UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

**Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas anti-oxidantes como
indicadoras do processo de desidratação**

Karla Cristina Lima da Silva Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Ligia B. de Almeida Muradian

São Paulo

2006

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

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011563

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, Karla Cristina Lima da Silva

O48c Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas
antioxidantes como indicadores do processo de desidratação /
Karla Cristina Lima da Silva Oliveira -- São Paulo, 2006.
106p.

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

Orientador: Muradian, Ligia Bicudo de Almeida

I. Antioxidante : Ciência dos alimentos 2. Carotenóide : Ciência
dos alimentos 3. Vitamina C : Ciência dos alimentos 4. Vitamina E :
Ciência dos alimentos I. T. II. Muradian, Ligia Bicudo de Almeida,
orientador.

641.19 CDD

Karla Cristina Lima da Silva Oliveira

Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas
antioxidantes como indicadoras do processo de desidratação

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian
orientador/presidente

Dr. Odair Zenebon

Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho

São Paulo, 14 de fevereiro de 2006.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

CERTIFICADO DE DEFESA

Certifico, para os devidos fins, que o(a) Sr(a). **Karla Cristina Lima da Silva Oliveira** defendeu em sessão pública no dia 14 de fevereiro de 2006, a dissertação intitulada: "Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadoras do processo de desidratação", tendo sido aprovado(a), fazendo jus ao título de **Mestre em Ciência dos Alimentos - Área de Bromatologia**.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2006.

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FCF/USP

AGRADECIMENTOS

O tempo passou rápido demais... Por enquanto o trabalho chegou ao fim e mais uma etapa foi conquistada. Deste tempo ficaram muitas lembranças, muitos rostos, muitos gestos e muitos agradecimentos a fazer...

Primeiramente, à professora, orientadora e amiga Ligia Bicudo de Almeida Muradian pela sua sabedoria, dedicação e incentivo à pesquisa, pelos conselhos e por principalmente acreditar neste projeto e no meu potencial. Agradeço também, por me mostrar do que somos capazes de fazer, mesmo o dia tendo apenas 24 horas.

Ao CNPq e a FAPESP pelo incentivo oferecido através da bolsa de mestrado e auxílio à pesquisa (Processo FAPESP n. 2004/15100-1 e Processo CNPq n. 472542/2004-4).

Às doutoras Augusta Carolina C. C. Moreti e Marilene De Vuono C. Penteado que participaram do Exame de Qualificação.

Aos membros da banca professor doutor Alfredo Tenuta Filho e ao doutor Odair Zenebon pela contribuição tão importante na elaboração definitiva desta Dissertação de Mestrado.

Agradeço imensamente ao trabalho conjunto desenvolvido com as pesquisadoras Erica W. Teixeira e Maria Luisa M. T. F. Alves, que juntamente com a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, foram as responsáveis pelo fornecimento de minhas amostras.

Ao engenheiro José Vilani Oliveira Jr., Gerente Comercial da APILANI Máquinas e Equipamentos Técnicos Ltda, pelo fornecimento e manutenção do desumidificador de pólen.

Ao Centro Tecnológico de Análise de Alimentos (CETAL), em especial à Doutora Harko Matsuda pela disponibilidade em utilizar as dependências de seu laboratório.

Às professoras Inar Castro, Therezinha Andreoli Pinto e Ursula M. Lanfer Marquez pelo apoio técnico e conhecimentos compartilhados.

Aos meus queridos e dedicados “Jimies”, Ricardo Antonio B. Azedo e Marina Moriya que, através da Iniciação Científica, também tornaram possível a realização deste trabalho. Juntamente com a Cinthya Higashi

(técnica do laboratório) que por muitas vezes, bem cedo, já começava o seu dia me ajudando.

Às minhas amigas, Adriana, Priscilla, Renata e Riana, pelos momentos que se calaram para me ouvir e por me deixarem também participar e ajudar nos seus problemas, mostrando o verdadeiro valor da Amizade.

Um agradecimento muito emocionado, faço à Luciana Yoshime, uma das pessoas mais “high tech” que conheci... Em especial por aquele momento em que enxugou minhas lágrimas diante da dificuldade e pelos seus conhecimentos em tão variados assuntos, tornando mais fácil a vida de todos desse laboratório.

Agradeço também a mineirice da Bárbara, a alegria da Thaís Campos, a doçura da Larissa, a solidariedade da Patrícia e da Tais Motta, a transparência da Rosa, a meiguice da Fernanda, e finalmente a dedicação da Elaine Pinto, que me ajudou a “domar” o HPLC.

Às bibliotecárias Adriana de Almeida Barreiros e Leila Aparecida Bonadio que foram tão prestativas em todos os momentos em que precisei de sua ajuda.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e a Secretaria da Pós-graduação.

A Cecília Toscano e Lauren Russo pelo auxílio na análise estatística dos resultados gerados neste trabalho.

Também agradeço às funcionárias Lurdinha, Cilene, Francisca, Josefa e Cida que tanto trabalharam pela ordem e pelo nosso delicioso momento de descontração, regado a café.

A toda minha família, pelas orações, pela torcida e pelo orgulho que sentem por mim...

Finalmente, agradeço ao meu marido, o Rubens Cezar, carinhosamente chamado de Gordo que com tanta compreensão e apoio não me deixou desistir. Seu Amor me confortou em muitos momentos.

A todos vocês, por toda ajuda e amizade dispensada: MEU MUITO OBRIGADA!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE QUADROS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 - Pólen apícola.....	2
2.1.1 – Histórico.....	2
2.1.2 – Definição e importância do pólen para as abelhas	3
2.1.3 – Palinologia	8
2.1.4 - Composição química e valor nutricional do pólen apícola.....	9
2.1.4.1 - Digestão do pólen apícola	11
2.1.5 – Produção do pólen apícola	11
2.1.6 – Controle de qualidade do pólen apícola	14
2.1.7 – Estabilidade do pólen apícola.....	15
2.1.8 – Funções do pólen apícola.....	16
2.1.9 - Efeitos adversos da ingestão do pólen apícola	17
2.2 – Vitaminas.....	18
2.2.1 – Carotenóides e o β -caroteno	18
2.2.1.1 – Introdução.....	18
2.2.1.2 - Estrutura dos carotenóides.....	19
2.2.1.3 - Funções dos carotenóides	21
2.2.1.4 - Estabilidade dos carotenóides.....	21
2.2.2 - Vitamina C.....	23
2.2.2.1 – Introdução.....	23
2.2.2.2 - Estrutura da vitamina C	23
2.2.2.3 - Funções da vitamina C.....	24
2.2.2.4 - Estabilidade da vitamina C	26

2.2.3 - Vitamina E	27
2.2.3.1 – Introdução.....	27
2.2.3.2 - Estrutura da vitamina E	28
2.2.3.3 - Funções da vitamina E	29
2.2.3.4 - Estabilidade da vitamina E	30
3 – OBJETIVOS	31
4 – MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 – Materiais.....	32
4.1.1 – Obtenção das amostras.....	32
4.1.2 – Manejo das colméias	32
4.1.3 – Amostragem	33
4.1.4 – Preparo das amostras	34
4.2 – Reagentes	34
4.3 – Métodos.....	34
4.3.1 - Desidratação	34
4.3.1.1 – Obtenção do pólen apícola pelo processamento convencional.....	35
4.3.1.2 – Obtenção do pólen apícola pelo processamento alternativo	36
4.3.2 – Determinação da umidade.....	37
4.3.3 – Testes de metodologia para determinação do β -caroteno e da vitamina E.....	37
4.3.4 – Determinação de vitamina E (α -tocoferol)	38
4.3.4.1 – Extração	38
4.3.4.2 – Condições cromatográficas	39
4.3.4.3 – Variação da linearidade.....	39
4.3.4.4 – Exatidão – Teste de recuperação.....	39
4.3.4.5 – Precisão – Teste de repetitividade.....	40
4.3.5 -Determinação dos carotenóides totais, do β -caroteno e do valor pró- vitamínico A.....	40
4.3.5.1 – Extração	40
4.3.5.2 – Condições cromatográficas (CCA)	42
4.3.6 - Teste de metodologia para determinação da vitamina C	43
4.3.7 - Determinação da vitamina C (ácido ascórbico).....	43
4.3.7.1 – Extração	43

4.3.7.2 – Titulação	44
4.3.8 - Análise polínica	45
4.3.8.1 - Preparo das lâminas.....	45
4.3.8.2– Identificação das lâminas	46
4.3.9 - Análise estatística.....	47
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 – Eficiência do Processo de Desidratação	48
5.1.1- Processamento convencional.....	49
5.1.2 - Processamento alternativo	49
5.2 – Determinação da umidade.....	50
5.2.1 - Umidade (coleta de outubro de 2004)	50
5.2.2 - Umidade (coleta de abril e outubro de 2005)	51
5.3 – Testes de metodologia para determinação de β -caroteno e α -tocoferol	52
5.4 – Determinação da vitamina E.....	55
5.4.1 – Vitamina E (coleta de outubro de 2004)	55
5.4.2 – Vitamina E (coleta de abril e outubro de 2005).....	56
5.4.3 Teste de recuperação.....	63
5.4.4 Teste de repetitividade	63
5.5 – Determinação de β -caroteno e carotenóides totais	63
5.5.1 – β -caroteno e carotenóides totais (coleta de outubro de 2004).....	63
5.5.2 – β -caroteno e carotenóides totais (coleta de abril e outubro de 2005).....	64
5.6 - Testes de metodologia para determinação de vitamina C.....	68
5.7 – Determinação da Vitamina C.....	69
5.7.1 – Determinação de Vitamina C (coleta de outubro de 2004)	69
5.7.2 – Vitamina C (coleta de abril e outubro de 2005)	71
5.8 Análise Polínica.....	76
5.8.1 – Tipos polínicos.....	80
6 – CONCLUSÕES	85
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Descrição do aparelho reprodutor da flor e das camadas do grão de pólen.....	4
Figura 2: Bolotas de pólen com diversas cores.....	5
Figura 3: Abelha apresentando carga (pólen ou propólis) na corbícula.....	6
Figura 4: Abelha com carga de pólen na corbícula.....	7
Figura 5: Coletores intermediários e trampa de acrílico perfurada.....	13
Figura 6: Estrutura do β -caroteno e da vitamina A.....	20
Figura 7: Reação de decomposição do ácido ascórbico.....	24
Figura 8: Isômeros da vitamina E.....	28
Figura 9: Colméia, ninho e melgueira.....	33
Figura 10: Equipamento Apilani e equipamento Ballardin.....	35
Figura 11: Fluxograma de análise de determinação de vitamina E, carotenóides totais e do β -caroteno.....	41
Figura 12: Fluxograma de análise de determinação da vitamina C.....	44
Figura 13: Análise de β -caroteno (n) e α -tocoferol (n') por CLAE em amostras de pólen apícola.....	53
Figura 14: Análise de β -caroteno (n) e α -tocoferol (n') por CLAE em amostras de pólen apícola.....	54
Figura 15: Cromatogramas de padrão de α -tocoferol e amostra de pólen apícola.....	62
Figura 16: Espectro de absorção do β -caroteno.....	68
Figura 17: Tipos polínicos encontrados nas amostras frescas de pólen apícola coletadas em outubro de 2004.....	81

