et al.* (2002) e Campos *et al.* (2003), o pólen apícola apresenta atividade antioxidante ou anti-radicais livres, isto ocorrendo devido aos seus compostos fenólicos, onde os derivados do ácido cinâmico são os mais efetivos. Esta atividade atribui ao pólen apícola propriedades regenerativas para o organismo e vida longa aos usuários freqüentes desse produto (CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996).

2.3 Vitaminas

A idéia de que o valor nutritivo dos alimentos estava relacionado ao conteúdo de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais; permaneceu até o início do século XX, quando foi reconhecido que a presença de pequenas quantidades de substâncias orgânicas específicas era necessária ao organismo e que a falta poderia causar doenças tais como o escorbuto, o raquitismo, a xeroftalmia, a pelagra, e o beribéri (BOBBIO e BOBBIO, 1989).

As vitaminas compreendem um grupo diverso de compostos orgânicos que são necessários para assegurar o crescimento normal e a manutenção da saúde dos animais (BALL, 1994). Possuem composição química e funções biológicas diversas, sendo necessárias para a síntese de co-fatores essenciais e a um grande número reações metabólicas controladas por enzimas e co-enzimas, algumas das quais

possuem uma vitamina como grupo ativo e um componente prostético como veículo. São agentes essenciais ativos para manutenção das funções biológicas, podendo ocorrer na natureza como tal ou sob a forma de precursores, as pró-vitaminas (FRANCO, 1992).

As vitaminas são classificadas quanto à solubilidade; as lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) constituem um grupo de substâncias químicas, com estrutura variada, solúveis em solventes orgânicos, podendo ser armazenadas na gordura corpórea e atingir níveis tóxicos quando consumidas em excesso. As vitaminas hidrossolúveis (Vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido fólico, ácido pantotênico, niacina, biotina e a vitamina C) não são normalmente armazenadas em quantidades significativas no organismo, o que leva à necessidade de um suprimento diário dessas vitaminas (ROBINSON, 1991; BALL, 1998; HOOFFMANN, 1997). As vitaminas hidrossolúveis participam do metabolismo de gorduras, carboidratos e proteínas em diversos pontos das reações (TIRAPEGUI, 2000). Possuem estrutura química diversificada, entretanto suas distribuições entre os alimentos são similares, o que explica porque a deficiência de vários fatores é mais freqüentemente observada do que a deficiência de uma vitamina isolada (AURAND, 1987).

As necessidades diárias tão pequenas são explicadas pela não participação destes nutrientes na edificação da estrutura do organismo e por não serem fonte de energia. As vitaminas cumprem funções catalíticas, facilitando a formação e a eliminação das principais substâncias alimentícias, dirigindo assim o metabolismo (LEHNINGER, 1993).

Por não serem sintetizados no nosso organismo ou o serem, mas em quantidades inadequadas, esses nutrientes precisam ser obtidos através da alimentação (TIRAPEGUI, 2000). Nos últimos anos, estudos científicos relacionam a ingestão de vitaminas com a prevenção de doenças da atualidade, como o câncer (PENTEADO, 2003).

A análise dos conteúdos de vitaminas naturalmente presentes em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que se encontram; da presença de vários interferentes, da complexidade da matriz e da exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes. Os maiores desafios para determinação de vitaminas em alimentos incluem, além do melhoramento dos processos de extração e limpeza, o desenvolvimento e a validação de métodos simultâneos que reduziriam, sensivelmente, o tempo gasto

para a análise e os custos, possibilitando menor geração de resíduos (POLEZELLO e RIZZOLO, 1990; MACRAE, 1990).

A literatura apresenta várias técnicas aplicadas à determinação de vitaminas em alimentos, como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida, eletroforese capilar, métodos bioespecíficos e microbiológicos. Os maiores avanços têm sido observados na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão (PENTEADO, 2003). Pesquisas com CLAE têm sido realizadas para determinação simultânea de vitaminas, em preparações farmacêuticas multivitamínicas e em alimentos (HOLLMAN *et al.*, 1993; DONG *et al.*, 1988).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) pode ser executada à temperatura ambiente com ou sem derivatização das substâncias, utilizando a detecção por UV e/ou propriedades de fluorescência dos compostos que desempenham a função de vitaminas (BALL, 1994). Apesar do método microbiológico ter sido um dos primeiros a ser utilizado para determinação de vitaminas do complexo B em alimentos, essa técnica ainda é empregada, pois apresenta uma boa sensibilidade e não é prejudicada pela complexidade da matriz da maioria dos alimentos (MORESCHI, 2006; PENTEADO, 2003; PRESOTO, 2006).

Os métodos simultâneos de extração apresentam vantagens por tratar igualmente o material a ser estudado, mas nem sempre atendem a todos os tipos de amostras (fluidas e sólidas), sua escolha deve ser condicionada às propriedades individuais das substâncias e à composição química do material. Várias publicações tratam da análise simultânea das vitaminas B₁, B₂ e B₆ em alimentos, mas nenhuma relata a determinação dos vitâmeros da B₆. Para a determinação desses vitâmeros os métodos são específicos para a vitamina B₆. O mesmo ocorre com a vitamina PP. Somente nos estudos feitos por Moreschi (2006) e Presoto e Almeida-Muradian (2008) foi aplicado um procedimento único de extração para as vitaminas B₁, B₂, vitâmeros da B₆ e PP.

2.3.1 Vitamina B₁ (tiamina)

A tiamina, conhecida também como vitamina B₁ ou aneurina, foi a primeira vitamina a ser descoberta, no início do século XX. Sua deficiência no organismo causa o beribéri (desordens do sistema nervoso) fato que em 1885, motivou a Marinha japonesa a aumentar a proporção de carnes e vegetais na dieta de sua tripulação, já que a doença era prevalente no século XIX no sudoeste da Ásia (BALL, 1998; GUBLER, 1991). Os sintomas do beribéri estão associados com perda de apetite, envolvimento cardíaco e neurológicos. O excesso desta vitamina, entretanto, pode acarretar vasodilatação periférica, queda na frequência respiratória, convulsões e morte por paralisia do centro respiratório (BELITZ E GROSHI, 1987; FRANCO, 1992).

A partir do estudo do beribéri, descobriu-se a existência de uma amina essencial ao organismo denominada “fator anti-beribéri”. Surgindo então o termo Vitamina, que significa amina essencial à vida e passou a ser usado como genérico para outros micronutrientes orgânicos essenciais (GUBLER, 1991; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

A tiamina é constituída por uma molécula orgânica contendo dois anéis, um pirimídico e outro tiazólico ligados por um metileno (BALL, 1984; GUBLER, 1991; BORGET *et al.*, 1966) (Figura 5). É comercializada na forma de hidrocloreto de tiamina que é um pó branco ou quase branco, cristalino, muito solúvel em água (1:1), solúvel em glicerol, pouco solúvel em álcool (1:170), insolúvel em clorofórmio e éter (BRITISH, 1999; MARTINDALE, 1996).

O espectro de absorção do cloridrato de tiamina sofre influência do pH, assim em pH=2,9, λ máximo de absorção é 246 nm e em pH=5,5, λ máximo é 234 nm. O peso molecular é de 376,36 gramas com fórmula empírica C₁₂H₁₇N₄OSCl.HCL com nome químico, cloridrato de 3-(4'-amino-2'-metilpiridina-5'-ilmetil-5-(-hidróxietil)-4-metiltiazólio) (BALL, 1994).

Figura 5. Estrutura molecular da vitamina B₁ na forma de mononitrato de tiamina.

Outra forma comercializada dessa substância é o nitrato de tiamina que também é um pó cristalino branco ou quase branco e que ao contrário da forma hidrocloreto de tiamina é pouco solúvel em água (1:44), solúvel em álcool e em clorofórmio. O peso molecular é de 327,4 gramas com fórmula empírica $C_{12}H_{17}O_4N$ (BRITISH,1999; MARTINDALE,1996).

A tiamina não é naturalmente fluorescente, mas quando em presença de agentes oxidantes em meio básico pode formar o tiocromo, composto que apresenta forte fluorescência (BARGER *et al.* 1935). A formação do tiocromo também é observada quando tiamina é oxidada na presença de riboflavina. A tiamina pode ainda decompor o ácido fólico quando em soluções com pH entre 5,9 e 6,9. A cianocobalamina também é degradada em soluções na presença de tiamina e niacinamida. Tais interações entre a tiamina e outras vitaminas hidrossolúveis foram apresentadas numa revisão feita por DeRitter em 1982.

A tiamina é uma das vitaminas mais termolábeis o que explica as grandes perdas observadas durante o cozimento doméstico e no processamento de alimentos comercializados (COULTATE, 1996).

Em tecidos de origem animal de 95 a 98% da tiamina estão presentes na forma fosforilada. Cerca de 80 a 85% estão como difosfato, chamada de tiamina difosfato (TPP) ou tiamina pirofosfato ou cocarboxilase. Quantidades menores ocorrem como tiamina monofosfato (TMP) e trifosfato (TTP). Em produtos de origem vegetal a vitamina ocorre predominantemente na forma não fosforilada. É praticamente absorvida

na forma livre especialmente em alimentos de origem animal, e mais freqüentemente sob a forma de pirofosfato (GUBLER, 1991; ROBINSON, 1991).

Poucos alimentos são excepcionalmente ricos em tiamina. As melhores fontes incluem leveduras e extratos de levedura, trigo, aveia, grãos cereais integrais, nozes, coração, rins, peixes, feijões, carnes magras e fígado (LEHNINGER, 1993). Hortaliças, frutas, ovos, carne de frango, de carneiro e de boi, constituem fontes intermediárias desta vitamina. O leite contém quantidades relativamente baixas. É relativamente ausente em óleos, gorduras e alimentos refinados como açúcar (BALL, 1984; GUBLER, 1991; BORGET *et al.*, 1966).

A tiamina pirofosfato (TPP) atua como transportador intermediário do grupo aldeído na descarboxilação do piruvato, nas reações de transcetolase na via das pentoses e parece desempenhar papel essencial na transmissão nervosa além de atuar na redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (GUBLER, 1991; ROBINSON, 1991). Os principais órgãos de depósito desta vitamina são cérebro, os rins, o coração e o músculo (BALL, 1984; GUBLER, 1991; BORGET *et al.*, 1966).

A deficiência de vitamina B₁ afeta os tecidos como sistema nervoso, rins e coração com alto requerimento de energia; ocorre devido à ingestão insuficiente de tiamina através da dieta ou pelo aumento no requerimento durante a gravidez, lactação, aumento no consumo de carboidratos e outros, pode comumente ser observada em indivíduos subnutridos, pacientes com doenças crônicas ou em quadros de anorexia e alcoolismo (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003a).

Os métodos descritos na literatura para análise da tiamina em alimentos são: fluorimetria, cromatografia gasosa, método microbiológico e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na extração da tiamina são aplicadas, a hidrólise ácida seguida da hidrólise enzimática, o que permite fazer a quantificação total da tiamina presente no alimento. A finalidade da hidrólise ácida, geralmente executada com ácido clorídrico (HCl 0,1 M em banho-maria a 100 °C ou em autoclave a 121 °C por 30 minutos) é essencialmente desnaturar as proteínas e liberar as vitaminas de sua associação com as proteínas da matriz. Quanto ao tratamento enzimático é permitir a desfosforilização das vitaminas para a forma livre. Takadiastase, Claradiastase e Mylase são as enzimas mais comumente utilizadas. Em alimentos onde predomina a forma livre da vitamina, a hidrólise ácida deve ser conduzida em temperaturas mais baixas do que as

utilizadas na extração das demais vitaminas do complexo B (normalmente hidrolisadas a 121 °C), uma vez que a tiamina é mais sensível ao calor. Na determinação das diferentes formas da vitamina (livre e ligadas) é suficiente empregar um agente desproteinizante na amostra, são comumente usados o ácido tricloroacético (TCA) ou o perclórico a temperatura ambiente, seguido de filtração ou centrifugação (GUBLER, 1991; OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003a).

Para determinação da tiamina por fluorimetria é necessário fazer a derivatização da mesma para formação do tiocromo, visto que a vitamina não é naturalmente fluorescente. A conversão acontece pela reação da tiamina com ferricianeto de potássio em meio básico, o tiocromo é extraído em isobutanol (AUGUSTIN, 1984). Pela cromatografia gasosa não é possível fazer a quantificação direta da tiamina, a vitamina é então submetida ao tratamento com sulfito que quebra a tiamina formando um tiazol. O derivativo 5(2-hidroxi-etil)-4-metil-tiazol é extraído com solventes orgânicos e possui as características necessárias para análise por cromatografia gasosa (BALL, 1998). No método microbiológico, é necessário primeiro obter a forma livre da vitamina e o emprego de microrganismo para o qual a vitamina seja essencial. Os microrganismos empregados na quantificação da tiamina são geralmente *Lactobacillus viridescens* e o *Lactobacillus fermentum* (OLLILAINEN *et al.*, 2001; van de BERG *et al.*, 1996; BALL, 1994; SCOTT *et al.* 1984). Na determinação por CLAE é comumente empregado sistema de eluição isocrático tanto para análise da tiamina quanto para determinação simultânea com outras vitaminas. As fases móveis são compostas por água ou tampões e modificadores orgânicos da polaridade, como a acetonitrila, o metanol e a trietilamina (FINGLANS e FAULKS, 1984) podendo ser acidificadas com ácido acético ou fosfórico (CHASE *et al.*, 1993; MUÑOZ *et al.*, 1994). Frequentemente é empregada a cromatografia de interação iônica ou íons pareados em que são adicionados íons anfifílicos na fase móvel que vão influenciar na retenção dos analitos iônicos presentes na amostra, ocorrendo aumento no tempo de retenção de compostos com carga oposta à do íon pareante e redução para aqueles com mesma carga do íon pareante, sendo negligenciável a influência na retenção de compostos destituídos de carga. A detecção é realizada por UV ou por fluorescência, sendo que para alimentos não enriquecidos dá-se preferência ao uso da fluorescência já que os teores naturalmente presentes são muito baixos e em UV são detectados muitos interferentes, a tiamina é convertida a

tiocromo como no método de fluorimetria, a derivatização pode ser pré ou pós-coluna (BALL, 1994). Na análise simultânea das vitaminas a derivatização deve ser realizada pós-coluna, pois a reação pode destruir outras vitaminas presentes, impedindo sua quantificação na mesma corrida cromatográfica (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003a).

2.3.2 Vitamina B₂ (riboflavina)

A riboflavina ou vitamina B₂ ou ainda lactoflavina foi descoberta na década de 1920 como fator de crescimento resistente a altas temperaturas presente em extrato de levedura. No início dessa década, este composto foi isolado da clara do ovo e doze anos depois, a ovoflavina foi obtida desta matriz. Em 1932, Wagner-Jauregg isolou a vitamina B₂ no leite e Warburg e Christian isolaram uma enzima amarela, contendo flavina na estrutura, a partir do extrato de levedura, que posteriormente foi identificada como a forma fosforilada da riboflavina (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b; COOPERMAN e LOPEZ, 1991). O termo vitamina B₂ engloba três compostos com mesma atividade vitamínica: riboflavina, flavina mononucleotídeo ou riboflavina 5-fosfato (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo ou riboflavina 5'-adenosildifosfato (FAD) (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b; COOPERMAN e LOPEZ, 1991).

A riboflavina (Figura 6) é composta por uma molécula de isoaloxazina com cadeia lateral de ribitol, com nome sistemático de 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol) isoaloxazina e peso molecular 376,36 gramas com fórmula empírica C₁₇H₂ON₄O₆. As outras formas ativas da vitamina B₂, FMN e FAD, apresentam características físico-químicas semelhantes às da riboflavina (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b; COOPERMAN & LOPEZ, 1991).

Figura 6. Estrutura molecular da vitamina B₂.

A riboflavina é um pó cristalino, amarelo-alaranjado, pouco solúvel em água, insolúvel no álcool, clorofórmio e éter, apresenta aumento da solubilidade quando em solução de cloreto de sódio (0,9%) e soluções alcalinas diluídas. Em soluções aquosas, a riboflavina apresenta quatro comprimentos de onda máximos de absorção em UV-visível: 223, 266, 373 e 455 nm. Decompõe-se na presença da luz, principalmente quando em solução, sobretudo em meio alcalino ou soluções ácidas muito diluídas (BRISTISH, 1999; MARTINDALE, 1996; DeRITTER, 1982; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003b). Sob condições neutras e ácidas o principal produto da fotodegradação é o lumicromo e em condições alcalinas a lumiflavina. A riboflavina e as formas FAD e FMN mostram emissão de fluorescência em torno de 530 nm quando excitadas a 440-500 nm. Em soluções aquosas neutras a riboflavina apresenta fluorescência amarelo-esverdeada com máximo de emissão a 521 nm (BALL, 1994).

A riboflavina é uma das vitaminas mais estáveis frente ao calor. Os teores dessa vitamina no leite são pouco afetados pelos processos de pasteurização, evaporação ou condensação, porém há perdas significativas quando o produto é acondicionado em embalagens transparentes. É estável durante o aquecimento e cozimento de alimentos, desde que protegida da luz (COULTATE, 1996).