Figura 18: Tipos polínicos encontrados nas amostras frescas de pólen apícola coletadas em abril de 2005.....	82
Figura 19: Tipos polínicos encontrados nas amostras frescas de pólen apícola coletadas em outubro de 2005.....	82
Figura 20: Identificação dos tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.....	83
Figura 21: Identificação dos tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.....	83
Figura 22: Identificação dos tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição química apresentada por alguns autores em diferentes amostras de pólen apícola.....	10
Tabela 2: Composição química e requisitos para o pólen apícola de acordo com legislação brasileira.....	15
Tabela 3: Comparação entre os resultados observados nos teores de β -caroteno após o processamento de diferentes alimentos.....	22
Tabela 4: Comparação dos parâmetros de funcionamento entre os equipamentos utilizados na secagem das amostras de pólen apícola.....	36
Tabela 5: Descrição das diferentes fases móveis testadas na análise simultânea da vitamina E (α -tocoferol) e do β -caroteno (como pró-vitamina A).....	38
Tabela 6: Parâmetros dos processamentos de desidratação A (método alternativo) e B (método convencional) obtidos nas amostras de pólen apícola.....	48
Tabela 7: Teores de umidade das amostras frescas e processadas de pólen apícola coletadas em outubro de 2004.....	50
Tabela 8: Teores de umidade das amostras de pólen apícolas coletadas em abril e outubro de 2005.....	51
Tabela 9: Teores de vitamina E das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em outubro de 2004.....	55
Tabela 10: Teores de vitamina E das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril e outubro de 2005.....	57
Tabela 11: Teores de carotenóides totais das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril e outubro de 2005.....	64

Tabela 12: Teores de β -caroteno das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril de 2005.....	65
Tabela 13: Teores de vitamina C das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em outubro de 2004.....	70
Tabela 14: Teores de vitamina C das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril e outubro de 2005.....	71
Tabela 15: Porcentagens de tipos polínicos obtidos em amostras frescas de pólen apícola, coletados por <i>Apis mellifera</i> L. em Pindamonhangaba, SP em outubro de 2004 e 2005.....	76
Tabela 16: Porcentagens de tipos polínicos obtidos em amostras frescas de pólen apícola, coletados por <i>Apis mellifera</i> L. em Pindamonhangaba, SP em abril e outubro de 2005.....	78

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Variação entre os teores de vitamina E dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril e outubro de 2005.....	18
Quadro 2: Variação entre os teores de vitamina E dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril e outubro de 2005.....	24
Quadro 3: Variação entre os teores de vitamina E dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em e outubro de 2005.....	34
Quadro 4: Comparação das médias dos teores de vitamina E entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em abril de 2005.....	51
Quadro 5: Comparação das médias dos teores de vitamina E entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em outubro de 2005.....	52
Quadro 6: Variação entre os teores de β -caroteno dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril de 2005.....	72
Quadro 7: Comparação das médias dos teores de β -caroteno entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em abril de 2005.....	73
Quadro 8: Variação entre os teores de vitamina C dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril e outubro de 2005.....	74
Quadro 9: Variação entre os teores de vitamina C dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril de 2005.....	76
Quadro 10: Variação entre os teores de vitamina C dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em outubro de 2005.....	80
Quadro 11: Comparação das médias dos teores de vitamina C entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em abril de 2005.....	82
Quadro 12: Comparação das médias dos teores de vitamina C entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícola coletadas em outubro de 2005.....	85

RESUMO

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

O pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas, mediante acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel. Trata-se de um produto consumido devido a seus benefícios nutricionais e terapêuticos. Sua importância nutricional é reconhecida por ser uma fonte protéica de elevado valor biológico, apresentando ainda carboidratos, lipídeos e minerais em sua composição, além das vitaminas do complexo B, C, E, β -caroteno (como pró-vitamina A) e D; características estas que variam de acordo com sua origem botânica. Este trabalho teve como objetivos: caracterizar o pólen apícola produzido em diferentes épocas de coleta; obter dados científicos nacionais sobre o valor vitamínico de pólen apícola, relacionando-o com sua origem botânica e avaliar o efeito de dois tipos de processos de secagem do pólen apícola nos teores das vitaminas antioxidantes (β -caroteno, como pró-vitamina A, vitamina C e E), considerando-se que estas vitaminas podem ser degradadas durante o processamento. Foram analisados os teores de vitaminas em 10 lotes de pólen apícola fresco, sendo 5 coletados em abril e 5 em outubro de 2005. Os lotes frescos de pólen apícola foram desidratados por um método convencional (desidratação à 42° C) e por um método alternativo (desidratação a 30-35° C). Além disso, foi realizada a identificação dos tipos polínicos encontrados nas amostras frescas de pólen apícola e a associação com o teor de vitaminas encontradas. Os valores das vitaminas determinados nas amostras frescas de pólen apícola variaram entre 13,5 e 42,5 $\mu\text{g/g}$ para vitamina E; 56,3 e 198,9 ($\mu\text{g/g}$) para β -caroteno e entre 273,9 e 560,3 $\mu\text{g/g}$ para vitamina C. De acordo com os resultados concluiu-se que a origem botânica e a época de coleta

influenciaram no teor das vitaminas encontradas, interferindo inclusive na classificação da amostra como fonte ou não de determinada vitamina. Além disso, foi observado que o processamento alternativo foi mais eficaz que o processamento convencional na manutenção dos teores de todas as vitaminas em estudo.

Palavras-chave: pólen apícola, vitamina C, vitamina E, β -caroteno, desidratação, processamento.

Abstract

Oliveira, K. C. L. S. **Bee pollen characterization and antioxidants vitamins as indicators of the efficiency of dryness process.** 2006. 106 p. Dissertation (Master) Faculty of Pharmaceutical Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2006.

Bee-collected pollen (bee pollen) is highly consumed around the world due its nutritive and therapeutic value. It contains proteins, carbohydrates, lipids, minerals and vitamins of complex B, vitamin C, D, E and totals carotenoids. However there are few literature data correlating nutritional composition with botanical origin and thermal process. The aim of this study was to quantify vitamins C, E and beta-carotene (provitamin A) in fresh and processed samples of bee pollen, correlating them with botanical origin. In addition, to evaluate the effect of drying process in the vitamin content. Ten samples of fresh bee pollen were collected, five in April and five in October of 2005. Samples of fresh bee pollen were dried by conventional method (drying at 42° C) and by an alternative method (drying at 30-35° C). The fresh bee pollen and the processed ones were assayed regarding their vitamin contents (n=30). Vitamin C was quantified by potentiometric titration, vitamin E by HPLC-normal phase and beta-carotene by open column chromatography. The data from botanical characterization of the bee pollen were obtained and correlated to the vitamins content. Vitamin content in fresh samples varied between 13,5 and 42,5 µg/g for vitamin E; 56,3 and 198,9 (µg/g) for β-carotene and 273,9 and 560,3 µg/g for vitamin C. The alternative drying method was more efficient that conventional one in retaining the vitamins. It was also concluded that the botanical origin and collecting season influenced the vitamin contents. Being important factor to predict if bee pollen was source or not of each vitamin.

Key words: bee-pollen, vitamin C, vitamin E, β-carotene, drying process.

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 serem o próprio objeto da polinização, tem grande importância na apicultura: como principal fonte de proteínas, gorduras e minerais para as abelhas e como produto excedente do apiário (WITHERELL, 1975).

O pólen apícola, por sua vez, é o resultado da aglutinação do pólen das flores efetuada pelas abelhas, mediante acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel (KRELL, 1996).

Estima-se que a necessidade média de pólen para o desenvolvimento de uma abelha operária seja de 145 mg. Assim, uma colônia de 80.000 abelhas para desenvolver-se normalmente necessita de aproximadamente 12 kg de pólen, muito embora se observe, na prática, uma quantidade excedente de pólen coletado pelas abelhas melíferas, o que permite apropriação de parte deste, sem causar prejuízos ao desenvolvimento do enxame. O apicultor pode apropriar-se de parte do pólen coletado pelas abelhas e para tal são utilizados equipamentos designados coletores, armadilhas ou caça-pólen, os quais retiram as bolotas presentes nas corbículas antes que as abelhas penetrem na colméia (ALVES *et al.*, 1997a).

O pólen e demais produtos apícolas são comercializados com autorização do Ministério da Agricultura e tem a fiscalização federal comprovada pelo selo do SIF (Serviço de Inspeção Federal). Estes produtos são amplamente consumidos e na maioria das vezes possuem um apelo ao consumidor de serem alimentos saudáveis e naturais e até mesmo de serem complementos nutricionais.

A importância nutricional do pólen para seres humanos é reconhecida por ser uma fonte protéica de elevado valor biológico, apresentando ainda carboidratos, lipídeos e minerais em sua composição. Além disso, possui não só as vitaminas antioxidantes (β -caroteno como pró-vitamina A, vitaminas C e

E) como as do complexo B e vitamina D (MUNITEGUI *et al.*, 1990; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996,).

Alguns autores como Funari, Rocha e Sforcin (2000), Barreto, Rabelo e Beléza (2000), efetuaram análises bromatológicas em amostras de pólen apícola brasileiros, mas a dosagem de vitaminas não foi avaliada. Em trabalho anterior, Almeida-Muradian *et al.* (2005), além da composição química, analisaram vitamina C, carotenóides totais e β -caroteno (pró-vitamina A) em amostras comerciais de pólen apícola. Os autores constataram a ausência de vitamina C e de β -caroteno, sugerindo que a perda destas vitaminas possa ocorrer durante o seu processamento.

Devido à carência de dados nacionais e internacionais, faz-se necessário pesquisar sobre o valor vitamínico do pólen, bem como a associação deste com sua origem botânica, a fim de se agregar valor ao produto e de se otimizar sua produção.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Pólen apícola

2.1.1 – Histórico

Muitas são as citações sobre o uso do pólen como alimento pela Antigüidade, na Índia, na Assíria e em Roma. Com o passar dos séculos, o homem preocupou-se em estudar os vegetais do ponto de vista taxonômico e suas funções como alimento, utilidade doméstica ou medicamento. No século XVII, Grew foi o primeiro cientista a observar e a descrever os grãos de pólen. Em 1604, Adan Zalunaius apresentou seu livro “*Methodos Herbaria*”, onde descreveu as partes das flores e explicou que possuem aparelhos sexuais juntos ou em flores separadas. Na primeira década do século 19, Hugo Mohl, realizou estudos mais aprofundados e descreveu grãos de pólen pertencentes a mais de 200 famílias botânicas. No começo do século 20, Erdtman iniciou as primeiras bases do estudo polínico e em 1927, H. Meinke publicou o “Atlas

Polínico”, que marcou uma etapa importante para as pesquisas (CORNEJO, 1994). Neste mesmo ano foi projetado um dos primeiros coletores de pólen, por Eckert (ALVES *et al.*, 1997a).

Em 1941, Schaefer e Farrar desenvolveram também um tipo de coletor utilizado no ano seguinte, no apiário da Universidade de Minnesota, para se determinar a composição química e o valor nutricional de pólen coletado pelas abelhas (VIVINO, PALMER, 1944).

Nas últimas décadas o interesse pelo consumo de pólen como um suplemento natural tem aumentado muito, principalmente na Europa (Ocidental e Oriental) e nos Estados Unidos, fazendo com que muitos pesquisadores dediquem-se ao seu estudo (EATON e LAW, 2000).

2.1.2 – Definição e importância do pólen para as abelhas

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. 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). Na Figura 1, onde estão apresentados os aparelhos reprodutores da flor, também podemos observar a localização dos grãos de pólen assim como as camadas que os protegem.

FIGURA 1: Descrição do aparelho reprodutor da flor e das camadas do grão de pólen (SALOMÉ, J., SALOMÉ, L., 1998).

Os grãos de pólen, conforme apresentados na Figura 2, 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).

FIGURA 2: Bolotas de pólen com diversas cores

(FONTE: www.healthenlightenment.com/bee-pollen.jpg)

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).

O estímulo para as abelhas operárias adultas coletarem e armazenarem 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).

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 3 (CORNEJO, 1994; MORETI, 1997).

FIGURA 3: Abelha apresentando carga (pólen ou propólis) na corbícula (WINTSON, 1987).

Na Figura 4 pode-se observar a bolota de pólen presa à corbícula da abelha.

FIGURA 4: Abelha com carga de pólen na corbícula. (FONTE: www.funet.fi/pub/sci/bio/life/insecta/hymenoptera/apocrita/apidae/apis/mellifera-2.jpg)

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).

O pólen fornece a maioria dos nutrientes fundamentais para a produção de geléia real, a qual alimenta a abelha-rainha e as larvas das operárias nos primeiros dias de vida. Consiste na fonte de proteínas para a colméia, sendo responsável pelo bom desenvolvimento de glândulas, organismos vitais, tecidos, enfim para o crescimento individual das abelhas e de toda colônia (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996; LINSKENS e JORDE, 1997; VILLANUEVA, *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, que é o gameta masculino dos vegetais superiores (MATA, 1997).

As camadas que envolvem o grão de pólen possuem formas muito variadas (rugosas, lisas, com ou sem ornamentações), que permitem realizar as classificações sistemáticas, diferenciando assim as espécies botânicas (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; CORNEJO, 1994). Deste modo, cada grão de pólen tem sua própria especificidade, principalmente associada à espécie floral e ao cultivar que pertence (COLLIN *et al.*, 1995).

A coleta, a catalogação e a identificação taxonômica de espécies florais visitadas por abelhas de uma determinada região são importantes para os apicultores, para indicar 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 ou erxicata.

Silva *et al.* (1993) durante o período de 1975 a 1985 e Marchini *et al.* (2001), no período de 1994 a 1997 inventariaram as plantas que estavam florescendo e que eram visitadas por abelhas *Apis mellifera* L. em Pindamonhangaba, desenvolvendo desta maneira o herbário apícola da região (de onde foram coletadas as amostras de pólen estudadas neste trabalho).

Posteriormente à confecção da erxicata, foram desenvolvidas a análise polínica das plantas inventariadas, um laminário dos grãos de pólen coletados e um fichário com as fotos das lâminas observadas ao microscópio. Estas fotos foram catalogadas no trabalho de Moreti *et al.* (2002).

2.1.4 - Composição química e valor nutricional do pólen apícola

O pólen apícola consiste numa mistura de grãos derivados de até dezenas de espécies de plantas da localidade. Deste modo, as abelhas tendem a produzir um alimento com o melhor balanço nutricional e diminuem o efeito de algumas toxinas e alcalóides. Porém, isto gera uma variação muito grande nos resultados das determinações da composição química do pólen apícola, devido às diferenças entre as espécies originárias e a variedade da mesma espécie em relação à época de sua coleta (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992).

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 nucléicos e reguladores de crescimento (LOPER, *et al.*, 1980; IANUZZI, 1993; CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996; KRELL, 1996).

Segundo Schmidt e Buchmann (1992), o pólen é rico em vitaminas do complexo B (tiamina, niacina, riboflavina, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina) e carotenos precursores da vitamina A, porém, apresenta quantidade não significativa de vitamina C e das vitaminas lipossolúveis.

Bastos *et al.* (2004), analisaram 14 amostras desidratadas de pólen apícola e constataram uma composição variada de ácidos graxos, sendo que todas as amostras continham os ácidos, oléico, linoléico e araquídico e apenas uma delas não apresentava o ácido palmítico. Os teores de ácidos graxos insaturados variaram de 18,6 a 55,9%, sugerindo que o pólen representa uma boa fonte destes compostos para a dieta.

A recomendação para consumo de pólen é de 5 – 25 g por dia (CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996; BASTOS, *et al.*, 2003).

O valor calórico do pólen apresentado no trabalho de Villanueva *et al.* (2002) foi de 14,69 kcal / 100 g.

Na Tabela 1 está apresentada a comparação entre alguns valores nutricionais do pólen apícola encontrados na literatura.

TABELA 1: Composição química apresentada por alguns autores em diferentes amostras de pólen apícola

COMPONENTE	REFERÊNCIAS					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Umidade (%)	NA	24,0	7,14	8,78	3,98	7,4
Proteínas (%)	23,5	21,9	13,93	21,20	15,78	21,0
Açúcares redutores (%)	6,88	15,9	36,50	NA	NA	NA
Açúcares não redutores (%)	NA	1,0	1,66	NA	NA	NA
Amido (%)	NA	2,9	NA	NA	NA	NA
Açúcares totais (%)	29,82	NA	70,77	NA	37,36	NA
Lipídeos (%)	7,3	5,5	6,73	8,80	3,82	7,0
Cinzas (%)	3,6	3,2	1,72	2,79	2,89	2,4

(1) = NIELSEN, GROMMER e LUNDÉN, 1955;

(2) = HERBERT Jr e SHIMANUKI, 1978;

(3) = VILLANUEVA *et al.*, 2002;

(4) = BASTOS *et al.*, 2003;

(5) = BARRETO, 2004;

(6) = ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2005;

NA = não analisado.

2.1.4.1 - Digestão do pólen apícola

O estudo da digestibilidade do pólen apícola tem sido objeto de estudo de alguns autores, como Bell *et al.* (1983), que compararam, em ratos, a digestibilidade dos aminoácidos de duas espécies de grãos de pólen de *Eucalyptus* comercializados na Austrália com a digestibilidade dos aminoácidos da caseína. Os autores observaram que a digestibilidade para os aminoácidos do pólen foi em média 55,5% e 89% para os aminoácidos da caseína. Schmidt J.e Schmidt P. (1984), observaram 80% de digestibilidade dos aminoácidos do pólen apícola em camundongos. A dificuldade na digestão poderia estar associada à estrutura externa do pólen, que representaria uma barreira significativa para a atuação das enzimas digestivas.

No homem, assim que o pólen atinge o trato digestivo, este começa a se dissolver, intumescer pela ação da água, e a ser ativado enzimaticamente. Os materiais contidos na parede dos grãos de pólen (pigmentos, enzimas) começam a sofrer ação do suco gástrico e em seguida as enzimas digestivas passam a agir sobre os nutrientes. Os aminoácidos, açúcares simples, ácidos graxos, vitaminas e minerais liberados no processo de digestão podem então ser absorvidos, porém o pólen pode também ser absorvido diretamente, visto que consiste em partículas de 5 a 200 μm (LINSKENS e JORDE, 1997).

2.1.5 – 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;

- 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;
- Conhecimento da 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;
- Condições climáticas favoráveis à prática apícola (CORNEJO, 1994).

A instalação do apiário deve ser em local de fácil acesso, onde as colméias sejam distribuídas sem dificultar o manejo. Durante o período de coleta de pólen devem ser feitas revisões periódicas no apiário a fim de se observar a quantidade de quadros com cria aberta ou fechada; a presença e a idade da rainha; a população existente e a suplementação nutricional a base de carboidratos e proteínas (SALOMÉ, J. e SALOMÉ, L., 1998). A suplementação protéica das abelhas tem a finalidade de estimular a postura e a viabilidade dos ovos (ALVES, *et al.* 1997b).