A riboflavina proveniente da dieta encontra-se na forma das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) ligadas a proteínas; no entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o meio ácido propicia a liberação das coenzimas. As coenzimas livres sofrerão a ação das pirofosfatases e

fosfatases, presentes no intestino delgado, levando à liberação da riboflavina. Extratos de levedura são as melhores fontes naturais de riboflavina, fígado e rins também são fontes muito expressivas. Alimentos de origem animal como as carnes, ovos, leite, queijos são boas fontes. Enquanto frutas, folhas verdes e legumes e cereais possuem quantidades muito baixas (BALL, 1994; COOPERMAN e LOPEZ, 1991; HARTMAN e DRYEDEN, 1983)

A riboflavina na forma de enzimas flavinas desempenha papel vital no catabolismo de carboidratos e lipídeos, promovendo as seguintes reações: reoxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH); oxidação do succinato à fumarato e oxidação do ácido graxo saturado acil-CoA para ácido graxo α, β -insaturado. Em todas estas reações as flavinas reduzidas, $FADH_2$ e $FMNH_2$ são reoxidadas pelos citocromos na cadeia transportadora de elétrons, quando então ocorre a transferência do hidrogênio para o oxigênio molecular com conseqüente formação de água. Alivia a fadiga ocular (vista cansada) e é importante na prevenção e tratamento da catarata, é necessária para a formação de hemácias, produção de anticorpos, respiração celular e crescimento. Existe ainda o envolvimento na síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa, no catabolismo de aminas biogênicas e de bases purínicas originadas na degradação dos ácidos nucleicos. As flavinas são necessárias também na conversão da vitamina B_6 e do ácido fólico em formas coenzímicas ativas (BALL, 1994).

Os cofatores FMN e FAD atuam como carregadores de elétrons em diversas reações de óxido-redução importantes no metabolismo. Isso demonstra que dietas inadequadas de riboflavina poderiam levar a distúrbios no metabolismo intermediário. Os sinais observados na deficiência dessa vitamina não são específicos porque ela está relacionada ao metabolismo de outras vitaminas. O que se observa é uma deficiência concomitante de diferentes vitaminas. Alguns estudos foram promovidos para verificar melhor quais seriam os sintomas da deficiência de riboflavina. Em humanos os sinais incluem lesões na boca e ao redor do nariz, fissuras na língua, dermatite ano-genital vascularização superficial da córnea, catarata e fotofobia (COOPERMAN e LOPEZ, 1991; HOOFFMANN, 1997; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003b).

Para análise da riboflavina em alimentos, os métodos geralmente empregados são: fluorimetria, método microbiológico e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na análise é possível determinar o conteúdo das três formas presentes: riboflavina livre e ligadas, FAD e FMN, enquanto que para a determinação do teor total é necessário primeiramente promover a conversão das formas ligadas para a livre durante a extração. Quando há interesse na análise das diferentes formas de riboflavina, é suficiente uma simples acidificação da amostra com ácido tricloroacético (TCA) para precipitação de proteínas, seguida de filtração ou centrifugação. Uma hidrólise ácida com ácido mineral diluído: ácido sulfúrico 0,22M a 121 °C por 20 minutos ou ácido clorídrico 0,1M a 100 °C em banho-maria ou a 121 °C em autoclave por 30 minutos desnatura as proteínas, contribuindo para a liberação da vitamina da matriz alimentícia, bem como a conversão da FAD para FMN, e também conversão parcial de FMN para riboflavina livre. A etapa seguinte é a hidrólise enzimática, onde normalmente emprega-se a takadiastase, a claradiastase, a mistura de takadiastase e beta-amilase, a mistura de takadiastase com claradiastase e papaína. As condições cromatográficas para a análise das vitaminas B₂ e B₁ são as mesmas, sendo que elas podem ser extraídas simultaneamente. O método fluorimétrico e o de CLAE normalmente produzem resultados concordantes (COOPERMAN e LOPEZ, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003b).

No método oficial AOAC 970.65 após a hidrólise ácida e enzimática (fosfatase), a amostra é purificada por precipitação no ponto isoelétrico. A riboflavina é oxidada, na presença de KMnO₄ e H₂O₂, formando a lumiflavina, composto fluorescente com λ exc. de 440 nm e λ em. de 565 nm. Porém, o método não é indicado para alimentos que possuem enzimas com capacidade para degradar a vitamina B₂, como o fígado, ou que apresentem altas concentrações de gordura, promovendo a perda da vitamina (RUSSEL e VANDERSLICE, 1992).

Para quantificação da riboflavina através do método microbiológico o microrganismo empregado é o *Lactobacillus casei* (ATCC 7469). Outro microrganismo que também pode ser empregado é o *Enterococcus faecalis* (ATCC 10100). Ball (1994) mencionou que os resultados obtidos com o uso do segundo são bastante semelhantes aos obtidos com o primeiro. O ensaio turbidimétrico é realizado a 540 ou 590nm (van den BERG *et al.*, 1996).

2.3.3 Niacina (vitamina PP ou B₃)

Em 1837, a nicotinamida foi identificada como sendo o componente presente em extratos de fígado usados para tratar a língua magenta em cães e houve também o relato de que o ácido nicotínico curava a pelagra. Mais tarde, por volta de 1934 a 1935, o ácido nicotínico e a nicotinamida foram isolados das coenzimas NAD e NADP, época em que ficou conhecido o papel bioquímico em reações de transferência de elétrons e seu papel nutricional (BALL, 1994).

As duas formas da vitamina PP, nicotinamida ou niacinamida e ácido nicotínico ou niacina (Figura 7), são completamente absorvidas em todos os seguimentos do trato gastrointestinal. O ácido nicotínico de nome químico 3-ácido carboxílico piridina, fórmula estrutural $C_5H_4NO_2$ e peso molecular 123,11 gramas, é uma substância cristalina em forma de agulhas brancas, sem cheiro, não higroscópica, possuindo leve sabor de tártaro. É solúvel em água, etanol, glicerol, propilenoglicol, ácidos diluídos e soluções alcalinas. É insolúvel em acetona e éter etílico e completamente solúvel em água fervente. Possui ponto de fusão em torno de 235 a 237 °C. A nicotinamida de nome químico 3-carboxamida piridina, fórmula estrutural $C_6H_6ON_2$ e peso molecular 122,12 gramas, é uma substância cristalina similar ao ácido nicotínico, de sabor amargo. É prontamente solúvel em água e etanol, solúvel em acetona e pouco solúvel em éter etílico e clorofórmio. Possui ponto de fusão em torno de 129 a 131 °C. Quando tratada com álcali ou ácido é convertida a ácido nicotínico (BALL, 1994 ; SANT'ANA, 2003).

Figura 7. Estrutura molecular dos vitâmeros da vitamina PP.

Ácido nicotínico e nicotinamida, no estado seco e em soluções neutras, não são afetados pelo oxigênio atmosférico, luz ou aquecimento. As coenzimas oxidadas (NAD^+ e NADP^+) são lábeis ao álcali e as reduzidas (NADH e NADPH) são lábeis ao ácido. Ácido nicotínico e nicotinamida têm propriedades de bases e formam sais de amônia quaternária quando em solução ácida. O ácido nicotínico, sendo anfotérico, forma sais de ácido carboxílico, quando em solução básica, mas a nicotinamida não possui propriedades ácidas (BALL, 1994; SANT'ANA, 2003).

O ácido nicotínico e a nicotinamida apresentam espectro de absorção similar na região do ultravioleta. A absorvidade é fortemente afetada pelo pH, sendo maior em solução ácida que em solução alcalina, mas o máximo permanece quase inalterado a 261 nm (BALL, 1994).

As melhores fontes de niacina são representadas pelas carnes, vísceras e pescados. Extratos de levedura são excepcionalmente ricos em niacina enquanto farelo de trigo, fígado, coração, rins, carnes, peixes e grãos de cereais integrais constituem fontes ricas. Entre os vegetais, o amendoim constitui a maior fonte de niacina. Outras fontes são o pimentão, as leguminosas e frutas como avelã, caju e jabuticaba (FRANCO, 1992). Em grãos, a niacina está presente na forma de complexos covalentemente ligados com pequenos peptídeos e carboidratos, sendo a niacina esterificada normalmente não disponível nestes complexos. Em outros alimentos a niacina está presente como derivados metilados que funcionam como hormônio vegetal, não biologicamente disponível aos animais. Esta forma, contudo, é lábil ao calor e pode ser convertida à niacina durante o aquecimento de alimentos (BALL, 1994; SANT'ANA, 2003).

A vitamina PP é uma das poucas vitaminas que podem ser sintetizadas no organismo. Sua síntese é realizada a partir do triptofano que é absorvido no intestino após digestão de proteínas. São necessários 60 mg de triptofano para se obter 1 mg de niacina (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998).

A maior parte da vitamina PP presente na dieta está na forma de nicotinamida nucleotídeos, que são hidrolisados no intestino delgado a nicotinamida, absorvida por difusão simples. Após absorção, a nicotinamida é levada ao fígado juntamente com ácido nicotínico e triptofano, onde parte é utilizada e o restante é hidrolisado a amida livre que é liberada na circulação junto com o ácido nicotínico não metabolizado. Estes compostos são utilizados pelos tecidos, para síntese intracelular e NAD e

NADP. O excesso de niacina é metilado no fígado e excretado pela urina (BALL, 1998; SANT'ANA, 2003).

A nicotinamida é componente de duas coenzimas relacionadas, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD^+) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+). Estas coenzimas atuam como transportadoras temporárias de hidrogênio em várias reações metabólicas, como síntese de ácidos graxos, cadeia transportadora de elétrons e glicólise. Vários autores têm demonstrado os efeitos terapêuticos do ácido nicotínico como droga de escolha na redução da taxa de colesterol, diminuição do risco de doenças cardiovasculares e da taxa de mortalidade. Entretanto, alguns destes efeitos podem resultar em respostas tóxicas com sintomas cutâneos, hepáticos e gastrointestinais (BLUM e LEVY, 1989; CANNER *et al.* 1986; KIRCHHOEFER e SHARON, 1993). A deficiência conduz a pelagra, doença dos 4 D: dermatite, diarreia, demência e *death* (morte). Ambos, ácido nicotínico e nicotinamida, podem ser tóxicos se ingeridos em doses excessivas (EYS, 1991).

A pelagra era uma enfermidade freqüente nos Estados Unidos e parte da Europa no início do século XX, mas na atualidade desapareceu nos países industrializados, encontrando-se apenas em alguns alcoólatras. Contudo, continua endêmica na Índia e algumas áreas da China e África (JACOB e SWENDSEID, 1991).

Os principais métodos de análise para determinação quantitativa da niacina em alimentos são o colorimétrico, o microbiológico e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OTAWAY, 1993; BALL, 1994; SANT'ANA, 2003).

Entre os problemas associados à determinação da niacina em alimentos estão relacionados: a interferência de outros compostos e a dificuldade de se detectar pequenas quantidades da vitamina. Na determinação do teor naturalmente presente de niacina, o procedimento de extração geralmente requer hidrólise ácida aplicada com o objetivo de romper complexos protéicos, resultando num extrato que contém quantidades apreciáveis de interferentes (DAWSON *et al.*, 1988; SKURRAY, 1981; SANT'ANA, 2003).

O microrganismo empregado na análise microbiológica é o *Lactobacillus plantarum*, que responde igualmente bem à niacina, à niacinamida e ao NAD, apesar de não diferenciar as duas primeiras formas (BALL, 1994).

O método colorimétrico para análise de niacina não é muito específico, os complexos coloridos formados para quantificação possuem baixa estabilidade e certos reagentes usados, como o brometo cianogênico, são tóxicos e difíceis de manusear (BALL, 1994).

Para análise do conteúdo de niacina por CLAE a preparação da amostra deve ser avaliada quanto a possibilidade de ocorrência de componentes não vitamínicos que podem influenciar os resultados. O desenvolvimento de procedimentos de extração para amostras alimentares complexas tem se concentrado em técnicas de extração e purificação mais efetivas (BARNA e DWORSCHÁK, 1994; OLLILAINEN *et al.*, 1993).

Os termos “niacina total” e “niacina livre” são definidos pelos métodos de extração empregados na análise. Niacina total geralmente se refere a niacina que é extraível pela autoclavagem da amostra com álcali ou ácido a 1 N; niacina livre é definida como niacina extraível pela autoclavagem com ácido a 0,1 N (BALL, 1994).

Tyler e Genzale (1990) determinaram niacina em diversos alimentos utilizando hidrólise alcalina para preparação das amostras e detecção no ultravioleta. Empregaram um procedimento de limpeza utilizando cartuchos Sep-Pack C18 para efetuar corte cromatográfico e redução dos picos interferentes e, ainda, adicionaram ácido fosfórico ao extrato das amostras para melhorar a resolução dos picos. Durante a análise cromatográfica foi utilizado o contra-íon dodecil sulfato de sódio como componente da fase móvel para melhorar a separação dos componentes presentes.

A niacina geralmente é analisada por eluição isocrática, sendo que alguns estudos fizeram uso da eluição por gradiente (BLANCO *et al.*, 1994; AGOSTINI e GODOY, 1997). As fases móveis mais comuns são compostas por água ou soluções tampão e solventes orgânicos como metanol e acetonitrila (RIZZOLO e POLESELLO, 1992). Para a separação da niacina por CLAE geralmente são empregadas colunas C18 (BALL, 1994). A niacina não é naturalmente fluorescente sendo detectada por detector de absorvância (simples ou de arranjo de diodos). A detecção da niacina por fluorimetria com derivatização pós-coluna (irradiação UV na presença de peróxido de hidrogênio e íons de cobre II) foi proposta por Mawatari *et al.*, (1991), ambos os reagentes foram diretamente adicionados a fase móvel. Este método foi aplicado com sucesso para matrizes alimentares (LAHÉLY *et al.*, 1999).

2.3.4 Vitamina B₆ (piridoxina)

A piridoxina participa de mais funções orgânicas do que qualquer outro nutriente isolado. Afeta tanto a saúde física quanto a saúde mental. São conhecidos seis vitâmeros da vitamina B₆, todos derivados do 3-hidroxi-2-metilpiridina e com a mesma atividade biológica, diferenciando-se pelo grupo substituinte do carbono 4. Quando o substituinte for um álcool, obtém-se a piridoxina ou piridoxol (PN) e seu fosfato correspondente, o piridoxol fosfato (PNP). O piridoxal (PL) e piridoxal fosfato (PLP) apresentam um grupo aldeído ligado ao carbono 4 do anel de piridina, enquanto a piridoxamina (PM) e a piridoxamina fosfato (PMP) tem um grupo amina nesta posição. A estrutura molecular dos principais vitâmeros da vitamina B₆ está apresentada na Figura 8. Estes compostos são absorvidos na forma não fosforilada, principalmente no duodeno. No fígado são facilmente fosforilados com o auxílio da enzima quinase e desfosforilados na presença de fosfatases alcalinas (BALL, 1994, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c; DRISKELL, 1994; HALSTED, 1993; LEKLEM, 1991).

A vitamina B₆ foi isolada pela primeira vez em 1938 por Gyorgy, na sua forma cristalina. As pesquisas seguintes foram conduzidas para a determinação da estrutura química, que foi evidenciada como 2-metil-3-hidróximetil-piridina (HARRIS *et al.*, 1939; STILLER *et al.*, 1939). O termo piridoxina foi inicialmente empregado por Gyorgy e Eckhart (1939), tendo sido usado como sinônimo de vitamina B₆.

O cloridrato de piridoxol, única forma utilizada na fortificação de alimentos, é um pó cristalino branco, inodoro, com sabor salgado e ponto de fusão entre 204 e 206 °C, solúvel em água, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Sua fórmula empírica é C₁₈H₁₁O₃N.HCl, com peso molecular 205,65 gramas. Comercialmente estão disponíveis os sais cloridrato de piridoxina (PN.HCl), cloridrato de piridoxal e dicloridrato de piridoxamina (BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Figura 8. Estrutura molecular dos vitâmeros da vitamina B₆.

PN, PL, e PM são relativamente estáveis ao calor em meio ácido, mas termolábeis em meio alcalino (LEKLEM, 1991). As soluções ácidas de cloridrato de piridoxina podem ser aquecidas por 30 minutos a 120 °C sem apresentar decomposição (MERCK, 1989).

Extratos de levedura, trigo integral, fígado e carne de frango são as fontes mais expressivas da vitamina. Outras fontes importantes são os cereais integrais, castanhas, rins, peixes, batatas e outros vegetais. Ela está presente ainda nos ovos, no leite e em frutas em quantidades bem menores (OTTAWAY, 1993; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

A principal função metabólica da vitamina B₆ é como coenzima atuando em mais de 100 reações. Têm um papel importante no metabolismo das proteínas, hidratos de carbono e lipídeos; é requerida por uma grande variedade de enzimas envolvidas com a interconversão de aminoácidos não essenciais, no metabolismo de aminoácidos presentes em quantidades além das necessárias para a síntese de proteínas, na síntese de aminas que atuam como neurotransmissores (epinefrina, serotonina e outros), na decomposição do glicogênio. A vitamina B₆ também está envolvida na conversão do triptofano para niacina, no metabolismo do ácido fólico, da

vitamina B₁₂, e na síntese e regulação de hormônios (BENDER,1997; BALL,1994; DRISKELL,1984).