Os apicultores podem fazer uso do pólen excedente coletado pelas abelhas e para isso utilizam equipamentos denominados coletores de pólen (caça-pólen ou armadilhas de pólen), que são adaptados à colméia de modo a interferir da menor maneira possível no trabalho das abelhas. Estes coletores podem ser do tipo frontal, posicionados na frente do alvado (entrada da colméia); do tipo de fundo, substituindo o fundo e o alvado da colméia ou do tipo intermediário, instalado entre o ninho e a melgueira (CORNEJO, 1994; SALOMÉ, J. e SALOMÉ, L., 1998; ALVES *et al.*, 1997). Os coletores podem ser confeccionados com diversos materiais, porém o ideal é utilizar aqueles feitos com plástico ou placas de acrílico perfuradas com espessura de 3 mm e cujos orifícios tenham aproximadamente 5 mm de diâmetro (CORNEJO, 1994), como apresentado na Figura 5. No estudo de Alves *et al.* (1997a), foi demonstrado que os coletores do tipo intermediário apresentaram vantagens na média de quantidades diárias de pólen coletado quando comparadas aos demais coletores.

De acordo com Salomé, J. e Salomé, L., 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, 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. Porém, o aquecimento artificial é o mais utilizado na produção para fins comerciais (COLLIN *et al.*, 1995).

FIGURA 5: (a) e (b) Coletores intermediários; (c) trampa de acrílico perfurada (apiário experimental da APTA – Pindamonhangaba).

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, de acordo com a pesquisa de Barreto (2004), a estimativa da produção brasileira encontra-se

em torno de 200 toneladas por ano. Todavia, existem dois pólos produtivos importantes, a região Sul, tendo Santa Catarina como o principal Estado produtor e o Nordeste, sendo a Bahia o principal produtor.

2.1.6 – Controle de qualidade do pólen apícola

Além do Brasil, poucos países (Suíça e Argentina) assumem legalmente o pólen apícola como um suplemento alimentar e estabelecem padrões e limites de qualidade oficiais. Embora, comercializado em muitos estabelecimentos de alimentos dedicados à prevenção da saúde, o pólen apícola não é considerado como um suplemento pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos (KRELL, 1996).

De acordo com a definição apresentada no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Produtos Apícolas (Instrução Normativa n. 3 de 19 de janeiro de 2001): “Pólen Apícola é 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”. Na Tabela 2 estão descritos os limites preconizados pela legislação brasileira para produção do pólen apícola. (BRASIL, 2001).

A International Honey Commission (IHC) preocupada com o fato de não haver padrão internacional para o pólen apícola, criou um grupo de estudo, para que baseado em padrões nacionais de cada país se proponha um padrão de identidade e qualidade mundial para este produto. O presente trabalho faz parte desta atividade e foi parcialmente apresentado no Congresso Mundial de Apicultura – APIMONDIA, em Dublin (Irlanda) em 2005.

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

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

2.1.7 – Estabilidade do pólen apícola

De acordo com Collin *et al.* (1995), em alguns casos, a temperatura utilizada nos procedimentos de desidratação do pólen apícola tende a alterar as características organolépticas, principalmente aumentando o “flavour” pungente relacionado aos compostos sulfurosos. Os autores testaram três processamentos de desidratação com temperaturas e tempos diferentes e demonstraram que a temperatura de 30° C por vinte horas diminuiu a atividade de água sem modificar o conteúdo dos aminoácidos livres além de evitar a síntese de “off-flavours”. Os processamentos, cujas temperaturas eram de 40 e 60° C, propiciaram a formação de dimetil sulfeto (principalmente

em grãos de pólen ricos em S-metilmetionina) e de muitos aldeídos de Strecker.

O pólen apícola, assim como outros alimentos ricos em proteínas, podem perder o valor nutricional rapidamente se armazenados 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 (KRELL, 1996). 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).

O conteúdo de vitaminas do pólen e de demais alimentos pode sofrer alteração com o processamento e a estocagem (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992; PENTEADO, 2003).

2.1.8 – Funções do pólen apícola

Ao longo dos anos, o pólen tem sido utilizado internacionalmente devido a seus efeitos benéficos à saúde. Um dos efeitos atribuídos ao pólen é sua habilidade de reduzir os danos causados pelo envelhecimento, de melhorar a saúde e de aumentar a energia vital (CAMPOS, CUNHA e MARKHAM, 1996). Os benefícios, cientificamente comprovados associados ao consumo de pólen apícola, se relacionam a 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 mediante 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 performance 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).

Liebelt, Lyle e Walker (1994) compararam o desenvolvimento de camundongos tratados com dieta a base de pólen e com dieta controle. Os autores observaram que o pólen apícola contém todos elementos nutricionalmente necessários para a manutenção de camundongos em laboratório em condições saudáveis e que podem suprir as necessidades nutricionais em humanos.

Considerando sua composição nutricional e de acordo com estudos não científicos, o pólen apícola pode ser utilizado como alimento em dietas para seres humanos propiciando sensação de bem estar e contribuindo para o balanço funcional e harmonioso do organismo (CRANE, 1983).

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 tem 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).

2.1.9 - Efeitos adversos da ingestão do pólen apícola

Entre as reações adversas reportadas pelos consumidores de pólen apícola estão o desconforto gastrointestinal acompanhado de dor

abdominal e diarreia. Excepcionalmente, podem ocorrer dores de cabeça, fadiga ou ataques de asma (SCHMIDT e BUCHMANN, 1992).

A associação entre as reações respiratórias alérgicas provocadas pelo pólen com possíveis reações decorrentes da sua ingestão tem sido uma discussão controversa, visto que estudos médicos têm demonstrado a ocorrência de reações anafiláticas menores ou moderadas, subseqüentes a ingestão do pólen em alguns pacientes devido ao efeito da dessensibilização (COHEN *et al.*, 1979; MANSFIELD e GOLDSTEIN, 1981)

2.2 – Vitaminas

As vitaminas são micronutrientes essenciais que contribuem para o crescimento normal e a manutenção da saúde (BIANCHINI e PENTEADO, 1999). De acordo com Gregory III (1996), as vitaminas exercem, *in vivo*, funções de coenzimas ou seus precursores; de fatores envolvidos na regulação gênica ou em funções especiais, relacionadas à visão (vitamina A), a reações específicas de carboxilação (vitamina K) e em várias reações de hidroxilação (vitamina C).

Além disso, as vitaminas podem apresentar função antioxidante, como as vitaminas C, E e o β -caroteno (pró-vitamina A), que são capazes de estabilizar os radicais livres, responsáveis por muitas doenças degenerativas características do envelhecimento, que tanto podem ser provenientes do meio externo ou como resultantes naturais do metabolismo humano (ELLIOT, 1999).

2.2.1 – Carotenóides e o β -caroteno

2.2.1.1 – Introdução

Os carotenóides são pigmentos naturais encontrados em frutas, verduras, raízes, aves, certos peixes, crustáceos e alguns microrganismos. Dentre os carotenóides conhecidos, alguns desempenham atividade pró-

vitamínica A, podendo se transformar em vitamina A no organismo animal; além disso, têm despertado o interesse dos cientistas devido a diversas outras funções e ações (ALMEIDA e PENTEADO, 1987b; COSTA e PENTEADO, 1996; SILVA e MERCADANTE, 2002).

Estes pigmentos naturais ocorrem em tecidos fotossintéticos e também em tecidos não fotossintéticos. A maioria dos carotenóides apresenta cores muito vivas, variando do amarelo ao vermelho, devido à presença de um segmento cromóforo em sua molécula constituído, principal ou inteiramente, de cadeia de duplas ligações conjugadas (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003a).

Os carotenóides são pigmentos sintetizados por microrganismos fotossintéticos e plantas, porém não são sintetizados pelo homem, tendo então que ser obtidos pela dieta (KRINSKY, MATHEWS-ROTH e TAYLOR, 1989; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Existem mais de 600 carotenóides conhecidos de ocorrência natural, entre estes mais de 50 são consumidos com a dieta. Porém, apenas cerca de 10% podem ser considerados precursores da vitamina A, sendo o mais importante o β -caroteno-*todo-trans* (SANT'ANNA e PENTEADO, 1996; DUTRA DE OLIVEIRA, MARCHINI, 1998).

A vitamina A contida nos alimentos é expressa em termos de equivalentes de retinol, que compreende a soma das vitaminas provenientes do retinol pré-formado e dos carotenóides. Devido à baixa absorção dos carotenos e a clivagem incompleta para formação de retinol, considera-se que 12 μg de β -caroteno sejam equivalentes a 1 μg de retinol ou equivalente de retinol (RE) ou ainda, 1 atividade de equivalente de retinol (RAE) (DRI, 2000; COZZOLINO, 2005).

2.2.1.2 - Estrutura dos carotenóides

Quimicamente, os carotenóides são divididos em dois grupos: os hidrocarbonetos, representados pelos carotenos, e os derivados oxigenados,

constituídos pelas xantofilas ou oxicarotenóides (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003a).

A estrutura básica dos carotenóides é simétrica, linear, contendo 40 carbonos distribuídos em 8 unidades isoprênicas (5 carbonos) e ligadas de tal forma que o arranjo das unidades é reversa no centro da molécula. Este esqueleto básico pode ser modificado de várias maneiras como a hidrogenação, ciclização, migração das duplas ligações, isomerização, introdução de oxigênio, entre outras, resultando em diversas estruturas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Os carotenóides que apresentam pelo menos um anel β -ionona que não esteja hidroxilado (não substituído), são considerados precursores da vitamina A, logo, após a quebra da molécula de β -caroteno ao meio, formam-se duas moléculas de vitamina A (CARVALHO, C., CARVALHO, P. e COLLINS, 1995; COSTA e PENTEADO, 1996). Na Figura 6 está demonstrada a estrutura do β -caroteno com destaque para os dois anéis β -ionona e da vitamina A, representada na forma de retinol.

FIGURA 6: (A) β -caroteno, (B) vitamina A.

2.2.1.3 - Funções dos carotenóides

Além da função pró-vitâmica A de alguns carotenóides, estes compostos também exercem outras ações, tais como, prevenção da formação de catarata, redução da degeneração macular relacionada ao envelhecimento e redução do risco de doenças coronarianas (SILVA e MERCADANTE, 2002). Apresentam também, atividade antioxidante por serem capazes de capturar o oxigênio singlet e outras espécies reativas do oxigênio. Numerosos estudos epidemiológicos sugerem uma relação inversa entre a ingestão de carotenos e as doenças degenerativas (PASSOTO, PENTEADO e MANCINI-FILHO, 1994; PALACE *et al.*, 1999; KRINSKY, 2001; EL-ALGAMEY *et al.*, 2004; AMAN *et al.*, 2004). Outra função dos carotenóides na dieta é a prevenção a alguns tipos de câncer como demonstrado por Moreno *et al.* (1991,1995), Paiva e Russel (1999) e Nishino *et al.* (1999).

Em virtude da carência de vitamina A representar um sério problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, dietas adequadas com alimentos pró-vitamínicos A são de grande valia, com a vantagem de serem convertidos apenas quando o organismo necessita, evitando assim o potencial tóxico de uma hipervitaminose. Por outro lado, o foco dos países desenvolvidos direciona-se para as outras funções dos carotenóides frente às doenças cardiovasculares e o câncer na tentativa de promover a saúde (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; TAI, CHEN, 2000).

2.2.1.4 - Estabilidade dos carotenóides

Os carotenóides, por apresentarem em sua molécula um sistema de duplas ligações conjugadas, são especialmente sensíveis à luz, calor, oxigênio, presença de metais, ácidos e em alguns casos a álcalis. A exposição à luz, principalmente luz solar direta ou raios ultravioleta, pode provocar fotoisomerização cis-trans e até a foto-destruição dos carotenóides (ALMEIDA, PENTEADO, 1987a).

Com o processamento dos alimentos, os carotenóides neles contidos, podem sofrer modificações estruturais devido ao seu alto grau de insaturação e a sua susceptibilidade a reações oxidativas e de isomerização (BIANCHINI e PENTEADO, 1998; ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2003a).

Muitos trabalhos relatam a sensibilidade dos carotenóides contidos nos alimentos frente a diversos tipos de processamento, como apresentado na Tabela 3. Durante o cozimento convencional (água fervente) ou no cozimento em forno de microondas, pode ocorrer uma queda no teor dos carotenóides, principalmente, representados pelo β -caroteno, que é o principal carotenóide pró-vitamínico A.

TABELA 3: Comparação entre os resultados observados nos teores de β -caroteno após o processamento de diferentes alimentos.

Alimento	Processamento	Perda vitamínica
Mandioquinha (raiz)	Cozimento convencional de 10 min	30% do teor de β -caroteno (a)
Mandioca (raiz)	Cozimento convencional de 30 min;	20 a 55% da atividade pró-vitamínica (b)
Batata doce (raiz)	Cozimento convencional de 10 min	29% da atividade pró-vitamínica (c)
Repolho (folhas)	Cozimento convencional de 10 min;	45% do teor de β -caroteno (d)
Espinafre (folhas)	Cozimento convencional 10 min	16% e 37 % dos teores de β -caroteno, respectivamente (e)
Couve-flor (folhas)		
Espinafre (folhas)	Cozimento em forno de microondas	18% e 57 % dos teores de β -caroteno, respectivamente (e)
Couve-flor (folhas)	(potência máxima por 6 min)	
Beterraba (folhas)	Cozimento convencional (10 min) e em forno de microondas (potência máxima por 6 min).	58% e de 18% nos teores de β -caroteno, respectivamente (f).

Fonte: (a) ALMEIDA e PENTEADO, 1987b; (b) PENTEADO e ALMEIDA, 1988; (c) ALMEIDA e PENTEADO, 1988; (d) ALMEIDA-MURADIAN, FIORINI e PENTEADO, 1995; (e) SANTA'ANNA e PENTEADO, 1996; (f) ALMEIDA-MURADIAN, MAGRI e RIOS, 1997.

Nos trabalhos de Almeida-Muradian e Fiorini (1996), assim como de Almeida-Muradian, Popp e Farias (1997) não foram verificadas perdas estatisticamente significativas nos teores de β -caroteno, após o cozimento convencional ou após o processamento em forno microondas em vagens macarrão e manteiga e em cenouras.

Em 1993, Trigueiro e Penteado observaram perda no teor de β -caroteno de 12,7% em amostras de óleo de dendê bruto e de 18% em óleo de dendê refinado, durante a estocagem deste produto à 26° C por 90 dias.

2.2.2 - Vitamina C

2.2.2.1 – Introdução

A vitamina C foi por muito tempo conhecida como nutriente essencial na prevenção do escorbuto (doença causada por sua deficiência), porém sua importância cresceu muito ao longo do tempo, devido à descoberta do seu potencial na proteção contra inúmeras doenças crônicas, principalmente em indivíduos idosos (LEVINE *et al.*, 1996; BASU e DICKERSON, 1996; BENDER, D. e BENDER, A., 1997).

Trata-se de uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada por plantas e por quase todos os animais, porém não pode ser sintetizada por humanos, tendo que ser obtida através da dieta, principalmente de frutas e vegetais (GIMÉNEZ *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2003).

2.2.2.2 - Estrutura da vitamina C

O termo vitamina C é utilizado para descrever genericamente todos os compostos que apresentam atividade biológica do ácido ascórbico. O ácido L-ascórbico é o principal composto natural com a atividade da vitamina C é o quimicamente denominado de L-treo-2hexenona-1,4-lactona (BALL, 1994; ROJAS e GERSCHENSON, 2001; GIMÉNEZ *et al.*, 2002).

A falta de vitamina C por um período prolongado pode ocasionar o escorbuto, esta falta pode ocorrer sob condições fisiológicas, pois o ácido ascórbico é reversivelmente oxidado a ácido dehidroascórbico, que por sua vez, é irreversivelmente hidrolisado para a forma inativa da vitamina, o ácido dicetoglucônico, como demonstrado na Figura 7 (RIOS e PENTEADO, 2003b).

FIGURA 7: Reação de decomposição do ácido ascórbico (RIOS e PENTEADO, 2003b).

2.2.2.3 - Funções da vitamina C

O ácido ascórbico e o ácido dehidroascórbico compreendem as duas formas biologicamente ativas da vitamina C e têm atividade antiescorbútica equivalente (GOKMEN *et al.*, 2000).

Sabe-se que o ácido ascórbico é o mais versátil e efetivo antioxidante hidrossolúvel da dieta. Pode prontamente doar elétrons para uma variedade de radicais livres e facilmente ser regenerado pelo recebimento de elétrons dos redutores glutatona, NADP ou NADPH. O ácido ascórbico protege o organismo da peroxidação da lipoproteína de baixa densidade LDL e dos lipídeos plasmáticos, por eliminar radicais peroxil da fase aquosa antes que possam iniciar a peroxidação e por regenerar a forma ativa da vitamina E, que é um importante antioxidante lipofílico (JACOB, 1999; ROJAS e GERSCHENSON, 2001).

Concentrações altas de ácido asórbico no tecido ocular promovem proteção antioxidante contra radicais livres gerados fotoliticamente em vários tecidos e fluidos oculares, incluindo o cristalino, a córnea, o humor vítreo e a retina (GIMÉNEZ *et al.*, 2002).

Como um antioxidante intracelular, o ácido ascórbico parece oferecer importante proteção ao DNA contra danos oxidativos associados a mutagênese e a iniciação da carcinogênese (JACOB, 1999).

O ácido ascórbico atua na produção e manutenção do colágeno, participando da hidroxilação da prolina, formando hidroxiprolina. É um composto essencial na oxidação da fenilalanina e da tirosina e para a conversão de folacina em ácido tetra-hidrofólico (RIOS, PENTEADO, 2003b).

O ascorbato, nome também dado ao ácido ascórbico, pode atuar como cofator ou co-substrato de diferentes enzimas. Está envolvido na hidroxilação de prolina e lisina, para biossíntese de colágeno; na rota biossintética da carnitina, a qual é utilizada pela mitocôndria para transferência de elétrons na transmembrana na síntese de ATP; na síntese da norepinefrina, a partir da dopamina e no metabolismo enzimático da tirosina (LEVINE *et al.*, 1996).

A vitamina C é um composto vital para a resposta imune e também possui ação não enzimática sobre a absorção e metabolismo do ferro (CONNEL *et al.*, 2001; BASU, DICKERSON, 1996). Além disso, está envolvida com a biossíntese de corticóides e catecolaminas e na formação de ossos e do sangue (ASSUNÇÃO, MERCADANTE, 2003).

Recentes evidências sugerem que a disfunção endotelial, um indicador de risco para a doença da aterosclerose vascular, atue sobre a patogênese da diabetes aterosclerótica. A disfunção endotelial pode estar relacionada com o aumento do stress oxidativo observado em pacientes diabéticos e há consideráveis evidências que antioxidantes, como a vitamina C, E, assim como a glutathione, por redução do stress oxidativo, previnem o desenvolvimento de aterosclerose (PRICE, K., PRINCE, C. e REYNOLDS, 2001).

Na indústria, o ácido ascórbico é freqüentemente usado como aditivo no processamento de alimentos, devido a sua atividade antioxidante

(GREGORY III, 1996; CASTELLINI, BOSCO e BERNARDINI, 2000; DJENANE *et al.*, 2002).

2.2.2.4 - Estabilidade da vitamina C

A vitamina C é um composto sensível à luz, aquecimento e ao ar, os quais estimulam sua oxidação (ANTONELLI *et al.*, 2002). Também é susceptível a oxidação química e enzimática que ocorrem durante o processamento, cozimento e estocagem dos alimentos; por esse motivo, apresenta-se nas dietas sob a forma de ácido dehidroascórbico. Aquecimentos rápidos, como o branqueamento ou a pasteurização, previnem a ação das enzimas sobre a oxidação do ácido ascórbico, após o processamento e estocagem dos alimentos (RIOS e PENTEADO, 2003b).