A deficiência de piridoxina é rara uma vez que está presente, em quantidades consideráveis em vários alimentos. Os sintomas caracterizam-se por atrofia dos órgãos, redução da taxa de crescimento e deficiência metabólica. Schaumburg *et al.* (1983) constataram sérios problemas neurotóxicos (neuropatia sensorial) relacionados com megadosagens de piridoxina.

A forma glicosilada; apresenta menor aproveitamento pelo organismo e pode interferir negativamente na utilização das outras formas da vitamina B₆. Também nomeada como 5'-O-(β-D-glicopiranosil) piridoxina esta forma da vitamina foi caracterizada pela primeira vez por Yasumoto *et al.* (1997) em farelo de arroz e está presente principalmente em alimentos de origem vegetal, muitas vezes em quantidades bem maiores que as outras formas. Sua determinação pode comprometer o verdadeiro valor da vitamina no alimento (BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003c).

Os métodos descritos na literatura para análise da vitamina B₆ em alimentos são: fluorimetria, cromatografia gasosa, método microbiológico e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os protocolos de extração para a determinação da vitamina B₆ tanto por método microbiológico quanto por método de CLAE são muito variados. Para o primeiro, as vitaminas precisam estar na forma livre para poderem ser utilizadas pelos microorganismos. Alguns autores (BOGNAR, 1985; BRUBACHER, MÜLLER-MULOT e SOUTHGATE, 1985), têm apenas recomendado desfosforilação por meio de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico a 121 °C, o que promove a hidrólise das formas ligadas e glicosiladas. Na extração em produtos de origem vegetal, a amostra pode ser autoclavada por 2 horas a 121 °C em ácido clorídrico 0,44N, enquanto que nos de origem animal, autoclave por 5 horas a 121 °C em ácido clorídrico 0,055N. Outros autores preferem realizar a desfosforilação através do uso da enzima a fosfatase ácida (BOGNAR e OLLILAINEN, 1997; MORRISON & DRISKELL, 1985; REITZER-BERGAENTZLEÂ, MARCHIONI e HASSELMANN, 1993) ou takadiastase (van SCHOONHOVEN *et al.*, 1994). Em alguns casos o tratamento combina takadiastase e beta-glicosidase (BOGNAR e OLLILAINEN, 1997; SERRA e VIDAL-VALVERDE, 1997; van den BERG *et al.*, 1996), que respectivamente atuam na conversão das formas fosforiladas à forma livre e hidrolisam a piridoxina na forma glicosídeo, liberando-a. Em alguns casos, o tratamento enzimático é precedido por hidrólise

ácida (BOGNAR e OLLILAINEN, 1997; van den BERG *et al.*, 1996) que desnatura as proteínas liberando as vitaminas e mantendo as formas glicosiladas intactas. Agentes desproteinizantes como o ácido tricloroacético (TCA), o ácido sulfossalicílico (SSA), o ácido perclórico e o ácido metafosfórico, além dos já citados anteriormente também podem ser empregados (OTTAWAY, 1993; BALL, 1994, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003c).

Um estudo realizado por Ndaw (2000) concluiu que era desnecessário empregar hidrólise ácida para análise das vitaminas do complexo B, visto que a mistura de enzimas utilizadas (α -amilase, papaína e fosfatase ácida) apresentava atividade proteolítica. Muita atenção tem sido dada ao uso desses reagentes, já que a variação de atividade das enzimas de um lote para outro ou de um fornecedor para outro pode comprometer os resultados. Vários autores sugerem a utilização de enzimas de um mesmo lote, fornecedor e cuidados nas condições de incubação (HOLLMAN *et al.*, 1993; HASSELMAN *et al.*, 1989).

Bergaentzlé, Arella, Bour - Guignon e Hasselmann (1995) divulgaram que a hidrólise com ácido sulfúrico sozinho (0,1M H_2SO_4 , autoclave 121 °C, 1 hora), conduzia à uma desfosforilação parcial das formas fosforiladas da vitamina B₆ e que a combinação da hidrólise ácida e tratamento enzimático (fosfatase ou diastase) somente se justificava quando o alimento a ser analisado contivesse uma grande quantidade de amido, assim a hidrólise do polímero eliminaria problemas na filtração dos extratos obtidos.

Na análise por CLAE, diversos trabalhos relatam uma etapa de purificação do extrato para eliminar possíveis interferentes. Colunas de troca iônica (OLDS *et al.*, 1993) ou de fase reversa (cartuchos Sep-Pack C18) (BALL, 1994); remoção dos agentes desproteinizantes com o éter etílico que remove o TCA e precipitação do ácido perclórico com neutralização do extrato (RIZZOLO e POLESELLO, 1992) são alguns dos métodos indicados. Na separação são empregadas colunas de troca iônica (OLDS *et al.*, 1993) e mais freqüentemente as de fase reversa (SCHOONHOVEN *et al.*, 1994; GREGORY e SARTAIN, 1991). As fases móveis são compostas por água ou tampões e modificadores orgânicos da polaridade, como a acetonitrila (BERGAENTZLÉ *et al.*, 1995), o metanol (ALBADÁ-HURTADO *et al.*, 1997), podendo ser acidificadas com ácido acético ou fosfórico (CHASE *et al.*, 1993; MUÑOZ *et al.*, 1994). Freqüentemente é empregada a cromatografia de interação iônica ou íons pareados, compostos alquilsulfonados como o ácido heptanossulfônico

(PIC- B7) (BERGAENTZLÉ *et al.*,1995) e o octanossulfônio (PIC-B8) (ALBADÁ-HURTADO *et al.*, 1997; GREGORY e FELDSTEIN, 1985; SCHOONHOVEN *et al.*, 1994;) são adicionados à fase móvel que tem seu pH ajustado para aumentar a ionização dos solutos ionôgenicos (BALL, 1994).

No método microbiológico, o microorganismo mais empregado é o *Saccharomyces carlsbergensis* (ATCC 9080), que responde às três formas da vitamina B₆, e tem menor resposta à piridoxina. Outros também utilizados são *Neurospora sitophila*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kloeckera apiculata* (OTTAWAY, 1993). O ensaio turbidimétrico ocorre em 650 nm (van den BERG *et al.*, 1996) ou 660 nm (van SCHOONHOVEN *et al.*, 1994)

A análise por CLAE produz resultados ligeiramente maiores quando comparados aos obtidos através do método microbiológico, devido à presença de piridoxamina, pois os microorganismos apresentam menor resposta frente à este vitâmero comparativamente à piridoxina, que é utilizada como padrão nestes ensaios (BALL, 1994).

Os dados relativos a recomendação diária de todas as vitaminas envolvidas neste estudo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos, lactentes e crianças.

Nutriente	Unidade	Adulto	Lactente		Crianças		
			0-6 meses	7-11 meses	1-3 anos (12 a 36 meses)	4-6 anos (37 meses a 6 anos)	7-10 anos
Tiamina	MG	1,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9
Riboflavina	MG	1,3	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
Niacina	MG	16,0	2,0	4,0	6,0	8,0	12,0
Vitamina B ₆	mg	1,3	0,1	0,1	0,5	0,5	1,0

Fonte: BRASIL, 2005.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a estabilidade das vitaminas do complexo B em amostras de pólen apícola, desidratadas e caracterizá-las através das análises de composição centesimal e polínica.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da desidratação sobre o conteúdo de vitaminas do complexo B presentes no pólen apícola;
- Avaliar a estabilidade das vitaminas do complexo B: B₁, B₂, vitâmeros da vitamina B₆ (piridoxol, piridoxal e piridoxamina) e vitâmeros da vitamina PP (ácido nicotínico e nicotinamida), nas amostras de pólen apícola desidratado; no tempo zero, após 4, 8 e 12 meses de estocagem em freezer e à temperatura ambiente (expostas à luz e protegidas da luz), contribuindo assim para o estabelecimento do prazo de validade deste produto;
- Verificar a adequação dos métodos de extração simultânea e de separação de vitaminas do complexo B, para a matriz: pólen apícola;
- Caracterizar o pólen apícola, com base na análise microscópica (polínica); verificando a possível preferência das abelhas por algum dos tipos de pólen;
- Verificar a possível contribuição dos tipos polínicos presentes para conteúdo de cada uma das vitaminas e da composição centesimal das amostras;
- Verificar a adequação das amostras analisadas frente aos parâmetros de qualidade estabelecidos pela Legislação Brasileira, para o pólen apícola;
- Colaborar com dados para a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos a fim de agregar valor a este produto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostragem

Foram adquiridos sete lotes diferentes de amostras comerciais de pólen apícola fresco e desidratado, recém fabricados, diretamente da empresa PRONATU Lab. Produtos Naturais Ltda. Entrepasto de Mel e Cera de Abelha (Pariquera-Açu, São Paulo). As amostras foram recebidas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo após o processamento e acondicionamento necessário à sua comercialização.

As amostras foram coletadas do apiário Trianoski instalado em zona de Mata Atlântica, no Vale do Ribeira – Estado de São Paulo, sob cuidados do apicultor Mauro Trianoski. A coleta ocorreu no período de 08 de outubro a 30 de novembro de 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 9) e de cobertura em uma colméia. Do apiário até a empresa, o pólen ainda úmido foi transportado em sacos plásticos transparentes de polietileno virgem. Durante o projeto foi realizada em 05 de março de 2007 uma visita ao local 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.

A empresa (PRONATU) mantém parceria com os pequenos produtores apícolas da região, através da qual fornece os equipamentos, e cursos necessários ao manejo apícola e realiza a compra do produto (pólen apícola) para a comercialização.

(A)

(B)

Figura 9. Colméia de abelhas *Apis mellifera* com coletor de alvado (A) e coleta de pólen apícola (B).

Conforme instrução, o fornecedor homogeneizava o lote recolhido e retirava cerca de 200 gramas *in natura*, que eram mantidos em freezer, e processava o restante para secagem em estufa da marca Ballardin® (Figura 10) ajustada a temperatura de 45 °C durante aproximadamente seis horas. O pólen apícola processado era acondicionado em embalagens plásticas transparentes de 45g ($\pm$ 35 embalagens por lote), rotuladas de acordo com o procedimento comercial da empresa. Para o experimento, os lotes foram codificados por letras do alfabeto (G, H, I, J, K, L e M).

Figura 10. Estufa (Ballardin®) com amostra de pólen.

4.1.2 Preparo e armazenamento das amostras

Os lotes de pólen apícola, frescos recebidos foram imediatamente armazenados em freezer (-18 °C) até o momento das análises. Já os lotes de pólen desidratado foram divididos conforme segue abaixo:

- a) 04 embalagens foram armazenadas em freezer até o momento da análise, que foram realizadas o mais rápido possível após o recebimento, para compor o Tempo 0;
- b) 08 embalagens foram armazenadas em freezer, para constituírem o grupo de amostras armazenado em freezer (-18 °C) pelo período de um ano; submetido às análises em intervalos de quatro meses após a aquisição (Tempos 1, 2 e 3);
- c) 08 embalagens foram armazenadas no laboratório em prateleiras à temperatura ambiente (média 25 °C) para constituírem o grupo de amostras armazenado em temperatura ambiente exposto à luz (lâmpada F40W T12) pelo período de um ano, submetido às análises em intervalos de quatro meses após a aquisição (Tempos 1, 2 e 3);
- d) 08 embalagens foram armazenadas no laboratório em prateleiras a temperatura ambiente (média 25 °C), protegidas da exposição à luz, por papel alumínio, para constituírem o grupo de amostras armazenado em temperatura ambiente protegido da luz no período de um ano, submetido às análises em intervalos de quatro meses após a aquisição (Tempos 1, 2 e 3);

Todos os lotes de pólen apícola desidratado foram mantidos nas embalagens originais do fabricante (pote plástico transparente com rótulo), conforme apresenta a Figura 11.

(A)

(B)

Figura 11. Armazenamento das amostras de pólen apícola desidratado em temperatura ambiente (A) e em freezer (B).

4.1.3 Padrões e reagentes

Foram utilizados os seguintes padrões e reagentes:

- Acetato de sódio - Grau PA - Marca Merck;
- Acetonitrila - Grau HPLC - Marca Merck;
- Ácido acético glacial - Grau PA - Marca Synth;
- Ácido Clorídrico 37% - Grau PA - Marca Synth;
- Ácido orto-fosfórico 85% - Grau PA - Marca Synth;
- Diastase Fungica- Grau Bioquímico - Marca Merck;
- Dihidrogenofosfato de potássio - Grau PA Marca Synth;
- Dimetilformamida - Grau Espectrofotometria - Marca Merck;
- Ferricianeto de potássio - Grau PA - Marca Synth;
- Hidrogenofosfato de di-potássio - Grau PA - Marca Synth;
- Hidróxido de amônio - Grau PA - Marca Synth;
- Hidróxido de sódio em lentilha - Grau PA - Marca Synth;
- Padrão de Niacina - Marca Merck – Pureza > 99% - grau bioquímico;
- Padrão de Niacinamida - Marca Merck – Pureza > 99% - grau bioquímico;
- Padrão de vitamina B₁ - Cloridrato de tiamina - Thiamine hydrochloride, Marca Merck – Pureza > 99% - Grau bioquímico;
- Padrão de vitamina B₂ - Riboflavina - Riboflavin, Marca Merck – Pureza > 99% - Grau bioquímico;
- Padrão de vitamina B₆ na forma álcool - Cloridrato de piridoxol - Pyridoxine hydrochloride, Marca Merck – Pureza > 99% - Grau bioquímico;
- Padrão de vitamina B₆ na forma aldeído - Cloridrato de piridoxal - Pyridoxal hydrochloride, Marca Merck – Pureza > 99,5% - Grau bioquímico;
- Padrão de vitamina B₆ na forma amina - Cloridrato de piridoxamina - Pyridoxamin hydrochloride, Marca Merck – Pureza > 99% - Grau bioquímico;
- Peróxido de hidrogênio 30% - Grau PA - Marca Vetec;
- Sal ácido heptanossulfônico de sódio (PIC-7) - Grau PA - Marca Vetec;
- Sulfato de cobre II pentahidratado - Grau PA - Marca Synth.

4.1.4 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos específicos:

- Agitador magnético – Marca Quimis;
- Balança analítica – Marca Mettler;
- Balança analítica – Marca Micronal (B160) acoplada com secador infravermelho Mettler Toledo (LP16);
- Phmetro – Marca Micronal (B 474);
- Banho - Maria – Marca Fisatom;
- Banho - Maria para incubação– Marca Julabo;
- Sistema de Água Ultrapura Milli-Q – Marca Millipore;
- Bomba isocrática para sistema HPLC Marca Shimadzu (LC-20AT);
- Amostrador automático para sistema HPLC (Autosampler SIL-20A) Marca Shimadzu;
- Detector de fluorescência para sistema HPLC (RF-10AXL) Marca Shimadzu;
- SoftwareLC-Solution para sistema HPLC Marca Shimadzu;
- Sistema CBM-20A (SCL-10Avp) Marca Shimadzu;
- Lâmpada de luz negra TLD 18W/08 Marca Philips;
- Lâmpada fluorescente luz do dia F40W T12 Marca Silvânia.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da umidade:

Para se determinar a umidade das amostras foi utilizado o método gravimétrico através da balança eletrônica de precisão Micronal (B160), adaptada com secador infravermelho Mettler Toledo (LP16), conforme indicado por Serra-Bonvehi e Casa-Nova (1987), Cornejo (1994), Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian (2002), Oliveira (2006) e Melo (2008).

As amostras frescas e desidratadas foram previamente maceradas em almofariz e trituradas em moinho analítico, respectivamente; cerca de um grama foi submetido à temperatura de 85 °C na balança de infravermelho, conforme descrito

por Cornejo (1994), Oliveira (2006) e Melo (2008). Foram realizadas análises em triplicata de cada amostra.

Análises realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

4.2.2 Extração simultânea das vitaminas B₁, B₂, vitâmeros da vitamina B₆ e niacina

A extração das vitaminas foi realizada conforme descrito por Moreschi (2006) e Presoto e Almeida-Muradian (2008) em meio ácido utilizando tratamento térmico em banho-maria, com tempo e temperatura definidos, seguida de tratamento enzimático, conforme os seguintes passos:

- Homogeneizar a amostra e triturar em moinho analítico;
- Tomada de ensaio em torno de 5g de amostra;
- Adição de 50 mL de ácido clorídrico 0,1M;
- Extração em banho-maria sob fervura (98 °C) por 30 minutos, com agitação ocasional;
- Resfriar a temperatura ambiente;
- Correção do pH para 4,6 com acetato de sódio 2,5M;
- Adição de enzima diastase e reação em banho 42°C por 2 horas;
- Resfriar a temperatura ambiente;
- Transferência para balão volumétrico de 100 mL com água deionizada;
- Filtragem sobre papel de filtro;
- Filtragem sobre membrana 0,45 μ m e injeção no cromatógrafo.

Análises de cada lote foram realizadas em triplicata e os resultados estão expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

4.2.3 Condições cromatográficas para a análise das vitaminas do complexo B em pólen apícola

As condições cromatográficas variaram para cada vitamina, sendo as vitaminas B₁ e B₂ analisadas nas mesmas condições, enquanto as vitaminas B₆ e PP são quantificadas em condições cromatográficas diferentes.

As vitaminas B₂ e B₆ são detectadas diretamente por fluorescência, enquanto as vitaminas B₁ e PP sofrem reação pré e pós-coluna respectivamente para serem detectadas também por fluorescência.

4.2.3.1 Determinação da tiamina (vitamina B₁), com reação pré-coluna

O método de análise cromatográfico foi baseado no procedimento descrito por Ollilainen *et al.* (1993) e Presoto e Almeida-Muradian (2008). As modificações no método quanto à reação de conversão da tiamina em tiocromo realizada pelo modo pós-coluna para o modo pré-coluna foram na composição da fase móvel e nos valores dos comprimentos de onda.

Condições cromatográficas para a análise da vitamina B₁ (reação pré-coluna):

- Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 e dimetilformamida;
- Fluxo: 1 mL/min;
- Volume de injeção : 20 µL;
- Coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 µm / 250x 4.6 mm com pré-coluna 5 µm / 10x4.6mm Shim-pac VP-ODS;
- Detecção por fluorescência: Ex 368 nm; Em 440 nm.

Preparo da fase móvel para a determinação da vitamina B₁ por detecção com reação pré-coluna:

Em um béquer de 1000 mL, foram pesados 2,28 g de hidrogenofosfato de di-potássio trihidratado (ou 1,74 g de hidrogenofosfato de di-potássio anidro) e dissolvidos em aproximadamente 800 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 7,2 com solução de ácido clorídrico 1M utilizando-se um pHmetro. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água ultrapura. A solução foi filtrada em membrana de ésteres de celulose de 0,45 µm, antes da mistura de dimetilformamida na proporção 85% de tampão fosfato pH 7,2: 15% de dimetilformamida.

Conversão da tiamina em tiocromo através de reação pré-coluna:

Para a reação de conversão da tiamina em tiocromo, foram adicionados aproximadamente, 2 mL de água deionizada e 3 mL da solução de ferricianeto de potássio em meio básico a cada 1 mL de solução padrão diluída ou do extrato das amostras, em balões volumétricos âmbar de 10 mL. O volume total foi agitado em agitador de tubos e colocado em repouso por 2 min para que ocorresse a reação. Após este tempo, foram adicionados 450 µL de ácido ortofosfórico 85%. A solução foi então resfriada e o volume final foi completado com água deionizada. Estas soluções foram injetadas no cromatógrafo imediatamente após o preparo.

4.2.3.2 Determinação da riboflavina (vitamina B₂)

O método de análise foi baseado no procedimento descrito por Augustin (1984) e Presoto e Almeida-Muradian (2008), com modificação na composição da fase móvel.

Condições cromatográficas para a análise da vitamina B₂:

- Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 e dimetilformamida;
- Volume de injeção : 20 µL;
- Coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 µm / 250x 4.6 mm com pré-coluna 5µm / 10x4.6mm Shim-pac VP-ODS;
- Detecção por fluorescência: Ex 450 nm; Em 530 nm.

Preparo da fase móvel para a determinação da vitamina B₂:

A mesma fase da determinação da vitamina B₁ por detecção com reação pré-coluna foi utilizada para a determinação da vitamina B₂. Porém, tais vitaminas foram analisadas em corridas cromatográficas separadas devido a ocorrência de degradação da vitamina B₂ durante a reação pré-coluna que converte a vitamina B₁ em composto fluorescente. O preparo da fase móvel está descrito no item 4.2.3.1. No momento do uso, a fase móvel foi desgaseificada sob vácuo em ultrassom por, aproximadamente 20 minutos, antes da utilização no cromatógrafo.

4.2.3.3 Determinação da vitamina PP através dos vitâmeros niacina e niacinamida

O procedimento de análise foi baseado no descrito por Lahély *et al.* (1999) e Presoto e Almeida-Muradian (2008).

A vitamina PP foi detectada por fluorescência após reação sob radiação ultravioleta (UV). O sistema de reação pós-coluna foi montado conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12. Sistema cromatográfico utilizado para determinação de vitamina PP.

Condições cromatográficas para a análise da vitamina PP:

- Fase móvel: tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio e sulfato de cobre;
- Fluxo: 1,5 mL/min;
- Coluna: C₁₈ de fase reversa Luna C₁₈, esférica 5 µm / 250x 4.6 mm com pré-coluna 5 µm / 10x10mm Marca Phenomenex;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Reator composto por 12 metros de tubulação de tetrafluoretileno (TFE), 0,5 mm de diâmetro interno, enrolada em uma lâmpada de luz negra (TLD 18W/08) que emite radiação entre 300 a 400 nm, tornando os compostos fluorescentes possibilitando sua detecção pelo detector de fluorescência;
- Detecção por fluorescência: Ex 322nm; Em 380 nm.

Preparo da fase móvel para análise de vitamina PP:

Em balão volumétrico de 1000 mL, foram pesados 9,54g de dihidrogenofosfato de potássio e dissolvidos com, aproximadamente, 500 mL de água ultrapura. Foram adicionados, cuidadosamente, 7,6 mL de peróxido de hidrogênio 30% e 1,0 mL da solução de sulfato de cobre 5 mM. O volume final foi completado com água ultrapura. A fase móvel foi então homogeneizada, filtrada em membrana de ésteres de celulose de 0,45 µm, sob vácuo. Esta solução permanece estável por 24h quando acondicionada à temperatura ambiente.

Os vitâmeros da vitamina PP foram convertidos em niacina, para a expressão dos resultados.

4.2.3.4 Determinação da vitamina B₆ através dos vitâmeros piridoxol, piridoxal e piridoxamina

O método de análise foi baseado no procedimento descrito por Moreschi (2006), Presoto e Almeida-Muradian (2008) e Kall (2003).

Condições cromatográficas para a análise da vitamina B₆ (piridoxol, piridoxal e piridoxamina):

- Fase móvel: tampão fosfato pH 2,5 com par iônico e acetonitrila;
- Fluxo: 0,6 mL/min;
- Coluna: C₁₈ de fase reversa Superspher 100 RP-18 endcapped 5 µm / 250 x 4.0 mm com pré-coluna 5µm / 4x4 mm Lichrospher 100 RP-18;
- Volume de injeção : 20 µL;
- Detecção por fluorescência: Ex 296nm; Em 390 nm.

4.2.4 Análise polínica (microscópica)

A análise polínica foi realizada em trabalho colaborativo com especialista da área (Profa. Dra. Ortrud Monika Barth, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, e Instituto de Botânica, UFRJ, Rio de Janeiro). Rio de Janeiro).

4.2.4.1 Preparo da amostra de pólen apícola

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 glicerizada (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.

4.2.4.2 Preparo das lâminas para microscopia

O sedimento obtido no fundo do tubo de centrífuga foi misturado com auxílio de um estilete. Na sua ponta foi espetado um bloquinho de cerca de 0,5mm³ 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°C), misturando a gelatina glicerizada com o sedimento recolhido, com auxílio do estilete. A lâmina foi coberta com uma lamínula de 22x22mm. Foram adicionados lateralmente à lamínula raspas de parafina, derretidas para vedar a área ocupada

pela gelatina glicerinada. 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 mais de 300 grãos de pólen para o cálculo das porcentagens de cada um dos tipos polínicos na amostra.

4.2.5 Validação dos métodos cromatográficos

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). Tal habilidade pode ser representada pela equação de reta:

$$y = ax + b$$

onde: y = resposta medida;

x = concentração do analito;

a = indica a inclinação da reta;

b = inteseccção.

Para determinar a linearidade do método foram medidos 6 níveis de concentrações diferentes de padrão em triplicata. Construiu-se o gráfico de concentração padrão x resposta, calculou-se a regressão linear utilizando todos os dados obtidos e o resultado foi avaliado. Foi também construído o gráfico de concentração padrão x resposta/concentração e verificada dependência entre eles.

O parâmetro usado para avaliar a correlação da linearidade dos valores foi o coeficiente de correlação (r) que tem como valor ideal 1, indicando uma relação perfeita. Assim a linearidade da curva de calibração e o intervalo de trabalho do método, foram determinados pelo coeficiente de correlação da reta obtida, também nomeado índice de correlação de Pearson (RIEDER *et al.*, 2000), considerando que:

$r = 1$, correlação perfeita;
 $0,91 < r < 0,99$, correlação fortíssima;
 $0,61 < r < 0,91$, correlação forte;
 $0,31 < r < 0,60$, correlação média;
 $0,01 < r < 0,30$, correlação fraca;
 $r = \text{zero}$, correlação nula.

Faixa linear de trabalho: A faixa linear de trabalho de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito em que é possível demonstrar a determinação com exatidão, precisão e linearidade exigidas, sob as condições específicas para o ensaio (INMETRO, 2003). A faixa linear de trabalho foi definida através do estudo de linearidade.

Sensibilidade: A sensibilidade mostra a variação da resposta com a concentração do analito e depende, essencialmente, da técnica de detecção utilizada; é expressa como a inclinação da reta de regressão e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A inclinação da curva de calibração construída no estudo de linearidade é o valor de sensibilidade do método. Podendo ser utilizado como parâmetro de controle de desempenho do método ao longo do tempo.

Limite de detecção e quantificação: O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo método (RIBANI *et al.*, 2004). O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada, com exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI *et al.*, 2004). Foram medidas a amplitude da linha de base e a altura do pico do padrão no mesmo cromatograma. Calculou-se então o limite de detecção como 3 vezes a medida da linha de base e o limite de quantificação como 10 vezes essa medida. Os valores obtidos foram comparados com a altura do pico do padrão e calculados em concentração de padrão que foi convertido em concentração do analito na amostra, considerando a sua massa e diluições realizadas.

Exatidão (Teste de recuperação): A exatidão é o parâmetro da validação que expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor real do analito (LANÇAS, 2004). Foram efetuadas 6 determinações de padrão adicionado em dois níveis de concentração (30 e 70 % da concentração esperada na matriz). A amostra foi submetida ao mesmo processo de extração para determinação da vitamina. Calculou-se recuperação média e seu desvio padrão.

Precisão (teste de repetitividade): O parâmetro de precisão expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). É uma medida da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes em condições definidas e demonstra o quão dispersa uma medida está em relação à média. O limite de repetitividade, calculado a partir do desvio padrão de, no mínimo 6 resultados obtidos da mesma amostra em condições de repetitividade com 95% de confiança (com o desvio padrão da repetibilidade (s_r), temos o limite de repetitividade: $r = 2,8 \cdot s_r$) (INMETRO, 2003). Foram realizadas 6 determinações de amostra em dois níveis de concentração (30 e 70 % da concentração esperada na matriz). Calculou-se o desvio padrão dos resultados obtidos e então o limite de repetitividade para cada nível de concentração.

4.2.6 Análise da composição centesimal

Todas as análises que compuseram a composição centesimal foram realizadas em triplicata para cada lote e os resultados estão expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.

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; a água é removida como vapor da substância congelada. O processo tem como objetivo preservar a qualidade do produto além de minimizar reações de degradação que

possam ocorrer 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 converção do nitrogênio total em proteínas (AOAC, 1995; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

Determinação do extrato etéreo - lipídios: 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).

4.2.7 Análise estatística

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) a existência de associação entre as variáveis: tipo polínico e teor das vitaminas (B₁, B₂, PP e B₆) ou composição centesimal (cinzas, lipídeos, proteínas e umidade) foi analisada utilizando-se a correlação de Pearson e adotando-se o coeficiente de correlação (r) como parâmetro para avaliar a natureza (diretamente ou inversamente proporcionais) e a intensidade dessa correlações (0 a 1, sendo 1 indicativo de correlação máxima);
- b) as comparações dos teores das vitaminas (B₁, B₂, PP e B₆) com relação às formas de processamento (fresco e seco), foram realizadas pelo teste *t* de Student para amostras independentes;

- c) as comparações dos teores das vitaminas (B_1 , B_2 , PP e B_6) com relação a cada uma das variáveis em estudo devidamente fixadas: tempo (0, 4, 8 e 12 meses) e condições de armazenamento (luz, escuro e freezer), foram realizadas pela Análise de Variância Unidimensional (One-way ANOVA) seguida do teste de Tukey;
- d) a análise da existência de uma relação que pudesse ser matematicamente descrita entre os teores de vitaminas B_1 , B_2 , PP e B_6 e os tempos de armazenamento (0, 4, 8 e 12 meses) foi realizada pelo uso da Regressão linear, utilizando-se o coeficiente de determinação (r^2) para avaliar a porcentagem de explicabilidade de uma variável com relação à outra (0 a 1, sendo que 1 representa 100% de explicabilidade).

Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, testes estatísticos não-paramétricos foram adotados. Para os testes de correlação, foi adotada a correlação de Spearman, para a comparação de dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para mais de dois grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

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% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatogramas obtidos nas análises das vitaminas em amostras de pólen apícola desidratado

As Figuras 13 a 16 apresentam os cromatogramas característicos das quatro vitaminas estudadas, obtidos em padrões e em amostras de pólen apícola desidratado.

Figura 13. Cromatogramas característicos da vitamina B₁: Padrão (A) e amostra de pólen apícola desidratado (B).

(A)

(B)

Figura 14. Cromatogramas característicos da vitamina B₂: Padrão (A) e amostra de pólen apícola desidratado (B).

(A)

(B)

Figura 15. Cromatogramas característicos dos vitâmeros da vitamina PP: Padrão (A) e amostra de pólen apícola desidratado (B).

(A)

(B)

- a) Piridoxamina;
- b) Piridoxal;
- c) Piridoxol:

Figura 16. Cromatogramas característicos dos vitâmeros da vitamina B₆: Padrão (A) e amostra de pólen apícola desidratado (B).

5.2 Validação dos métodos de análise para as vitaminas

Linearidade

A linearidade das vitaminas PP e B₆ foi avaliada para cada um dos seus vitâmeros. Os coeficientes de correlação (r) obtidos para todos os casos demonstram que os métodos possuem correlação fortíssima – $0,91 < r^2 < 0,99$ – (RIEDER *et. al.*, 2000).

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados médios encontrados para a linearidade das vitaminas e seus vitâmeros.

Tabela 3. Dados obtidos no estudo de linearidade das vitaminas B₁ e B₂.

Vitamina B ₁			Vitamina B ₂		
Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área
1,42	38.210	680	2,67	56.939	1.231
2,84	82.841	1.002	6,68	140.181	1.962
5,68	165.139	614	13,35	296.175	53
11,36	319.178	4.202	26,70	594.273	3.043
28,40	800.288	7.098	53,40	1.201.207	44.731
56,80	1.603.095	4.919	133,50	3.016.403	6.944
Inclinação da reta: 28.192,36 Intersecção da reta: 1.044,12 R²: 0,999981			Inclinação da reta: 22.647,89 Intersecção da reta: 7.734,37 R²: 0,999993		

Tabela 4. Dados obtidos no estudo de linearidade dos vitâmeros da vitamina PP (niacina e niacinamida).

Vitamina PP					
Niacina			Niacinamida		
Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área
5,54	27.017	695	5,20	25.267	2.086
13,85	77.219	8.914	13,00	108.799	4.595
27,70	166.706	12.778	26,00	218.139	6.747
55,40	336.723	5.845	52,00	475.404	8.867
277,00	1.598.366	67.449	260,00	2.368.934	46.141
554,00	2.911.044	147.479	520,00	4.459.241	109.148
Inclinação da reta: 5.294,8 Intersecção da reta: 29.070 R²: 0,997800			Inclinação da reta: 8.653,93 Intersecção da reta: 12.201,6 R²: 0,999000		

Tabela 5. Dados obtidos no estudo de linearidade dos vitâmeros da (piridoxol, piridoxal e piridoxamina).

Vitamina B6								
Piridoxol			Piridoxal			Piridoxamina		
Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área	Massa Inj. (ng)	Média U.Área (n=3)	Desvio Padrão U.Área
2,45	188.221	27.637	2,69	182.988	9.669	2,65	202.519	4.721
4,90	377.563	5.375	5,38	383.333	4.149	5,30	486.923	1.715
9,80	775.861	10.131	10,76	777.559	2.166	10,60	1.041.909	7.052
19,60	1.549.039	2.638	21,52	1.555.785	3.946	21,00	2.129.241	7.686
49,00	3.879.817	12.540	53,80	3.934.146	5.010	53,00	5.424.457	12.880
98,00	7.718.335	9.661	107,60	7.743.340	10.486	106,00	11.144.587	93.176
Inclinação da reta: 78.843,41 Intersecção da reta: 226,6 R²: 0,999989			Inclinação da reta: 72.149,19 Intersecção da reta: 3.508,52 R²: 0,999925			Inclinação da reta: 105.653,84 Intersecção da reta: 94.844,03 R²: 0,999896		

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam as retas de regressão e a variação da razão resposta/massa das vitaminas.

Figura 17. Gráficos de Linearidade e variação de resposta com a massa injetada das vitaminas B₁ e B₂.

Figura 18. Gráficos de Linearidade e variação de resposta com a massa injetada dos vitâmeros da vitamina PP.

Figura 19. Gráficos de Linearidade e variação de resposta com a massa injetada dos vitâmeros da vitamina B₆.