De acordo com Zerdin, Rooney e Vermuë (2003), o ácido ascórbico, contido em sucos de laranja, é afetado pela temperatura, conteúdo de sal ou açúcar, pH, oxigênio, enzimas, catalisadores metálicos, microrganismos e vedação do recipiente. Os autores comprovaram que no produto (suco de laranja) embalado em filmes contendo compostos capturadores de oxigênio, a perda de vitamina C era menor.

Sanchez-Moreno *et al.* (2003) constataram a perda de 8,1% e 10,3% de vitamina C em sucos de laranja submetidos ao processamento de 400MPa/40º/1min e 350MPa/30ºC/2,5min respectivamente, porém após o procedimento as amostras foram mantidas por um período de 10 dias sob temperatura de 4º C e não apresentaram perdas significativas da vitamina.

A possível perda de vitamina C em suplementos dietéticos foi estudada por Gimenez *et al.* (2002), que observaram decréscimo de até 22% nos teores desta vitamina após um tempo de estocagem de 30 dias a 40 - 42º C.

Zhang e Hamauzu (2004), observaram perda progressiva no teor de vitamina C em brócolos, que variaram de 31,6% a 72%, durante o cozimento convencional (água fervente) em tempos de exposição de 30 e 300 seg, respectivamente.

Com relação à radiação ionizante, que se trata de um processamento físico a que os alimentos são submetidos com a finalidade de reduzir microrganismos deteriorantes e patogênicos e inibir seu amadurecimento ou brotamento, a vitamina C é uma das mais sensíveis, porém doses de 1 a 2 kGy não ocasionaram perda significativa desta vitamina em cebolas, alho, frutas cítricas e batatas (KILCAST, 1994).

2.2.3 - Vitamina E

2.2.3.1 – Introdução

Vitamina E é um termo genérico utilizado para designar 8 compostos lipossolúveis naturais, sendo quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis (vitâmeros) que apresentam, em diferentes graus, a mesma atividade biológica do α - tocoferol, ou seja, possuem atividade vitamínica (MACHLIN, 1991; BALL, 1998; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

Todos os vitâmeros da vitamina E são sintetizados pelas plantas e encontram-se amplamente distribuídos na natureza, sendo o α -tocoferol o de maior atividade biológica e o mais encontrado na maioria dos alimentos de origem animal. Os tocoferóis ocorrem substancialmente em óleos de sementes vegetais como, girassol, algodão, dendê, amendoim, milho e soja (BALL, 1998; MACHLIN, 1991; BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003). O suprimento de vitamina E necessária aos seres humanos deve ser adquirido na dieta, visto que nosso organismo não tem capacidade de sintetizar a vitamina (ZHAO *et al.*, 2004).

Recentes estudos consideram a vitamina E essencial para animais e seres humanos tendo um importante papel antioxidante. Há estudos que indicam que a vitamina E atua na resposta imune, prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, catarata e mal de Parkinson (HORWITT, 1974).

2.2.3.2 - Estrutura da vitamina E

Oito vitâmeros da vitamina E, tocoferóis e tocotrienóis, ocorrem naturalmente, estes compostos são designados por letras gregas (α , β , γ e δ) conforme a posição do grupo metil substituinte no anel 6-cromanol. Na Figura 8 estão demonstrados os tocoferóis, que apresentam cadeia lateral saturada e os tocotrienóis que apresentam cadeia lateral insaturada (BALL, 1998 e MACHLIN, 1991).

Tocopherol

Tocotrienol

	R ₁	R ₂
α -Tocotrienol/ Tocopherol	CH ₃	CH ₃
β - Tocotrienol/Tocopherol	CH ₃	H
γ - Tocotrienol/Tocopherol	H	CH ₃
δ - Tocotrienol/Tocopherol	H	H

FIGURA 8: Isômeros da vitamina E (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

2.2.3.3 - Funções da vitamina E

Todos os tocoferóis e tocotrienóis, quando não esterificados, têm a capacidade de agir como antioxidantes; eles interferem na formação de cadeias de radicais livres por doarem o hidrogênio fenólico e um elétron. Estes compostos agem principalmente, na proteção dos ácidos graxos polinsaturados (PUFA) presentes nas membranas biológicas contra a oxidação pelos hidroperóxidos *in vivo*. Tocoferóis são constituintes naturais de membranas biológicas e desta maneira contribuem para a estabilidade das mesmas através de seu potencial antioxidante. (MACHLIN, 1991; GREGORY III, 1996; BALL, 1998; MIQUEL *et al.*, 2004).

O α -tocoferol é o antioxidante lipossolúvel mais abundante nos tecidos, plasma e colesterol LDL e juntamente com as outras formas da vitamina E, age como a primeira linha de defesa contra peroxidação lipídica do organismo (MEYDANI, 1995; PRESOTO, RIOS e ALMEIDA-MURADIAN, 2000).

Recentes estudos têm demonstrado que os tocoferóis apresentam capacidade de reduzir riscos de muitas doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiovasculares (MEYDANI, 1995; KURILICH, JUVIK, 1999). Berman e Brodaty (2004), relatam que a vitamina E tem sido utilizada na prevenção e tratamento da doença de Alzheimer e em outras doenças neurológicas. Munteanu, Zingg e Azzi (2004), apresentam em seu trabalho de revisão inúmeros estudos epidemiológicos realizados sobre a vitamina E e muitos deles demonstram que ela previne a aterosclerose, por diminuir a oxidação do colesterol LDL, impedindo o primeiro passo para o início da doença.

A presença de tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais confere estabilidade estes alimentos mediante a oxidação lipídica (CASTELLINI, BOSCO, BERNARDINI, 2000).

2.2.3.4 - Estabilidade da vitamina E

Os compostos genericamente chamados de vitamina E apresentam estabilidade razoavelmente boa na ausência de oxigênio e lipídeos oxidáveis e o processamento anaeróbico de alimentos tem pouco efeito sobre sua estabilidade (GREGORY III, 1996). Entretanto, a estabilidade dos tocoferóis pode ser afetada pela luz, oxigênio, temperatura, conteúdo de água dos alimentos e pequenas quantidades de metais de transição (MIQUEL *et al.*, 2004).

Bianchini e Penteado (1999), observaram, na análise do α -tocoferol em leites em pó, produtos de degradação, provavelmente devido à oxidação do mesmo. As altas temperaturas aplicadas na obtenção dos leites em pó juntamente com o valor da atividade de água podem ter degradado a vitamina E.

Albalá-Hurtado *et al.* (2000), observaram que os teores de vitamina E se mantiveram estáveis durante um período de estocagem de 12 meses em temperaturas de 20, 30 e 37° C em fórmulas infantis líquidas ou em pó, a base de leite.

Entre as vitaminas lipossolúveis, a vitamina E é a mais sensível à radiação ionizante e as perdas nos teores desta vitamina são influenciados pela presença de oxigênio (KILCAST, 1994). Rios e Penteado (2003a), relataram que diante da dose de radiação recomendada para se evitar o brotamento do alho (75 Gy), não foi observada a perda da vitamina E, isto só ocorreu com aplicação de doses de 200 e 250 Gy.

3 – OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- Obter dados analíticos nacionais sobre o valor vitamínico de pólen apícola, a fim de agregar valor a este produto, uma vez que os dados de literatura são escassos e na maioria das vezes provenientes de outros países;
- Com base na avaliação florística do local, caracterizar o pólen apícola produzido em diferentes dias de coleta por colméias de abelhas africanizadas, considerando-se que ocorrem grandes variações na florada durante o período de produção.
- Correlacionar o conteúdo de vitaminas encontrado nas amostras com a origem botânica do pólen;
- Avaliar o efeito de dois tipos de processos de desidratação do pólen apícola nos teores das vitaminas antioxidantes (β -caroteno como pró-vitamina A, vitamina C e E) considerando-se que estas vitaminas podem ser degradadas durante esses processamentos.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Materiais

4.1.1 – Obtenção das amostras

As amostras de pólen apícola foram obtidas junto ao apiário experimental do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba – PRDTA – VP, localizado na cidade de Pindamonhangaba – SP, órgão pertencente à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA. Compreendem amostras provenientes das floradas de outubro de 2004 e de abril e outubro de 2005.

4.1.2 – Manejo das colméias

A escolha do período de coleta das amostras de pólen apícola para desenvolvimento do presente trabalho foi baseada no estudo realizado por Silva *et al.* (1995), que observaram durante o período de 1968 a 1987 o fluxo nectarífero da região de Pindamonhangaba com a finalidade de se estabelecer um calendário apícola, que orientasse os apicultores na otimização da produção de produtos apícolas e conseqüentemente no melhor período para coleta de pólen (entressafra da produção de mel).

Foram manejadas e mantidas em condições de produção de pólen 06 colméias do tipo Langsthoth de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). As colméias foram adaptadas com coletores do tipo intermediário e trampa caça-pólen constituída de chapa de acrílico com 3 mm de espessura e orifícios circulares com diâmetro de 4,3 a 4,5 mm, conforme indicação de Alves *et al.* (1997a) e apresentado na Figura 9.

Paralelamente, cerca de 30 colméias de apoio foram utilizadas para manutenção das condições ideais de cria, a fim de se estimular a coleta de pólen no campo.

Semanalmente, as colméias foram revisadas de acordo com alguns parâmetros, tais como: população, quantidade de quadros com cria,

possibilidade de entrada de pólen, presença da rainha e a utilização do suplemento protéico a base de farinha de soja desengordurada como citado por Alves *et al.* (1997b) e energético (xarope de açúcar a 60%).

FIGURA 9: Colméia, ninho e melgueira (apiário experimental APTA – Pindamonhangaba).

4.1.3 – Amostragem

Durante o mês de outubro de 2004 e em intervalos de três dias foram coletadas amostras de pólen apícola de cada colméia experimental. Nos dias de coleta, a quantidade de pólen de todas colméias foi misturada e assim obtidas amostras compostas. Ao término de 30 dias foram somadas 10 amostras compostas chamadas de lotes, cada um contendo em média 350 g de pólen apícola fresco. O mesmo procedimento foi realizado em abril e outubro de 2005, porém durante 15 dias, onde se obteve cinco lotes de pólen apícola fresco.