Faixa linear de trabalho

Através do estudo de linearidade dos métodos foi possível definir a faixa linear de trabalho para cada um dos compostos.

A razão resposta/massa injetada não é independente da concentração em toda a faixa estudada. Assim, a faixa linear de trabalho é limitada à região de concentração onde permanece inalterada. As faixas de trabalho que foram assumidas como sendo adequadas para cada composto estudado são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Faixa de trabalho para as vitaminas e vitâmeros.

Vitamina	Faixa linear de trabalho (ng injetado)
B ₁ – Tiamina	2-50
B ₂ – Riboflavina	2-100
B ₆ – Piridoxol	2-100
B ₆ – Piridoxal	2-100
B ₆ – Piridoxamina	5-100
PP – Niacina	5-550
PP – Niacinamida	10-500

Sensibilidade

Através do estudo de linearidade dos métodos obteve-se o valor da sensibilidade, expresso pela inclinação da curva de calibração. Valores apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados obtidos no estudo de sensibilidade dos vitâmeros.

Vitamina	Sensibilidade (U. Área/ng injetado)
B ₁ - Tiamina	28.192,36
B ₂ - Riboflavina	22.647,89
B ₆ - Piridoxol	78.843,41
B ₆ - Piridoxal	72.149,19
B ₆ - Piridoxamina	105.653,84
PP - Niacina	5.294,80
PP - Niacinamida	8.653,93

Limite de detecção e quantificação

Os cálculos dos limites de detecção e de quantificação foram realizados através da relação sinal ruído medindo-se a linha de base e o pico do padrão diluído no mesmo cromatograma.

Os resultados para os limites de detecção e quantificação para as vitaminas estudadas são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Limite de detecção e quantificação dos métodos para determinação das vitaminas.

Vitamina	Limite de Detecção (mg/100g)	Limite de Quantificação (mg/100g)
B ₁ - Tiamina	0,02	0,06
B ₂ - Riboflavina	0,04	0,12
B ₆ - Piridoxol	0,02	0,07
B ₆ - Piridoxal	0,01	0,04
B ₆ - Piridoxamina	0,009	0,03
PP - Niacina	0,07	0,24
PP - Niacinamida	0,66	2,22

Exatidão (Teste de recuperação)

A exatidão dos métodos foi obtida através da recuperação de padrão adicionado a amostra em dois níveis de concentração. A literatura descreve que na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações na faixa de 70% a 120% são aceitas (LANÇAS, 2004).

A média dos resultados encontra-se nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9. Dados da recuperação de padrão em amostra de pólen apícola para as vitaminas B₁ e B₂.

Dados de Recuperação (%)				
Nível	Vitamina B ₁		Vitamina B ₂	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	95	1,36	91	3,29
2	83	0,96	96	3,84

Tabela 10. Dados da recuperação de padrão em amostra de pólen apícola para os vitâmeros da Vitamina PP.

Dados de Recuperação (%)				
Vitamina PP				
Nível	Niacina		Niacinamida	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	110	5,50	98	5,98
2	98	6,51	106	3,68

Tabela 11. Dados da recuperação de padrão em amostra de pólen apícola para os vitâmeros da Vitamina B₆.

Dados de Recuperação (%)						
Vitamina B ₆						
Nível	Piridoxol		Piridoxal		Piridoxal	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	96	4,39	97	0,17	92	2,75
2	97	1,38	97	0,29	91	0,15

Precisão (teste de repetitividade)

O desvio padrão e o limite de repetitividade (r) encontrados para as vitaminas nos dois níveis de concentração estudados encontram-se nas Tabelas 12, 13 e 14.

Tabela 12. Dados encontrados no estudo da precisão dos métodos para as vitaminas B₁ e B₂.

Nível	Vitamina B ₁ (mg/100g)		Vitamina B ₂ (mg/100g)	
	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r
1	0,01	0,028	0,02	0,056
	Valor Médio 1,83 mg/100g		Valor Médio 2,03 mg/100g	
2	0,01	0,028	0,13	0,36
	Valor Médio 2,14 mg/100g		Valor Médio 2,49 mg/100g	

Tabela 13. Dados encontrados no estudo da precisão dos métodos para os vitâmeros da vitamina PP.

Nível	Niacina (mg/100g)		Niacinamida (mg/100g)	
	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r
1	0,18	0,5	0,14	0,4
	Valor Médio 2,85 mg/100g		Valor Médio 5,73 mg/100g	
2	0,36	1	0,1	0,28
	Valor Médio 3,84 mg/100g		Valor Médio 6,52 mg/100g	

Tabela 14. Dados encontrados no estudo da precisão dos métodos para os vitâmeros da vitamina B₆.

Vitamina B ₆						
Nível	Piridoxol (mg/100g)		Piridoxal (mg/100g)		Piridoxamina (mg/100g)	
	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r	Desvio Padrão	r
1	0,01	0,028	0,0004	0,00112	0,01	0,028
	Valor Médio 0,61 mg/100g		Valor Médio 0,66 mg/100g		Valor Médio 0,76 mg/100g	
2	0,03	0,084	0,002	0,0056	0,0003	0,00084
	Valor Médio 1,48 mg/100g		Valor Médio 1,62 mg/100g		Valor Médio 1,56 mg/100g	

5.3 Análise do pólen apícola *in natura* e desidratado

Os resultados do teor de umidade das amostras de pólen apícola antes e depois do processo de desidratação estão expressos na Tabela 15.

Tabela 15. Umidade das amostras de pólen apícola *in natura* e desidratado.

Lotes	Umidade (%)	
	<i>In natura</i>	Desidratado
G	20,48 ± 0,09	3,69 ± 0,07
H	15,70 ± 0,21	3,78 ± 0,18
I	18,84 ± 0,47	3,62 ± 0,08
J	17,12 ± 0,17	3,65 ± 0,08
K	16,50 ± 0,11	3,27 ± 0,04
L	18,89 ± 0,09	3,37 ± 0,11
M	20,48 ± 0,09	3,69 ± 0,07
Média	18,29 ± 1,89	3,58 ± 0,19

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão das 7 análises. As comparações entre as duas formas de processamento foram realizadas pelo teste de *t* Student ou pelo seu equivalente não-paramétrico Mann-Whitney, quando apropriado.

Com relação à umidade, os resultados das amostras frescas e secas estão de acordo com a legislação brasileira que estabelece o máximo de 30% para o pólen fresco e máximo de 4% para o pólen apícola desidratado. 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, facilmente afetado pelas condições ambientais. Nas análises realizadas por Melo (2008) em amostras coletadas em Pariquera-Açu, entre os meses de fevereiro e abril de 2007, os valores obtidos encontraram-se entre 13,01 e 19,39% para as amostras frescas, já para as amostras desidratadas estiveram

entre 3,62 e 5,74%. 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. Neste trabalho foi utilizado o mesmo método de análise de umidade (por radiação infravermelha).

Nos sete lotes de amostras de pólen apícola analisados, foram identificadas todas as vitaminas do complexo B propostas neste trabalho - a vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), os três vitâmeros da vitamina B₆ (piridoxol, piridoxal e piridoxamina) e os dois vitâmeros da vitamina PP (ácido nicotínico e nicotinamida). Os resultados dessas vitaminas estão expressos nas Tabelas 16, 17 e 18. Para excluir o efeito da quantidade de água (umidade) das amostras na quantificação das vitaminas, os valores estimados foram expressos em base seca (por 100 gramas de matéria seca).

Tabela 16. Concentrações das vitaminas B₁ e B₂ nas amostras de pólen apícola *in natura* e desidratado.

Lotes	Vitamina B ₁ (mg/100g)		Vitamina B ₂ (mg/100g)	
	<i>In natura</i>	Desidratado	<i>In natura</i>	Desidratado
G	1,09 ± 0,02	1,01 ± 0,01	2,41 ± 0,22	2,49 ± 0,03
H	0,70 ± 0,02	0,68 ± 0,03	2,09 ± 0,07	1,92 ± 0,03
I	0,60 ± 0,04	0,64 ± 0,01	2,23 ± 0,07	2,56 ± 0,05
J	0,72 ± 0,05	0,74 ± 0,06	2,19 ± 0,09	2,05 ± 0,04
K	0,60 ± 0,05	0,65 ± 0,01	1,73 ± 0,04	1,77 ± 0,06
L	0,59 ± 0,05	0,66 ± 0,01	1,74 ± 0,03	1,79 ± 0,02
M	0,77 ± 0,03	0,80 ± 0,03	1,96 ± 0,02	2,03 ± 0,05
Média	0,72 ± 0,18	0,74 ± 0,13	2,05 ± 0,25	2,09 ± 0,32
Min	0.59	0.64	1.73	1.77
Máx	1.0	1.01	2.23	2.56

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão das 7 análises. As comparações entre as duas formas de processamento foram realizadas pelo teste de *t* Student ou pelo seu equivalente não-paramétrico Mann-Whitney, quando apropriado.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 16 foram observadas concentrações de vitamina B₁ variando entre 0,59 e 1,09 mg/100g nas amostras frescas e entre 0,64 e 1,01mg/100g nas amostras desidratadas. Para a vitamina B₂ as concentrações encontram-se entre 1,73 e 2,23mg/100g nas amostras frescas e entre 1,77 e 2,56mg/100g nas amostras desidratadas.

De acordo com a Portaria nº 31, 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 (2005), o consumo de vitamina B₁ deve ser de 1,2 mg/dia para adultos e 15% deste valor consiste em 0,18 mg de vitamina B₁ para adultos. Já para vitamina B₂ a IDR é de 1,3 mg/dia para adultos e 15% deste valor equivalem à ingestão de 0,20 de vitamina B₂ na porção.

Como a porção de consumo diária recomendada para o pólen apícola desidratado é de até 25 g; verificamos que três dos lotes analisados (G, J e M) puderam ser considerados como fonte para a vitamina B₁, fornecendo no mínimo 15% da Ingestão Diária Recomendada (IDR). Já para a vitamina B₂ todos os lotes foram fonte, por apresentarem quantidades superiores a 32% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) e o valor médio das concentrações fornece cerca de 40% da Ingestão Diária Recomendada (IDR).

A Tabela 17 apresenta os dados de análises das concentrações da vitamina PP e dos seus vitâmeros, nas amostras de pólen apícola *in natura* e desidratado e sua variação após o processamento.

Tabela 17. Concentrações da vitamina PP e dos seus vitâmeros, nas amostras de pólen apícola *in natura* e desidratado e sua variação após o processamento.

Lotes	Vitamina PP (mg/100g)					
	<i>In natura</i>			Desidratado		
	Ácido Nicotínico	Nicotinamida	Niacina	Ácido Nicotínico	Nicotinamida	Niacina
G	4,44 ± 0,14	7,98 ± 1,52	15,34 ± 1,69	2,93 ± 0,19	10,42 ± 0,44	13,38 ± 0,63
H	4,41 ± 0,07	8,72 ± 1,81	13,13 ± 1,74	3,22 ± 0,17	10,74 ± 0,43	13,96 ± 0,26
I	2,94 ± 0,02	10,59 ± 0,40	13,54 ± 0,43	3,57 ± 0,23	9,83 ± 0,21	13,40 ± 0,44
J	4,61 ± 0,04	8,80 ± 1,86	13,40 ± 1,90	3,72 ± 0,13	10,72 ± 1,35	14,43± 1,21
K	3,04 ± 0,02	8,57 ± 0,3	11,61 ± 0,29	3,36± 0,67	10,58 ± 0,05	13,94± 0,72
L	3,74 ± 0,10	2,69 ± 0,25	6,43 ± 0,15	2,03± 0,09	5,24 ± 0,04	7,27 ± 0,15
M	2,42 ± 0,43	4,37 ± 0,22	6,79 ± 0,66	2,19± 0,04	6,72 ± 0,37	8,9 ± 0,41
Média			11,46± 3,49			12,18± 2,86
Min			6,43			7,27
Máx			15,34			14,43

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão das 7 análises. As comparações entre as duas formas de processamento foram realizadas pelo teste de *t* Student ou pelo seu equivalente não-paramétrico Mann-Whitney, quando apropriado.

A concentração da vitamina PP, considerando seus dois vitâmeros, variou entre 6,43 e 15,34mg/100g nas amostras frescas e entre 7,27 e 14,43mg/100g nas amostras desidratadas.

A ingestão diária recomendada para a vitamina PP é de 16mg/dia para adultos (DRI, 2005) e 15% deste valor consiste em 2,4mg de vitamina PP na porção, logo, em termos de rotulagem, cinco dos lotes analisados (G, H, I, J e K) puderam ser considerados fonte desta vitamina, fornecendo no mínimo 20% da IDR.

A Tabela 18 mostra os dados obtidos durante as análises da vitamina B₆ e dos seus vitâmeros, nas amostras de pólen apícola *in natura* e desidratado.

Tabela 18. Concentrações da vitamina B₆ e dos seus vitâmeros, nas amostras de pólen apícola *in natura* e desidratado e sua variação após o processamento.

	Vitamina B ₆ (mg/100g)							
Lotes	In natura				Desidratado			
	Piridoxol	Piridoxal	Piridoxamina	Vitamina B ₆	Piridoxol	Piridoxal	Piridoxamina	Vitamina B ₆
G	0,06 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,65 ± 0,00
H	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,42 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,33 ± 0,01
I	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,42 ± 0,00	0,52 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,40± 0,01
J	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,09	0,42 ± 0,01	0,71 ± 0,09	0,06 ± 0,00	0,18 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,44 ± 0,01
K	0,11 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,79 ± 0,03	0,09 ± 0,00	0,31 ± 0,05	0,37 ± 0,00	0,77 ± 0,06
L	0,09 ± 0,00	0,17± 0,02	0,45 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,57 ± 0,04
M	0,06 ± 0,01	0,11± 0,01	0,54 ± 0,03	0,65 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,49 ± 0,08	0,71 ± 0,08
Média	0,64 ± 0,11				0,55 ± 0,17			
Min	0,50				0,33			
Máx	0,79				0,77			

Abaixo do limite de Quantificação

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão das 7 análises. As comparações entre as duas formas de processamento foram realizadas pelo teste de t Student ou pelo seu equivalente não-paramétrico Mann-Whitney, quando apropriado.

A concentração da vitamina B₆ variou entre 0,50 e 0,79mg/100g nas amostras frescas e entre 0,33 e 0,77mg/100g nas amostras desidratadas.

As quantidades do vitâmero Piridoxol encontradas nas amostras foi muito baixa, estando em alguns casos abaixo do limite de quantificação tanto em amostras frescas (lotes G, H, I e M) quanto nas amostras desidratadas (lotes H, I e J).

Para a vitamina B₆, a IDR é de 1,3mg/dia para adultos e 15% deste valor consistiriam na ingestão de 0,20mg da vitamina por porção. De acordo com os resultados, o pólen apícola forneceria 0,10 a 0,19mg da vitamina em sua porção diária, logo, em termos de rotulagem, não poderia ser considerado como fonte da vitamina B₆.

A literatura descreve que uma das etapas mais importantes na produção do pólen apícola é o processo de desidratação, que é responsável por promover a preservação e aumentar a vida de prateleira do produto. No presente trabalho, conforme se pode observar nas Tabelas 16, 17 e 18, verificou-se que o processo de desidratação não interferiu nas concentrações de nenhuma das vitaminas em questão, na matriz pólen apícola ($p < 0,05$). Então além de ser favorável a comercialização do produto por aumentar os prazos de validade, a desidratação não interferiu no seu valor nutricional.

5.4 Composição centesimal do pólen apícola desidratado

Tabela 19. Análise físico-química das amostras de pólen apícola desidratado e as especificações da regulamentação Brasileira (BRASIL, 2001), Argentina (KRELL, 1996; ARGENTINA, 1990) e Francesa (BOGDANOV, 2004).

Lotes	Composição Centesimal (%)				
	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Umidade	Carboidratos Totais #
G	2,91 ± 0,01	5,57 ± 0,25	24,04 ± 0,44	3,38 ± 0,05	64,10
H	2,77 ± 0,01	5,74 ± 0,24	22,15 ± 0,09	3,19 ± 0,03	66,15
I	2,84 ± 0,09	6,13 ± 0,22	22,51 ± 0,17	3,74 ± 0,01	64,78
J	2,85 ± 0,00	5,87 ± 0,05	22,28 ± 0,05	3,16 ± 0,02	65,84
K	3,15 ± 0,03	4,57 ± 0,16	24,77 ± 0,13	3,44 ± 0,03	64,07
L	3,24 ± 0,02	5,06 ± 0,42	25,11 ± 0,15	3,38 ± 0,05	63,21
M	3,09 ± 0,02	4,74 ± 0,38	22,77 ± 0,09	3,99 ± 0,02	65,41
Média	2,98 ± 0,18	5,39 ± 0,60	23,38 ± 1,24	3,47 ± 0,30	64,80
Legislação Brasileira (%)	Máximo 4	Mínimo 1,8	Mínimo 8	Máximo 4	-
Regulamentação Francesa (%)	Entre 2 e 6	Entre 1 e 10	Entre 10 e 41	Máximo 6	-
Regulamentação Argentina (%)	Máximo 4	-	Entre 15 e 29	Máximo 4	-

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão das 7 análises.
Calculados por diferença: 100g – total em gramas (cinzas, lipídeos, proteína e umidade), portanto inclui a fração fibra alimentar total.