4.1.4 – Preparo das amostras

Os lotes de pólen apícola fresco foram divididos em três porções: a primeira porção foi analisada *in natura*, a segunda e a terceira foram desidratadas por dois processamentos diferentes e em seguida foram submetidas à determinação de umidade e das três vitaminas antioxidantes. O pólen apícola fresco foi mantido em sacos plásticos vedados e o pólen apícola processado, em frascos de vidro hermeticamente fechados. Todas as amostras de pólen foram mantidas congeladas até o momento das análises.

4.2 – Reagentes

Os padrões de α -tocoferol, β -caroteno e ácido ascórbico foram comercializados pela Sigma Chemical CO, St. Louis, USA. Os solventes utilizados nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram todos de grau HPLC e os demais reagentes, de uso comum em laboratório, foram todos de grau analítico.

4.3 – Métodos

4.3.1 - Desidratação

A desidratação é um dos métodos utilizados para conservação do pólen apícola e foi realizada por dois tipos diferentes de processamento. A diferença entre eles relaciona-se ao funcionamento dos aparelhos utilizados: no processamento convencional utilizou-se uma estufa de desidratação à 42 °C e no processamento alternativo, um desumidificador à temperatura de 30 à 35° C.

4.3.1.1 – Obtenção do pólen apícola pelo processamento convencional

O processamento convencional baseia-se na desidratação das amostras utilizando estufa com circulação de ar em sistema aberto, cuja temperatura deve variar entre 40 e 42 ° C. O equipamento utilizado foi uma estufa de pólen da marca Ballardin encontrada no comércio e ilustrada na Figura 10b.

Os dez lotes coletados em outubro de 2004 foram desidratados logo após o término de todas as coletas (novembro), em 2 etapas, ou seja, cinco lotes de cada vez, que foram distribuídos alternadamente entre as dez bandejas que a estufa Ballardin possui. Os cinco lotes coletados em abril e outubro de 2005 foram processados logo após o término de todas as coletas e após a análise das amostras frescas em apenas uma etapa. O tempo de desidratação variou conforme a umidade das amostras e as condições meteorológicas do dia do processamento. O critério utilizado para se determinar o término do processamento foi através da avaliação manual das amostras, comprimindo-as entre os dedos, simulando o que é feito pelos apicultores.

(a)

(b)

FIGURA 10: (a) equipamento Apilani; (b) equipamento Ballardin.

4.3.1.2 – Obtenção do pólen apícola pelo processamento alternativo

O equipamento utilizado no processamento alternativo foi um desumidificador de pólen que consiste num sistema de circulação de ar fechado, com umidade relativa em torno de 0 % e temperatura variando entre 30 e 35 ° C.

Na Figura 10a está ilustrado o desumidificador utilizado, da marca Apilani, tratando-se de um protótipo.

Os dez lotes coletados em outubro de 2004 seriam colocados no desumidificador em duas etapas, porém apenas cinco lotes foram processados, (em novembro), pois o aparelho apresentou falhas no controle da temperatura durante o primeiro processamento (picos elevados de temperatura). Os cinco lotes coletados em abril e outubro de 2005 foram processados logo após análise das amostras de pólen frescas, em apenas uma etapa. Os critérios que determinaram o tempo de desidratação e o término do processo foram os mesmos discutidos no processamento convencional.

As principais diferenças entre os dois equipamentos utilizados na desidratação das amostras estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4: Comparação dos parâmetros de funcionamento entre os equipamentos utilizados na desidratação das amostras de pólen apícola.

Parâmetros	Equipamentos	
	Apilani (alternativo)	Ballardin (convencional)
Tipo	Desumidificador	Estufa
Sistema de circulação de ar	Fechado	Aberto
Temperatura	30 - 35° C	40 – 42 ° C
Umidade Relativa do ar (UR)	~ 0 %	Ambiente
Número de prateleiras	10	10

4.3.2 – Determinação da umidade

O método utilizado para se determinar umidade das amostras foi o gravimétrico utilizando balança eletrônica de precisão Micronal (B160), adaptada com secador infravermelho Metler Toledo (LP16), conforme indicado por Serra-Bonvehi e Casanova (1987), assim como Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian (2002).

As amostras foram primeiramente maceradas em almofariz e cerca de um grama destas foi submetido à temperatura de 85 °C na balança de infravermelho, conforme descrito por Comejo (1994). Foram realizadas análises em triplicata.

4.3.3 – Testes de metodologia para determinação do β -caroteno e da vitamina E

Inicialmente, para determinação das vitaminas lipossolúveis (β -caroteno, como pró-vitamina A e vitamina E) foram testadas metodologias de análise simultânea dessas duas vitaminas, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em todas elas foi utilizada a coluna C18 Vydac 201TP54 250 x 4,6 mm de 300 Å com partículas de 5µm; o método isocrático e os detectores de UV-Vis e fluorescência em série, cujos comprimentos de ondas foram estabelecidos para 452 nm e 295nm de excitação e 330 nm de emissão, respectivamente. As diferenças de parâmetros entre as metodologias estão relacionadas à fase móvel utilizada em cada uma delas e que estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Descrição das diferentes fases móveis testadas na análise simultânea da vitamina E (α -tocoferol) e do β -caroteno (como pró-vitamina A).

<i>Fase móvel</i>	<i>Referência</i>
ACN: DCM:MeOH (70:20:10)	ALMEIDA-MURADIAN, RIOS, SASAKI, 1998.
MeOH:DCM:água (79:15:6)	PRESOTO, RIOS, ALMEIDA-MURADIAN, 2000.
ACN:MeOH: água (88:9:3)	BIANCHINI, PENTEADO, 1999.
ACN:MeOH:CHCl ₃ (47:47:6)	RIOS, 2001.
MeOH:THF (95:5)	LANE <i>et al.</i> , 1997 .
ACN (acetonitrila); DCM (diclorometano); MeOH (metanol); CHCl ₃ (clorofórmio); THF (tetrahidrofurano).	

Após a avaliação dos resultados obtidos, optou-se pela determinação da vitamina E e do β -caroteno separadamente, conforme descrição nos itens 4.3.4 e 4.3.5 e discussão no item 5.3.

4.3.4 – Determinação de vitamina E (α -tocoferol)

O método utilizado para a determinação de vitamina E em pólen apícola foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Presoto, Rios e Almeida-Muradian (2000).

4.3.4.1 – Extração

Inicialmente, as amostras foram submetidas à extração exaustiva com acetona fria, utilizando um agitador mecânico (Turrax). Em seguida, o material foi submetido à filtração a vácuo em filtro de vidro sinterizado e o filtrado foi transferido para funil de separação contendo éter de petróleo (P.E. 30° - 60 °C). A solução foi lavada, pelo menos cinco vezes, com água destilada para completa remoção da acetona. O extrato etéreo foi recolhido, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado em evaporador rotatório a vácuo (temperatura aproximada de 35° C). O resíduo obtido, contendo α -tocoferol, foi totalmente evaporado em atmosfera de nitrogênio,

ressuspendido em 5 mL da fase móvel, filtrado em membrana de 0,45 µm e injetado no cromatógrafo.

4.3.4.2 – Condições cromatográficas

Foram utilizados um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (CLASS-M10A) composto por um sistema de três bombas (LC-10ADVP), um injetor automático (SIL-10ADVP) e um detector de fluorescência (RF-10AXL), programado para 295 nm de excitação e 330 nm de emissão. A separação foi feita em coluna de sílica Shim-pack CLC-Sil (M) 25 cm utilizando fase móvel, previamente filtrada e degaseificada, composta de hexano e álcool isopropílico (99:1) com fluxo de 2,0 mL/min. O α -tocoferol foi identificado por comparação do tempo de retenção do padrão sintético e a quantificação foi realizada através de padronização externa, por comparação das áreas dos picos de amostra e do padrão. Foram utilizados 5 (cinco) gramas de amostra e as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.4.3 – Variação da linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa de trabalho, onde se inserem as respostas das amostras (RIBANI *et al.*, 2004).

Para a determinação da linearidade do método uma série de cinco soluções com 5 níveis de concentrações diferentes de padrão (5,8 a 29 µg/mL) foi preparada em triplicata e injetada três vezes. Com os valores das áreas dos picos e das concentrações foi desenvolvida a análise de regressão linear.

4.3.4.4 – 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).

Para demonstrar a exatidão do método foi realizado um estudo de recuperação, ou seja, foi feita adição de uma quantidade conhecida de padrão (25 e 50% acima da quantidade detectada na amostra) a uma das amostras, cujo teor de vitaminas já havia sido determinado anteriormente. Esta amostra foi submetida ao mesmo processo de extração para determinação da vitamina E e após os resultados obtidos nesta análise foi realizado o cálculo de recuperação.

4.3.4.5 – Precisão – Teste de repetitividade

O parâmetro de precisão expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004).

A precisão da metodologia foi demonstrada através do estudo de repetitividade, onde uma mesma amostra foi analisada 6 vezes. Dos resultados obtidos foi observado a adequação dos limites de desvio-padrão e coeficiente de variação.

4.3.5 -Determinação dos carotenóides totais, do β -caroteno e do valor pró-vitamínico A

O método utilizado para a determinação de β -caroteno no pólen apícola foi a cromatografia em coluna aberta (CCA), conforme descrito por Rodriguez (1976), Almeida e Penteado (1988) e Almeida-Muradian, *et al.* (2005).