Os dados de avaliação da composição centesimal demonstram que o pólen apícola coletado na região do Vale do Ribeira – SP atende aos parâmetros de qualidade estabelecidos pela Legislação Brasileira, Francesa e Argentina.

É importante ressaltar que a Legislação Brasileira estabelece os parâmetros a serem avaliados bem como seus limites, mas não informa quais métodos devem ser utilizados para avaliar a qualidade do pólen apícola.

Os resultados encontrados para cinzas (2,98%) são semelhantes foram observados por Bastos *et al.* (2003 - Estados de SP e MG), Barreto *et al.* (2006 -

várias regiões do Brasil), Marchini, Reis e Moreti (2006 – Piracicaba/SP) e Melo (2008 – Pariquera-Açu/SP) que obtiveram os valores de 2,79%, 2,89%, 2,90%, 3,08 respectivamente.

O conteúdo de lipídeos (5,39%) foi semelhante ao encontrado nas amostras provenientes da mesma região analisadas por Melo (2008) (4,97%) e também ao relatado por Funari *et al.* (2003) para as amostras de Botucatu/SP (5,1%). Outras amostras de pólen apícola, produzidas em diversas regiões do Brasil analisadas por Barreto *et al.* (2006), ou ainda algumas amostras de Piracicaba/SP, avaliadas por Marchini, Reis e Moreti (2006), apresentaram valores mais baixos: 3,82% e 3,60%, respectivamente. Já os valores 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%.

O valor médio para proteína bruta (23,38%) é semelhante aos 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 produzidas em 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. Enquanto que o valor informado por Mello (2008) foi de 23,59% para as amostras também de Pariquera-Açu.

As amostras aqui avaliadas apresentaram valor médio para umidade de 3,47%, ligeiramente maior que os 2,34% relatados por Melo (2008) na avaliação de amostras também produzidas no Vale do Ribeira. Ao avaliar amostras provenientes da região sul do Brasil Almeida-Muradian *et al.* (2005), encontraram 7,4% de umidade. Valores bastante elevados também foram relatados por Bastos *et al.* (2003) em amostras desidratadas de pólen apícola proveniente dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (média 8,78%).

Ensaio realizados por Melo (2008) para escolha do melhor método para a determinação de umidade do pólen apícola demonstraram que conforme o método escolhido o resultado é diferente e que um dos melhores métodos é o de secagem por infravermelho.

Podemos observar que mesmo se tratando de amostras coletadas em regiões diferentes do território brasileiro ou ainda como no caso do trabalho feito por Melo (2008) em que as amostras foram coletadas na mesma região, mas em safras diferentes, os valores para a composição centesimal não diferiram.

5.5 Análise polínica

A análise polínica permite identificar as principais fontes poliníferas utilizadas pelas as abelhas, bem como, os períodos de produção de pólen no campo e possíveis épocas de carência (MORETI *et al.*, 2002). A Tabela 20 apresenta os tipos polínicos dos lotes coletados no segundo semestre do ano de 2007.

Tabela 20. Porcentagens dos tipos polínicos presentes nas amostras de pólen apícola desidratado.

Família Gênero / Espécie (Nome Vulgar)	Frequência(%)*						
	Lote G	Lote H	Lote I	Lote J	Lote K	Lote L	Lote M
Arecaceae% (palmeiras)	10 (Pli)	90 (PD)		10 (Pli)	3 (Pli)	10 (Pli)	80 (PD)
Cecropia (embaúba)			5 (Pli)				
Cestrum (baga-de-bugre)					70 (PD)	50 (PD)	
Cyperaceae (tiririca)					10 (Pli)		
Eucalyptus (eucalipto)				10 (Pli)			
Ilex (congonha)		5 (Pli)	30 (PA)			5 (Pli)	5 (Pli)
Myrcia (murta)	80 (PD)		10 (Pli)	20 (PA)			
Piper (caapeba)				50 (PD)			
Vernonia (assa-peixe)	5 (Pli)						
Trema (grandiuva)			5 (Pli)				

* PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%); Pli = pólen isolado importante (de 3% a 15%).

Verifica-se que o tipo *Arecaceae* apareceu como pólen dominante em dois lotes (H, M); o mesmo ocorreu com o tipo *Cestrum* que apareceu como pólen dominante nos lotes (K, L). Enquanto os tipos *Myrcia* e *Piper* aparecem como pólen dominante em apenas um lote cada um (G e J respectivamente). Já o lote I não apresentou pólen dominante, apenas pólen acessório tipo *Illex*. O tipo *Arecaceae* aparece nas proporções de pólen dominante ou isolado importante, em todos os lotes, com exceção do lote I, onde pode ter ocorrido como pólen isolado ocasional (< 3%); indicando que pode se tornar fonte de coleta de pólen se ocorrer em grande quantidade nas áreas de produção.

Amostras que possuem em sua composição quantidades superiores a 45% de um táxon botânico podem ser consideradas como monofloral logo, tal classificação pôde ser atribuída a cinco dos lotes (G, H, K, L e M) analisados. Os dois restantes (I e J) podem ser considerados pólen heterofloral, o que lhes garante propriedades variadas. Quanto ao lote J, mesmo apresentando 50% do táxon *Piper* assuminos que deveria ser classificado como heterofloral pois esse pólen apresenta grãos muito pequenos enquanto os táxons *Eucalyptus* (10%) e *Arecaceae* (10%) que são importantes produtores com grãos de pólen bem maiores.

Verifica-se que não houve predominância de uma espécie botânica e que as abelhas utilizaram flora variada para produzir o pólen e demais produtos da colméia.

Almeida-Muradian *et al.* (2005), que analisaram a taxonomia botânica de 10 amostras de pólen apícola provenientes do sul do Brasil, observaram que todas as amostras apresentaram mais de uma taxonomia apesar de serem designadas pelo produtor como amostras de pólen monofloral. Os autores concluíram que o fato das bolotas de pólen apresentarem apenas uma cor não indica que sejam necessariamente monoflorais, ainda que as mesmas possuam mais chances de serem de um único táxon botânico quando comparados com amostras que apresentam várias cores.

A Figura 20 mostra os tipos polínicos presentes nos lotes analisados e identifica alguns desses tipos.

Figura 20. Tipos polínicos encontrados nas amostras desidratadas de pólen apícola (lotes G a M).
 Fileira superior = aspectos gerais dos lotes em baixo aumento;
 fileira inferior = grãos de pólen identificados nos respectivos lotes.

Neste trabalho observou-se uma relação diretamente proporcional entre as porcentagens dos tipos polínicos *Myrcia* e *Vernonia*, e a concentração da vitamina B₁ ($r > 0,40$) ($p < 0,05$). Por outro lado, quanto maior a presença do tipo polínico *Cestrum*, menor era a concentração da vitamina B₂ ($r = -0,81$) ($p < 0,05$). Verificou-se ainda que a ocorrência do tipo polínico *Ilex*, foi inversamente proporcional à concentração da vitamina PP ($r = -0,70$), de forma marginalmente significativa ($p < 0,10$). Quanto à vitamina B₆, houve associação entre os tipos de pólen e sua concentração.

Com relação à composição centesimal notou-se que o tipo polínico *Cestrum* está associado de forma diretamente proporcional ao teor de cinzas e proteínas ($r = 0,75$) ($p < 0,05$) e inversamente proporcional ao teor de lipídeos ($r = -0,66$) ($p < 0,10$). Quanto as porcentagens de umidade é importante observar que o tipo polínico não trouxe nenhuma contribuição ao teor de umidade do pólen apícola, acredita-se que essa propriedade esteja relacionada às condições ambientais presentes quando da coleta do pólen pelas abelhas.

5.5 Análises do pólen apícola desidratado após estocagem

Os sete lotes de amostras desidratadas de pólen apícola analisados foram estocados em três condições 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 obtidos nas análises das vitaminas B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina) e da vitamina PP (niacina e niacinamida), após doze meses de estocagem estão apresentados nas Tabelas 21, 22 e 23 e graficamente nas Figuras 21, 22 e 23.

A Tabela 24 apresenta os resultados para a vitamina B₆ (piridoxol, piridoxal e piridoxamina) após quatro meses de estocagem e graficamente na Figura 24.

Tabela 21. Concentrações da vitamina B₁ em amostras desidratadas de pólen apícola, após 12 meses de estocagem.

Lotes	Vitamina B ₁ (mg/100g)									
	Tempo 0	Condição						Freezer		
		Luz		Escuro						
		4 meses	8 meses	12 meses	4 meses	8 meses	12 meses			
G	1,01 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,82 ± 0,06	0,83 ± 0,04	0,89 ± 0,03	0,83 ± 0,03	0,85 ± 0,03	0,96 ± 0,03	0,91 ± 0,00	0,94 ± 0,02
H	0,68 ± 0,03	0,61 ± 0,01	0,67 ± 0,02	0,65 ± 0,09	0,62 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,62 ± 0,05	0,67 ± 0,02	0,76 ± 0,04	0,67 ± 0,04
I	0,64 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,69 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,72 ± 0,07	0,61 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,79 ± 0,00	0,64 ± 0,04
J	0,74 ± 0,06	0,63 ± 0,03	0,61 ± 0,01	0,55 ± 0,04	0,64 ± 0,00	0,63 ± 0,00	0,55 ± 0,04	0,72 ± 0,02	0,71 ± 0,03	0,58 ± 0,01
K	0,65 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,62 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,60 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,55 ± 0,06	0,65 ± 0,02	0,78 ± 0,10	0,65 ± 0,07
L	0,66 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,66 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,63 ± 0,09	0,62 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,65 ± 0,01	0,68 ± 0,03	0,56 ± 0,06
M	0,80 ± 0,03	0,72 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,60 ± 0,05	0,73 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,73 ± 0,05	0,80 ± 0,02	0,86 ± 0,01	0,79 ± 0,01
Média	0,74 ± 0,13	0,64 ± 0,11	0,69 ± 0,08	0,60 ± 0,11	0,67 ± 0,11	0,69 ± 0,07	0,64 ± 0,12	0,73 ± 0,16	0,78 ± 0,08	0,69 ± 0,13
Min	0,64	0,56	0,61	0,51	0,6	0,62	0,54	0,64	0,68	0,56
Máx	1,01	0,84	0,82	0,83	0,89	0,83	0,85	0,96	0,91	0,94

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado.

Figura 21. Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₁ durante estocagem, em pólen apícola. Os valores representam a média de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado.

Pelos resultados obtidos no estudo de estabilidade, verificamos que a vitamina B₁ na matriz pólen apícola permaneceu estável durante o período de estudo proposto nas três condições de estocagem. Somente em 8 meses o armazenamento em freezer resultou em perdas marginalmente menores ($p < 0,10$) de vitamina B₁ do que nas demais condições de armazenamento.

Tabela 22. Concentrações da vitamina B₂ em amostras desidratadas de pólen apícola, após 12 meses de estocagem.

Lotes	Tempo 0	Vitamina B ₂ (mg/100g)								
		Luz			Escuro			Freezer		
		4 meses	8 meses	12 meses	4 meses	8 meses	12 meses	4 meses	8 meses	12 meses
G	2,49 ± 0,03	1,15 ± 0,02	1,76 ± 0,07	1,81 ± 0,03	1,41 ± 0,05	1,93 ± 0,10	1,51 ± 0,02	1,48 ± 0,03	2,05 ± 0,05	1,37 ± 0,02
H	1,92 ± 0,03	1,45 ± 0,06	1,32 ± 0,07	1,37 ± 0,03	1,57 ± 0,03	1,39 ± 0,09	1,56 ± 0,03	1,61 ± 0,02	1,54 ± 0,05	1,62 ± 0,04
I	2,56 ± 0,05	1,46 ± 0,07	1,27 ± 0,01	1,14 ± 0,01	1,55 ± 0,01	1,35 ± 0,05	1,25 ± 0,03	1,64 ± 0,06	1,47 ± 0,01	1,27 ± 0,01
J	2,05 ± 0,04	1,32 ± 0,06	1,36 ± 0,02	1,29 ± 0,03	1,46 ± 0,02	1,52 ± 0,01	1,42 ± 0,05	1,52 ± 0,03	1,57 ± 0,03	1,43 ± 0,03
K	1,77 ± 0,06	1,44 ± 0,02	1,03 ± 0,05	1,47 ± 0,04	1,54 ± 0,02	1,15 ± 0,01	1,58 ± 0,03	1,55 ± 0,00	1,30 ± 0,05	1,59 ± 0,05
L	1,79 ± 0,02	1,07 ± 0,04	1,34 ± 0,13	1,62 ± 0,05	1,18 ± 0,05	1,55 ± 0,11	1,65 ± 0,07	1,27 ± 0,01	1,43 ± 0,13	1,72 ± 0,03
M	2,03 ± 0,05	1,25 ± 0,01	1,67 ± 0,11	1,77 ± 0,07	1,38 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,96 ± 0,04	1,42 ± 0,09	1,68 ± 0,06	2,01 ± 0,03
Média	2,09 ± 0,32	1,31 ± 0,16 ^a	1,39 ± 0,25 ^a	1,50 ± 0,25 ^a	1,44 ± 0,14 ^a	1,50 ± 0,24 ^a	1,56 ± 0,22 ^a	1,50 ± 0,13 ^{ab}	1,58 ± 0,24 ^a	1,54 ± 0,25 ^a
Min	1,77	1,07	1,03	1,14	1,18	1,15	1,25	1,27	1,30	1,27
Máx	2,56	1,46	1,76	1,81	1,60	1,93	1,96	1,64	2,05	2,01

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado. ^a diferenças estatisticamente significativas com relação ao tempo 0 de cada condição de armazenamento (p<0,05). ^b diferença estatisticamente significativa com relação ao armazenamento em luz (p<0,05).

Figura 22. Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₂ durante estocagem, em pólen apícola. Os valores representam a média de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado.

a= diferenças estatisticamente significativas com relação ao tempo 0 de cada condição de armazenamento ($p < 0,05$).

b= diferença estatisticamente significativa com relação ao armazenamento em luz ($p < 0,05$).

Para a vitamina B₂ observou-se uma queda significativa do tempo 0 para os tempos 4, 8 e 12 meses ($p < 0,05$), com valores de perda semelhantes para as três condições estocagem, exceto o resultado de 4 meses, quando o armazenamento em freezer resultou em menores perdas da vitamina do que o armazenamento na luz ($p < 0,05$), mantendo-se estável até o final do estudo.

Após 12 meses de estocagem verificou-se que todos os lotes nas três condições de estocagem ainda podem ser considerados como fonte da vitamina fornecendo quantidades que variam entre 21,9 e 38,75% da Ingestão Diária Recomendada (IDR).

Tabela 23. Concentrações da vitamina PP nas amostras desidratadas de pólen apícola, após 12 meses de estocagem.

Lotes	Vitamina PP (mg/100g)									
	Tempo 0	Luz			Condição Escuro			Freezer		
		4 meses	8 meses	12 meses	4 meses	8 meses	12 meses	4 meses	8 meses	12 meses
G	13,38 ± 0,63	9,31 ± 0,91	7,93 ± 0,90	2,74 ± 0,22	9,49 ± 0,09	7,98 ± 0,21	3,33 ± 0,06	8,19 ± 0,70	7,63 ± 0,41	3,37 ± 0,10
H	13,96 ± 0,26	6,93 ± 0,92	7,78 ± 0,24	3,52 ± 0,15	7,99 ± 0,39	7,56 ± 0,26	3,74 ± 0,51	7,73 ± 0,34	6,72 ± 0,26	4,82 ± 0,84
I	13,40 ± 0,44	7,53 ± 0,08	7,09 ± 0,04	5,32 ± 0,09	7,29 ± 0,15	7,49 ± 0,24	5,25 ± 0,18	6,89 ± 0,34	6,31 ± 0,18	5,29 ± 0,40
J	14,43 ± 1,21	5,55 ± 0,10	7,54 ± 0,14	5,31 ± 0,16	5,56 ± 0,12	7,32 ± 0,26	5,28 ± 0,11	5,60 ± 0,24	6,93 ± 0,40	4,79 ± 0,19
K	13,94 ± 0,72	6,27 ± 0,25	4,48 ± 0,80	4,82 ± 0,37	5,78 ± 0,06	5,58 ± 0,21	4,91 ± 0,20	5,48 ± 0,26	4,89 ± 0,72	4,36 ± 0,18
L	7,27 ± 0,15	5,54 ± 0,58	6,68 ± 0,12	5,21 ± 0,40	5,23 ± 0,15	6,01 ± 0,34	5,37 ± 0,17	5,09 ± 0,03	6,51 ± 0,82	4,67 ± 0,15
M	8,90 ± 0,41	5,42 ± 0,29	7,96 ± 0,23	5,06 ± 0,18	5,12 ± 0,31	6,93 ± 0,30	3,83 ± 0,90	5,04 ± 0,06	5,87 ± 0,18	4,55 ± 0,02
Média	12,18 ± 2,86	6,65 ± 1,42	7,07 ± 1,23	4,57 ± 1,02 ^a	6,64 ± 1,66	6,98 ± 0,88	4,53 ± 0,86 ^a	6,29 ± 1,30	6,41 ± 0,86	4,55 ± 0,59 ^a
Min	7,27	5,42	4,48	2,74	5,12	5,58	3,33	5,04	4,89	3,37
Máx	14,43	9,31	7,93	5,32	9,49	7,98	5,37	8,19	7,63	5,29

Os valores em destaque representam a média ± desvio padrão de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado.
^a diferenças estatisticamente significativas com relação ao tempo 0 de cada condição de armazenamento ($p < 0,05$)

Figura 23. Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina PP durante estocagem, em pólen apícola. Os valores representam a média de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado.
a= diferenças estatisticamente significativas com relação ao tempo 0 de cada condição de armazenamento ($p < 0,05$).

Para a vitamina PP (niacina e niacinamida), observou-se uma queda significativa do tempo 0 para o tempo 12 meses ($p < 0,05$) da ordem de 60% para todas as condições e diferenças marginalmente significativas do 0 para o 4º mês e do 8º para o 12º mês ($p < 0,10$).

Após 4 meses de estocagem os cinco lotes (G, H, I, J e K) antes considerados como fonte da vitamina PP encontram-se com concentrações abaixo de 9,6mg/100g, valor necessário para ser fonte da vitamina.

Tabela 24. Concentrações da vitamina B₆ e dos seus vitâmeros nas amostras de pólen apícola desidratado após 4 meses de estocagem.

Lotes	Vitâmeros da B ₆ (mg/100g)											
	Tempo 0				Luz				Condição Escuro			
	Piridoxol	Piridoxal	Piridoxamina		Piridoxol	Piridoxal	Piridoxamina		Piridoxol	Piridoxal	Piridoxamina	
G	0,09 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,36 ± 0,02		0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,18 ± 0,00		0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,03	
H	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,25 ± 0,01		0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,17 ± 0,00		0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,17 ± 0,02	
I	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,28 ± 0,01		0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,21 ± 0,00		0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,23 ± 0,02	
J	0,06 ± 0,00	0,18 ± 0,02	0,26 ± 0,02		0,08 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,01		0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,20 ± 0,00	
K	0,09 ± 0,00	0,31 ± 0,05	0,37 ± 0,00		0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,24 ± 0,00		0,03 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,23 ± 0,02	
L	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,37 ± 0,02		0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,01		0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,04	
M	0,07 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,49 ± 0,08		0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01		0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,01	
Vitamina B ₆ (mg/100g)												
Lotes	Tempo 0				Luz				Condição Escuro			
	Vitamina B ₆				Vitamina B ₆				Vitamina B ₆			
G	0,65 ± 0,00				0,23 ± 0,00				0,20 ± 0,03			
H	0,33 ± 0,01				0,21 ± 0,00				0,21 ± 0,01			
I	0,40 ± 0,01				0,26 ± 0,01				0,23 ± 0,02			
J	0,44 ± 0,01				0,27 ± 0,00				0,31 ± 0,00			
K	0,77 ± 0,08				0,36 ± 0,00				0,35 ± 0,02			
L	0,57 ± 0,04				0,19 ± 0,00				0,20 ± 0,05			
M	0,71 ± 0,08				0,13 ± 0,03				0,20 ± 0,02			
Média	0,53 ± 0,17				0,27 ± 0,07				0,24 ± 0,06			
Min	0,33				0,13				0,20			
Máx	0,77				0,36				0,35			

Abaixo do limite de Quantificação.

Os valores em esteque representam a média ± desvio padrão de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado.

Figura 24. Representação gráfica dos resultados obtidos para a vitamina B₆ durante estocagem, em pólen apícola. Os valores representam a média de 7 análises. As comparações entre os diferentes tempos, fixando-se cada condição de armazenamento, foram realizadas por ANOVA seguida de Tukey ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado.

No caso da vitamina B₆, observou-se uma queda significativa na concentração do tempo 0 para os tempos 8 e 12 meses ($p < 0,05$), quando vitamina não foi detectada em nenhum dos lotes de amostra e em nenhuma das condições de estocagem propostas.

Observa-se ainda, que as concentrações dos vitâmeros Piridoxol e Piridoxal encontram-se abaixo dos limites de quantificação calculados durante a etapa de validação do método.

Embora ambientes frios e escuros, sejam considerados ideais para armazenar o pólen apícola a fim de preservar seu valor nutricional (CAMPOS, *et al.*, 2003), foi verificado no presente trabalho que a estocagem em freezer (-18 °C) ou a proteção contra o efeito da luz não tiveram efeito positivo. Os resultados foram dependentes do tempo de armazenamento e não da condição em que a amostra foi mantida o que sugere nesse caso que não há a necessidade de se desenvolver embalagens que o

protejam da luz, tão pouco seria preciso armazenar o produto em freezer para a conservação das vitaminas do complexo B. Procedimentos que acarretariam maior investimento por parte da indústria e revendedores do pólen apícola.

Outro fato bastante interessante é que foi possível explicar matematicamente a influência do tempo de armazenamento nas concentrações das vitaminas B₆ e PP, para todas as condições de estocagem simultaneamente, através do estabelecimento de equações de regressão linear.

A queda das concentrações da vitamina B₆ pôde ser explicada ao nível de 76% pelo aumento do tempo de armazenamento ($r^2 = 0,76$), de acordo com a seguinte equação:

$$[B_6] = 0,48 - 0,047 \times \text{tempo de armazenamento}$$

Enquanto que para a vitamina PP a explicabilidade foi ao nível de 60% pelo aumento do tempo de armazenamento ($r^2 = 0,60$), de acordo com a seguinte equação:

$$[PP] = 10,97 - 0,56 \times \text{tempo de armazenamento}$$

Ressalta-se que, após validação externa, essas equações poderiam vir a ser aplicadas na predição de teores vitamínicos de polens em geral, ao menos dentro da faixa de armazenamento estudada (0 – 12 meses).

6. CONCLUSÕES

De forma inédita, no Brasil, e com dados obtidos de forma clara quanto a procedência das amostras de pólen apícola, o presente trabalho possibilitou concluir que:

O processo de desidratação que é favorável para a preservação do produto e aumento da vida de prateleira, não interferiu no conteúdo das vitaminas do complexo B ($p < 0,05$).

A vitamina B₁ permaneceu estável durante o período de estocagem de um ano, nas três condições estudadas.

Para a vitamina B₂ observou-se que a queda significativa na concentração ocorreu aos 4 meses de estocagem, representada pela média de 28% (independente da condição de armazenamento) e que a mesma permaneceu estável até o fim do estudo. Verificou-se ainda que ao final dos 12 meses de armazenamento todos os lotes nas três condições de estocagem puderam ser considerados como fonte da vitamina B₂ fornecendo quantidades que variam entre 19,5 e 35,25% da Ingestão Diária Recomendada (IDR).

Para a vitamina PP (niacina e niacinamida), observou-se uma queda significativa do tempo 0 para o tempo 12 meses ($p < 0,05$) da ordem de 60% para todas as condições e diferenças marginalmente significativas do 0 para o 4º mês e do 8º para o 12º mês ($p < 0,10$).

No caso da vitamina B₆, foi observada uma queda significativa na concentração do tempo 0 para os tempos 8 e 12 meses ($p < 0,05$), quando esta vitamina não foi mais detectada.

De maneira geral pode-se dizer que a concentração das vitaminas foi dependente do tempo de armazenamento e não da condição em que o pólen apícola desidratado foi estocado ($p < 0,05$).

Foi possível explicar matematicamente, através de equações de regressão linear oriundas da análise multivariada, a influência do tempo de armazenamento nas concentrações das vitaminas B₆ e PP, com explicabilidade de 76 e 60% respectivamente, para essas amostras e nessas condições.

Pela validação, os métodos de análise aplicados para a determinação das vitaminas no pólen apícola mostraram-se adequados para serem utilizados num laboratório de controle de qualidade de alimentos.

Quanto à taxonomia botânica, das amostras analisadas, cinco lotes foram classificados como pólen monofloral (G, H, K, L e M) e dois (I e J) como pólen heterofloral. Não houve predominância de uma espécie botânica, o que indica que as abelhas utilizaram flora variada para produzir o pólen e demais produtos da colméia.

Para as condições estudadas observou-se uma correlação diretamente proporcional entre as porcentagens dos tipos polínicos *Myrcia* e *Vernonia*, e a concentração da vitamina B₁ ($r > 0,40$) ($p < 0,05$). Por outro lado, quanto maior a presença do tipo polínico *Cestrum*, menor era a concentração da vitamina B₂ ($r = -0,81$) ($p < 0,05$). Verificou-se ainda, que a ocorrência do polínico *Ilex*, foi associada de forma marginalmente significativa ($p < 0,10$) e inversamente proporcional à concentração tipo da vitamina PP ($r = -0,70$). Quanto à vitamina B₆ não houve associação entre os tipos de pólen e sua concentração.

Quanto à composição centesimal notou-se que o tipo polínico *Cestrum* está associado de forma diretamente proporcional ao teor de cinzas e proteínas ($r = 0,75$) ($p < 0,05$) e inversamente proporcional ao teor de lipídeos ($r = -0,66$) ($p < 0,10$).

Os valores encontrados para composição centesimal demonstraram que o pólen apícola coletado na região do Vale do Ribeira – SP atende aos parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira vigente (Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001, e também pelas legislações Francesa e Argentina, e que, quando comparados aos resultados descritos por outros autores brasileiros, independente da região de coleta ou mesmo da safra, não houve diferenças significativas ($p < 0,05$).

7. REFERÊNCIAS*

AGOSTINI, T.S.; GODOY, H.T. Simultaneous determination of nicotinamide, nicotinic acid, riboflavin, thiamin, and pyridoxine in enriched Brazilian foods by HPLC – HRC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.20, n.4, p.245-248, 1997.

ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, 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, n.1/2, p.247-253, 1997.

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, n.1, p.105-111, 2005.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 203p.

ALVES, M.L.T.M.F. **Produção de pólen**. Pindamonhangaba: SAA/AMA, 1995. 30p.

ALVES, M.L.T.M.F. Coletores de pólen. In: _____. **Produção de pólen**. Pindamonhangaba: Instituto de Zootecnia do Centro de Apicultura Tropical, 1997. p.24-30.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. cap.12, p.7 [Method n.960.52 – Microchemical Methods Microchemical Determination of Nitrogen Micro-Kjeldal Method].

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Gaithersburg: AOAC, 1996. p.9-12. [Method n.970.65 - Riboflavin (Vitamin B2) in foods and vitamin preparations, fluorimetric].

AUGUSTIN, J. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in foods by liquid chromatography. **Journal – Association of Official Analytical Chemists**, v.67, n.5, p.1012-1015, 1984.

* De acordo com a NBR 6023/10 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service source Index (CASSI) 1999.

AURAND, L.W.; WOODS, A.E.; WELLS, M.R. The vitamins. In: _____. **Food composition and analysis**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987. 690p.

BALL, G.F.M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London, New York: Chapman & Hall, 1994. 416p.

BALL, G. **Bioavailability and analysis of vitamins in foods**. London, New York: Chapman & Hall, 1998. 416p.

BARGER; BERGEL; TODD. Nature, London, v.136, p.259, 1935. *apud* PYKE, M.A. The chemical measurement of vitamin B₁ in foodstuffs and biological material by means of the thiocrome reaction. **Biochemical Journal**, v.31, p.1958-1963, 1937.

BARNA, E.; DWORSCHÄK, E. Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by high-permance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.668, n.2, p.359-363, 1994.

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.; RABELO, P.C.; BELEZIA, C.O. Perfil protéico do pólen coletado por *Apis mellifera* (híbrida africanizada) no período outono-inverno no Apiário Escola do Centro de Estudos Apícolas da Universidade de Taubaté. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, Florianópolis, 2000. **Anais**. Florianópolis: CBA, 2000. 1 CD-ROOM.

BARRETO, L.M.R.C. Qualidade do pólen brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14, Campo Grande, 2002. **Anais**. Campo Grande, 2002. p.283-288.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C. Caracterização físico-química e controle de qualidade do pólen apícola brasileiro. In: SEMINÁRIO DE PRÓPOLIS DO NORDESTE, 2, ENCONTRO NACIONAL DE PRODUTORES DE PÓLEN, 1, Ilhéus/Itabuna, 2003. **Anais**. Ilhéus/Itabuna, 2003. p.53-66.

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. **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.2, p.167-175, 2005.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O.; DIB, A.P.S., orgs. **Produção de pólen no Brasil**. Taubaté: Cabral, 2006. 100p.

BARTH, O.M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

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. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.3, p.239-244, 2003.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. Berlin, New York: Springer Verlag, 1987. 774p.

BENDER, D.A. Vitamin B6. **Nutrition & Food Science**, n.4, p.128-133, 1997.

VAN DEN BERG, H.; VAN SCHAIK, F.; FINGLAS, P.M.; FROIDMONT-GOË RTZ, I. Third EU MAT intercomparison on methods for the determination of vitamins B₁, B₂ and B₆ in foods by HPLC: collaborative study. **Food Chemistry**, v.57, p.101-108, 1996.

BERGAENTZLÉ, M.; ARELLA, F.; BOURGUIGNON, J.B.; HASSELMANN, C. Determination of vitamin B₆ in foods by HPLC: a collaborative study. **Food Chemistry**, v.52, p.81-86, 1995.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₁. In: PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003a. cap.7, p.229-266.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₂. In: PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003b. cap.8, p.279-316.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina B₆. In: PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003c. cap.10, p.376-396.

BLANCO, D.; SANCHEZ, L.A.; GUTIERREZ, M.D. Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with ordinary and narrow-bore columns. **Journal of Liquid Chromatography**, v.17, n.7, p.1525-1539, 1994.

BLUM, C.; LEVY, R.I. Current therapy for hypercholesterolemia. **JAMA, the Journal of the American Medical Association**, v.261, n.24, p.3582-3587, 1989.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Vitaminas. In: _____. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo. Varela, 1989. p.175-203.

BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and Beeswax. **Apiacta**, v.38, p.334-341, 2004.

BOGNAR, A. Determination of vitamin B₆ in foodstuffs with the aid of high-pressure liquid chromatography (HPLC). **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v.181, p.200-205, 1985.

BOGNAR, A.; OLLILAINEN, V. Influence of extraction on the determination of vitamin B6 in food by HPLC. **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v.204, p.327-335, 1997.

BORGET, L.J.; BRIGGS, G.M.; CALLOWAY, D.H. **Nutrition and physical fitness**. 8.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1966. 614p.

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. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001**. 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: 5 nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.269, de 22 de setembro de 2005**. Estabelece regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18828&word>. Acesso em: 9 nov. 2008.

BRITISH Pharmacopoeia 1999. London: Stationary Office, 1999. p.1252, 1397.

BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T., eds. **Methods for the determination of vitamins in food recommended by COST 91**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1985. 166p.

BUCK, A.C.; REES, R.W.M.; EBELING, L. Treatment of chronic prostatitis and prostatodyia with pollen extract. **British Journal of Urology**, v.64, p.496-499, 1989.

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 & 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.; LENSKEY, 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).

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MITCHELL, K.A.; MARKHAM, K.R.; CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.742-745, 2003.

CHASE Jr.; G.W.; LANDEN Jr., W.O.; SOLIMAN, A.G.; EITENMILLER, R.R. Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin, and piridoxine in medical foods. **Journal of AOAC International**, v.76, n.6, p.1276-1280, 1993.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. São Paulo: Edgard Bülcher, 1998. 179p.

ARGENTINA. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Alimentos. **Código Alimentario Argentino**. [Capítulo X: Alimentos Azucarados: Artículo 785 – Resolución 1550 de 12 de dezembro de 1990]. p.15. Disponível em: http://www.anmat.gov.ar/codigoa/CAPITULO_X_Azucarados_atualiz_06-03.pdf. Acesso em: 9 nov. 2008.

COLLIN, S.; VANHAVRE, T.; BODART, E.; BOUSETA, A. Heat treatment of pollens: impact on their volatile flavour constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.444-448, 1995.

CORNEJO, L.G. **Pólen: tecnologia de su produccion, procesado, y comercializacion**. Buenos Aires: IPTEA, 1994. 114p.

COOPERMAN, J.M.; LOPEZ, R. Riboflavin. In: MACHLIN, L.J., ed. **Handbook of vitamins: nutricional, biochemical, and clinical aspects**. 2.ed. New York: M. Dekker, 1991. p.283-310. (Food Science and Technology, 40).

COULTATE, T.P. **Food, the chemistry of its components**. 3.ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1996. p.208-244. (Royal Society of Chemistry paperbacks).

DADANT, L. **La abeja y la colmeia**. 4.ed. S.l.: Guli, 1966. 936p.

DAWSON, K.R.; UNKLESBAY, N.F.; HEDRICK, H.B. HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, 1988, p.1176-1179.

DeRITTER, E. Vitamins in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, n.10, p.1073-96, 1982.

DONADIEU, Y. **Le pollen: thérapeutique naturelle**. 6.ed. Paris: Maloine, 1983. 99p.

DONG, M.W.; LEPORE, J.; TAURUMOTO, T.; Factors affecting the ion-pair chromatography of water soluble vitamins. **Journal of Chromatography**, v.442, p.81-95, 1988.

DRISKELL, J.A. Vitamin B₆ requirements of humans. **Nutrition Research**, v.14, n.2, p.293-324, 1994.

DRISKELL, J.A. Vitamin B₆. In: MACHLIN, L.J., ed. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.379-402. (Food science and technology, 13).

DUTCHER, R.A. Observations on the curative properties of honey, nectar, and corn pollen in avian polyneuritis. **Journal of Biological Chemistry**, v.36, p.551-555, 1918.

EATON, C.V.; LAW, R. Marketing apitherapy products and the challenge of government regulation. **Bee World**, v.81, n.3, p.109-115, 2000.

ERDTMAN, O.G.E. **Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms**. Stockholm, Watham: Chronica Botanica, 1952. 539p. (Introduction to palynology: I).

EYS, J.V. Nicotinic acid. In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. p.311-340. (Food science and technology, 40).

FINGLAS, P.M.; FAULKES, R.M. The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. **Food Chemistry**, v.15, p.37-44, 1984.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 307p. (Série enfermagem, nutrição).

FUNARI, S.R.C.; CARMO, M.C.T.; SOUZA, J.L.B., DIERCKX, S.M.A.G.; BOLDONI, A.; BIAGIO, O. Avaliação da coleta de pólen por colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera*. In: CONGRESSO IBEROLATINO AMERICANO DE APICULTURA, 4, Córdoba, 1994. **Anais**. Cordoba: Argentina, 1994. p.163-165.

FUNARI, S.R.C. **Estudo da coleta de pólen por abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), na região de Botucatu (SP), Brasil**. Botucatu, 1997. 92p. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista.

FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; CURI, P.R.; PEROSA, J.M.Y. Coleta de pólen e produção de mel e própolis em colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Boletim da Indústria Animal**, v.55, p.189-193, 1998.

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. Composições bromatológica e mineral de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, 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. **Química Nova**, v.25, n.4, p.676-679, 2002.

GREGORY, J.F.; FELDSTEIN, D. Determination of vitamin B₆ in foods and other biological materials by paired-ion high- performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p.359-63, 1985.

GREGORY, J.F.; SARTAIN, D.B. Improved chromatographic determination of free and glycosylated forms of vitamin B₆ in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.5, p.899-905, 1991.

GUBLER, C.J. Thiamin. In: MACHLIN, L.J., ed. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. 2.ed. New York: M. Dekker, 1991. p.283-310. (Food Science and Technology, 40).

GYORGY, P. Crystalline vitamin B₆. **Journal of the American Chemical Society**, v.60, n.5, p.983-984, 1938.

GYORGY, P.; ECKHARDT, R.E. Vitamin B₆ and skin lesions in rats. **Nature**, v.144, p.512, 1939.

HALSTED, C.H. Water-soluble vitamins. In: GARROW, J.S.; JAMES, W.P.T., eds. **Human nutrition and dietetics**. 9.ed. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone, 1993. p.239-263.

HARRIS, S.A.; STILLER, E.T.; FOLKERS, K. Structure of vitamin B₆. II. **Journal of the American Chemical Society**, v.61, p.1242-1244, 1939.

HARTMAN, A.M.; DRYDEN, L.P. The vitamins in milk and milk products. In: WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H.; ALFORD, J.A., eds. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3.ed. Westport: Avi, 1983. p.325-401.

HASSELMANN, C.; FRANCK, D.; GRIMM, P.; DIOP, P.A.; SOULES, C. High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietetic foods. **Journal of Micronutrient Analysis**, v.5, n.4, p.269-279, 1989.

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.

HOLLMAN, P.C.H.; SLANGE, J.H.; WAGSTAFFE, J.P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D.A.T.; FINGLAS, P.M. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in foods. **Analyst**, v.118, n.5, p.481-488, 1993.

IANNUZZI, J. Pollen: food for honey bee and man? III. **American Bee Journal**, v.133, n.8, p.557-563, 1993.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**: revisão 01. INMETRO, 2003. 36p. (DOQ-CGCRE-008). Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf. Acesso em: 9 nov. 2008.

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

JACOB, R.A.; SWENDSEID, M.E. Niacina. In: ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD; INSTITUTO INTERNATIONAL DE CIÊNCIAS DE LA VIDA. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6.ed. Washington: OPS, 1991. p.186-193. (Publicación científica, n.532).

KALL, M.A. Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. **Food Chemistry**, v.82, p.315-327, 2003.

KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996. p.87-113. (FAO Agricultural Services Bulletin, v.124).

KIRCHHORFER, R.D.; SHARON, H. Niacin I: dissolution profiles of sustained-release niacin products by automated and manual procedures. **Journal of AOAC International**, v.76, n.2, p.394-398, 1993.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p. (Métodos cromatográficos de análise, 6).

LAHÉLY, S.; BERGAENTZLÉ, M.; HASSELMANN, C. Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. **Food Chemistry**, v.65, p.129-133, 1999.

LAJOLO, F.M. As deficiências da composição de alimentos no Brasil. In: SIMPÓSIO DAS INSTITUIÇÕES BRASILEIRAS DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 1, REUNIÃO ANUAL DO CONSÓRCIO DAS INSTITUIÇÕES BRASILEIRAS DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 15, Pirassununga, 1994. **Anais**. São Paulo: USP, 1995. p.2-5.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993. p.185-204, 538-563.

LEKLEM, J.E. Vitamin B6. In: MACHLIN, L.J., ed. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. 2.ed. New York: M. Dekker, 1991. p.341-392. (Food Science and Technology, 40).

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.

LIGEN, X. La eficacia y el mecanismo de intervención del polen en la lucha contra el cancer y el envejecimiento. IN: CONGRESSO INTERNACIONAL DE APICULTURA, 32, Rio de Janeiro, 1989. **Anais**. Rio de Janeiro: APIMONDIA, 1989. p.223.

LOPER, G.M.; STANDIFER, L.N.; THOMPSON, M.J.; GILLIAM, M. Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. **Apidologie**, v.11, n.1, p.63-73, 1980.

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.

MARTINDALE: the extra pharmacopoeia. 31.ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p.1381-1384.

MACRAE, R. HPLC determination of vitamins. **Journal of Micronutrient Analysis**, v.7, p.247-260, 1990.

MAWATARI, K.I.; IINUMA, F.; WATANABE, M. Determination of nicotinic acid and nicotinamide in human serum by high-performance liquid chromatography with postcolumn ultraviolet-irradiation and fluorescence detection. **Analytical Sciences**, v.7, p.733-736, 1991.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals and drugs and biologicals. 11.ed. Rahway: Merck, 1989. p.7995-7996.

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

MIZRAHI, A.; LENSKY, Y., eds. **Bee products: properties, applications and apitherapy**. New York, London: Plenum Press, 1997. 288p. [Proceedings of an International Conference on Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy, held May 26-30, 1996, in Tel Aviv, Israel].

MORESCHI, E.C.P. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos**. São Paulo, 2006. 193p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CURSO DE PRODUÇÃO DE PÓLEN, Pindamonhangaba, 1995. Pindamonhangaba: IZ/CAT, 1995. 32p.

MORETI, A.C.C.C. Coleta e utilização do pólen pelas abelhas. In: CURSO DE PRODUÇÃO DE PÓLEN, Pindamonhangaba, 1995. Pindamonhangaba: IZ/CAT, 1995. 32p. p.1-7.

MORETI, A.C.C.C. Coleta e utilização do pólen pelas abelhas. In: **Produção de pólen**. Pindamonhangaba: Instituto de Zootecnia do Centro de Apicultura Tropical, 1997. p.1-7.

MORETI, A.C.C.C.; CARVALHO, C.A.L.; MARCHINI, L.C.; OLIVEIRA, P.C.F. Espectro polínico de amostras de mel de *Apis mellifera* L., coletadas na Bahia. **Bragantia**, Campinas, v.59, n.1, p.1-6, 2000.

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.

MORRISON, L.A.; DRISKELL, J.A. Quantities of B₆ vitamins in human milk by high-performance liquid chromatography: influence of maternal vitamin B₆ status. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.337, n.2, p.249-258, 1985.

MUÑOZ, A.; ORTIZ, R.; MURCIA, MA. Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and nondairy imitation milk during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.49, p.203-206, 1994.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals. **Nutrition Research**, v.22, p.519-526, 2002.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDÉ-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. **Food Chemistry**, v.71, p.129-138, 2000.

OLDS, S.J.; VANDERSLICE, J.T.; BROCHETTI, D. Vitamin B₆ in raw and fried chicken by HPLC. **Journal of Food Science**, v.58, p.505-507, 561, 1993.

OLLILAINEN, V.; VAHTERISTO, L.; UUSI-RAUVA, A.; VARO, P.; KOIVISTOINEN, P.; HUTTUNEN, J. The HPLC determination of total thiamin (vitamin B₁) in foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.6, p.152-165, 1993.

OLLILAINEN, V.; FINGLAS, P.M., VAN DEN BERG, H.; FROIDMONT-GORTZ, I. Certification of B-group vitamins (B₁, B₂, B₆ and B₁₂) in four food reference materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.1, p.315-321, 2001.

OLIVEIRA, K.C.L.S. **Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadoras do processo de desidratação**. São Paulo, 2006. 106p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

OTTAWAY, P.B., ed. **The technology of vitamins in food**. London, New York: Blackie Academic & Professional, 1993. 265p.

PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, 2003. p.463-483.

PEREIRA, P.C.M.; VALÉRIO, M.A.R.N.; FUNARI, S.R.C. Perspectivas da utilização do mel, própolis, geléia real e pólen na área médica. In: BARRAVIERA, B., coord. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p.65-80.

POLESELLO, A.; RIZZOLO, A. Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1985-1989). **Journal of Micronutrient Analysis**, v.8, n.2, p.105-158, 1990.

PRESOTO, A.E.F. **Vitaminas do complexo B e ferro em farinhas de cereais**. São Paulo, 2006. 137p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PRESOTO, A.E.F.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Validação de métodos cromatográficos por CLAE para análise das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina naturalmente presentes em farinha de cereais. **Química Nova**, v.31, n.3, p.498-502, 2008.

REIS, V.D.A. **Fatores que influenciam na coleta de pólen por *Apis mellifera* L. e análises físico-químicas do pólen coletado**. Piracicaba, 2001. 76p. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

REIS, V.D.A.; MARCHINI, L.C. Análises físico-químicas de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis Mellifera* L.) em Piracicaba, São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, Florianópolis, 2000. **Anais**. Florianópolis, 2000. Cd Rom.

RIEDER, A.; DORES, E.F.G.C.; HIGA, N.; MORAES, M.P.L. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas**, v.10, p.87-112, 2000.

REITZER-BERGAENTZLEÂ, M.; MARCHIONI, E.; HASSELMANN, C. HPLC determination of vitamin B₆ in foods after pre-column derivatization of free and phosphorylated vitamins into pyridoxol. **Food Chemistry**, v.48, p.321-324, 1993.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIZZOLO, A.; POLESELLO, S. Chromatographic determination of vitamins in foods. **Journal of Chromatography**, v.624, p.103-152, 1992.

ROBINSON, D.S. Elementos químicos y vitaminas como nutrientes. In: _____. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991. 516p.

ROCHA, H.C.; SUZANA, J.; PORTO, S.; FUNARI, S.R.C.; LARA, A.A. O uso de pólen apícola no controle de anemia ferropriva. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 5, Ribeirão Preto, 2002. **Anais**. Ribeirão Preto, 2002. p.295.

ROUNDS, M.A.; NIELSEN, S.S. Basic principles of chromatography. In: NIELSEN, S.S., ed. **Introduction to the chemical analysis of foods**. New York: Chapman & Hall, 1994. cap.28, p.403-424.

RUSSEL, L.F.; VANDERSLICE, J.T. Non-degradative extration and simultaneous quantitation of riboflavin, favin mononucleotide, and favin adenine dinucleotide in foods by HPLC. **Food Chemistry**, v.43, n.2, p.151-162, 1992.

SALOMÉ, J.A.; SALOMÉ, L.G. **Manual prático de produção de pólen apícola**. Florianópolis: EPAGRI, 1998. 53p.

SAMPAIO, E.A.B. Pólen apícola: caracterização e processamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 10, Pousada do Rio Quente, 1994. **Anais**. Pousada do Rio Quente, 1994. p.96-102.

SÁNCHEZ, E.T. **Polen**: producción envasado y comercialización. S.I. Diproansa, 2004. 56p.

SANT'ANA, H.M.P. Niacina. In: PENTEADO, M.V.C., org. **vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003. cap.98, p.331-359.

SCHAUMBURG, H.; KAPLAN, J.; WINDEBANK, A. VICK, N.; RASMUS, S.; PLEASURE, D.; BROWN, M.J. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse: a new megavitamin syndorme. **New England Journal of Medicine**, v.309, p.445-448, 1983.

SCHAUSE, L.P. Coleta, preparo e comercialização do pólen. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 10, Pousada do Rio Quente, 1994. **Anais**. Pousada do Rio Quente, 1994. p.91-95.

SCHAUSE, L.P. Aspectos práticos da produção de veneno, pólen e cera- controle de qualidade do pólen. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

APICULTURA, 12, Salvador, 1998. **Anais**. Salvador: Confederação Brasileira de Apicultura, 1998. p.119-122.

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 contines the tradition of "Langstroth on the hive and the honeybee". Hamilton: Dadant, 1992. p.928-977.

VAN SCHOONHOVEN, J.; SCHRIVER, J.; VAN DEN BERG, H.; HAENEN, G.R.M.M. Reliable and sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B₆ in foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1475-1480, 1994.

SCOTT, K.J.; BISHOP, D.R.; ZECHALKO, A.; EDWARDS-WEBB, J.D.; JACKSON, P.A.; SCUFFAM, D. Nutrient content of liquid milk. I. Vitamins A, D₃, C and the B complex in pasteurized bulk liquid milk. **Journal of Dairy Research**, v.51, n.1, p.37-50, 1984.

SERRA BONVEHI, J.; CASANOVA, T.M. Estudio analitico para determinar la humedad del polen. **Anales de Bromatologia**, v.34, n.2, p.339-349, 1987.

SERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C. A simple method to determine free and glycosylated vitamin B₆ in legumes. **Journal of Liquid Chromatograph & Related Technologies**, v.20, p.957-969, 1997.

SHOSKES, D.A. Phytotherapy in chronic prostatitis. **Urology**, v.60, n.6, suppl., p.35-37, 2002.

SHOSKES, D.A.; MANICKAM, K. Herbal and complementary medicine in chronic prostatitis. **World Journal of Urology**, v.21, p.109-113, 2003.

SGARBIERE, V.C. Nutrição e tecnologia de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.20, n.3/4, p.115-139, 1986.

SILVEIRA, F.A. A importância da palinologia nos estudos apícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11, Teresina, 1996. **Anais**. Teresina, Confederação Brasileira de Apicultura, 1996. p.266-273.

SKURRAY, G.R. A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamin in foods. **Food Chemistry**, v.7, p.77-80, 1981.

SOUZA, R.C.S.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; OLIVEIRA, F.P.M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazônica**, v.3, n.2, p.333-336, 2004.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen**: biology, biochemistry, management. Berlin: Springer-Verlag, New York: Heidelberg, 1974. 287p.

STATISTICA. Versão 8.0 for Windows. Tulsa: StatSoft, 2007. v.1. [Software].

STILLER, E.T.; KERESTESY, J.C.; STEVENS, J.R. The structure of vitamin B₆. I. **Journal of the American Chemical Society**, p.1237-1242, 1939.

TIRAPEGUI, J. **Nutrição**: fundamentos e aspectos atuais. São Paulo: Atheneu, 2000. 284p.

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**. Madrid, Miranda: CYTED, 2003. cap.1, p.1-18.

TYLER, T.A.; GENZALE, J.A. Liquid chromatographic determination of total niacin in beef, semolina and cottage cheese. **Journal – Association of Official Analytical Chemists**, v.73, n.3, p.467-469, 1990.

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. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.53, n.3, p.217-224, 2002.

WITHERELL, P.C. Otros productos de la colmena. In: DADANT, E. **La colmena y la abeja mellífera**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1975. p.684.

WIESE, H. **Informações sobre pólen**: definição, coleta, utilização e comercialização. Florianópolis: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento de Santa Catarina, 1982. 6p.

WOJCICKI, J.; SAMOCHOWIEC, L.; BARTLOMOWICZ, B.; HINEK, A.; JAWORSKA, M.; GAWRONSKA-SZKARZ, B. Effect of atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, v.62, p.39-45, 1986.

YASUMOTO, K.; TSUJI, H.; IWAMI, K.; MITSUDA, H. Isolation from rice bran of a bond form of vitamin B₆ and its identification as 5-O-(β -D-glucopyranosyl) pyridoxine. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.41, p.1601-1607, 1977.

ZAFRA, A.O. **El polen em su salud**. Puebla, Pue: Florimiel, 1979. 61p.

ZHANG, X.; HABIB, F.K.; ROSS, M.; BURGER, U.; LEWENSTEIN, A.; ROSE, K.; JATON, J. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth *in vitro*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p.735-738, 1995.