4.3.5.1 – Extração

O método consistiu em, inicialmente, submeter as amostras ao procedimento de extração e lavagem idêntico ao da vitamina E. Porém, antes da evaporação, o extrato etéreo foi transferido para balão volumétrico e foi realizada a leitura das absorbâncias das soluções dos carotenóides totais, utilizando um espectrofotômetro duplo feixe HITACHI (U34-10) ajustado à 450 nm. Em seguida, o extrato etéreo foi evaporado em evaporador rotatório a vácuo (temperatura aproximada de 35° C) e o resíduo foi submetido à

4.3.5.2 – Condições cromatográficas (CCA)

O resíduo obtido na evaporação, contendo os carotenóides totais, foi, então transferido para uma coluna de vidro 20 x 2 cm, previamente empacotada com a fase estacionária (MgO : Hyflosupercel na proporção de 1 : 2) com auxílio de pequenas porções de éter de petróleo. Como fase móvel utilizou-se éter de petróleo puro ou um gradiente de acetona em éter de petróleo, conforme necessário. Após a separação dos carotenóides em bandas na coluna aberta, a porção contendo o β -caroteno foi cuidadosamente retirada e transferida para funil de vidro sinterizado. O β -caroteno foi filtrado a vácuo em cadinhos com placa de vidro sinterizado com pequenas porções de acetona. O filtrado foi transferido para um funil de separação, contendo éter de petróleo e lavado com água destilada pelo menos cinco vezes, para completa remoção da acetona. O extrato etéreo foi recolhido, seco com sulfato de sódio anidro e filtrado para um balão volumétrico. Em seguida foi realizado no espectrofotômetro duplo feixe um espectro de varredura entre 350 e 550 nm e a seguir o β -caroteno foi identificado e quantificado. A quantificação do β -caroteno e do teor pró-vitamina A foi realizada conforme o cálculo abaixo de acordo com Davies (1976). Foram utilizados 5 (cinco) gramas de amostra e as análises foram realizadas em triplicata.

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

onde:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592 \text{ (coeficiente de absorvidade) (DAVIES, 1976).}$$

O valor pró-vitamínico foi calculado de acordo com a relação: 12 μg de β -caroteno equivale a 1 μg de retinol e a uma atividade de equivalente de retinol (RAE) (DRI, 2000; COZZOLINO, 2005).

4.3.6 - Teste de metodologia para determinação da vitamina C

Para determinação da vitamina C foram testados dois métodos descritos na AOAC:

- Método microfluorimétrico, 967.22, AOAC, 1995;
- Método titulométrico, 967.21 AOAC, 1995.

Após avaliação dos resultados, o método escolhido foi o titulométrico, conforme descrição no item 4.3.7 e discussão no item 5.4, porém algumas modificações foram necessárias, como a centrifugação do extrato aquoso e a adaptação de um eletrodo de óxido redução durante a titulação, a fim de se otimizar a análise.

4.3.7 - Determinação da vitamina C (ácido ascórbico)

Para determinação da vitamina C foi utilizado o método titulométrico (AOAC, 1995). Este método baseia-se na redução do **2-6-diclorofenol-indofenol** (DCFI) pelo ácido ascórbico. O DCFI em meio básico ou neutro é azul, em meio ácido é rosa e sua forma reduzida é incolor.

4.3.7.1 – Extração

As amostras foram pesadas, transferidas para tubos de centrífuga e homogeneizadas em Turrax com solução de ácido metafosfórico – ácido acético em água (3% ácido metafosfórico e 8% ácido acético). Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos, depois de decorrido este tempo, o sobrenadante foi retirado e transferido para balão volumétrico. O resíduo foi novamente centrifugado, após ter sido homogeneizado com nova porção da solução de ácido metafosfórico. Decorrida a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionado àquele retirado anteriormente. Na Figura 12 está apresentado um fluxograma de análise de determinação de vitamina C.

FIGURA 12: Fluxograma de análise de determinação da vitamina C.

4.3.7.2 – Titulação

A solução, contendo a vitamina C, foi então titulada com DCFI. Para otimizar a titulação, foi utilizado um agitador magnético e um aparelho de medição de pH Micronal (B 474), equipado com um eletrodo de óxido redução Mettler-Toledo (PT4805-57/120). O ponto final da titulação, que geralmente é detectado apenas pela mudança de cor da solução, foi observado pela inflexão da curva de titulação, observando-se as variações de mV ocorridas durante o processo. O uso do eletrodo e conseqüentemente a utilização da titulação potenciométrica foram necessários devido à cor apresentada pela solução obtida após a extração do pólen (amarela), onde a observação do ponto final da titulação seria impreciso numa titulação simples. Foram utilizados cerca de 5 gramas de amostra e as análises foram realizadas em

triplicata. Para a quantificação da vitamina C, foi realizada a titulação de uma solução padrão com concentração conhecida, paralelamente à titulação da amostra, e os resultados submetidos à seguinte fórmula:

$$\mu\text{g de vitamina C/g} = \frac{C_p \times \text{Vol (a)} \times 1000}{M \times \text{Vol (p)}}$$

Onde:

C_p = concentração do padrão

Vol (a) = volume de titulante gasto na titulação da amostra

M = massa de amostra sob base seca

Vol (p) = volume de titulante gasto na titulação do padrão

4.3.8 - Análise polínica

4.3.8.1 - Preparo das lâminas

De cada uma das amostras compostas do pólen apícola foram retiradas porções de 0,2g para análise polínica. O procedimento para preparo das lâminas foi realizado conforme Erdtman, (1952).

Os grãos de pólen foram transferidos para tubos de centrifuga, hidratados com 1 mL de solução de glicerina e água (1:1), tampados e mantidos em repouso por 24 h. Decorrido o tempo de repouso, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao resíduo, 5 mL de ácido acético e esta solução foi mantida em repouso por mais 24h. Em seguida, os tubos foram centrifugados (mesmas condições) e o sobrenadante descartado. Na etapa seguinte, adicionou-se cuidadosamente a cada tubo, 5 mL da solução acetólica, previamente preparada, contendo anidrido acético e ácido sulfúrico (9:1), sob agitação com auxílio de bastões de vidro. Os tubos foram submetidos a um banho-maria com temperatura próxima da fervura por 2 minutos e em seguida foram centrifugados (mesmas condições). O sobrenadante foi descartado e o resíduo lavado com 5 mL de água e centrifugado com 2 gotas de álcool etílico. Numa última etapa, o sobrenadante foi descartado e novamente

centrifugado com 5 mL de solução de glicerina e água (1:1). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados invertidos sob uma superfície de papel absorvente. Após um período de 24 horas, as lâminas foram preparadas raspando-se a superfície do resíduo, contido nos tubos de centrífuga, com auxílio de uma alça contendo um pequeno pedaço de gelatina neutra na sua extremidade. A gelatina foi depositada em lâminas de vidro (26 x 76 mm), por cima destas foram colocadas as lamínulas de vidro (24 x 24 mm) e em seguida a gelatina foi cuidadosamente derretida com auxílio de bico de bunsen. A vedação adequada das lamínulas foi feita com porções de parafina derretida e as lâminas foram, então analisadas em microscópio ótico.

4.3.8.2– Identificação das lâminas

Previamente à identificação das lâminas, é recomendável fazer o levantamento da flora apícola e a elaboração da erxicata e do laminário de referência local. Deste modo, a identificação taxonômica do pólen é mais precisa e objetiva. Estes trabalhos, que geralmente levam anos a serem concluídos, já foram realizados anteriormente, no mesmo local das coletas, conforme descrito por Silva *et al.* (1993) e Marchini *et al.* (2001).

A análise qualitativa das lâminas foi baseada nos trabalhos de Moreti *et al.* (2002) e a análise quantitativa foi realizada por meio de contagem consecutiva de 300 grãos de pólen em cada lâmina (MORETI *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2001). Posteriormente, determinou-se a porcentagem e as classes de ocorrência: pólen dominante (> 45% do total de grãos), pólen acessório (de 15% a 45%), pólen isolado importante (de 3% a 14%) e pólen isolado ocasional (< 3%) (LOUVEAUX, MAURIZIO e VORWOHL, 1978).

4.3.9 - Análise estatística

As médias das variáveis da concentração de vitamina E, vitamina C e β -caroteno foram comparadas em relação a época da coleta através do Teste-t para comparação de médias. Uma vez provada a diferença, utilizou-se nas amostras frescas e em cada época de coleta a ANOVA one-way para testar a igualdade das médias em cada lote seguido pelo Teste de Comparações de Tukey. Foi utilizado Modelos Lineares Generalizados (MLG) para comparar as médias das variáveis da concentração de vitamina E, vitamina C e β -caroteno entre os três grupos experimentais considerando a influência dos lotes nestas medidas (tratamento x lotes), seguida do Teste de Comparações de Médias de Tukey HSD para identificação dos contrastes significativos e dando destaque aos efeitos causados pelas Interações. Quando necessário as homogeneidades das variâncias nos grupos foram verificadas usando Testes F e de Leven. Em todas as análises estatísticas considerou-se um nível de significância (α) de 0,05 na tomada de decisões. O software estatístico utilizado foi MINITAB 14.1.0 (Minitab.Inc) juntamente com o Excel 2002 na elaboração dos cálculos e gráficos, seguindo os procedimentos descritos por COSTA NETO (1977).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Eficiência do Processo de Desidratação

Os lotes frescos de pólen apícolas foram mantidos nos aparelhos (estufa Ballardin e desumidificador Apilani) com o intuito de se obter teores de umidade, nas amostras desidratadas, dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira de até 4% (BRASIL, 2001). O tempo de processamento em cada um dos aparelhos variou de acordo com seu funcionamento, conforme mostra a Tabela 6.

TABELA 6: Resultados obtidos nas amostras de pólen apícola durante os processamentos de desidratação A (método alternativo) e B (método convencional).

<i>Processamento</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>Novembro 2004</i>		
Tempo de processamento (h)	52	18
Variação de Temperatura (° C)	29 - 39	40 - 42
Umidade média das amostras (%)	3,8	3,5
<i>Maio 2005</i>		
Tempo de processamento (h)	29	22
Variação de Temperatura (° C)	29 - 32	40 - 42
Umidade média das amostras (%)	3,1	3,3
<i>Novembro 2005</i>		
Tempo de processamento (h)	27	48
Temperatura média (° C)	29 - 32	40 - 42
Umidade média das amostras (%)	3,5	2,7

A determinação do término do processo de desidratação foi feita manualmente, simulando o que é feito pelos apicultores, através da compressão entre os dedos de uma pequena porção de pólen e esta técnica

pode acarretar conclusões erradas quanto ao teor final de umidade do produto. Isto se evidencia nos trabalhos de Bastos *et al.* (2003) e Almeida-Muradian *et al.* (2005), onde os autores observaram a ocorrência no mercado de produtos comerciais de pólen apícolas desidratados com valores de umidade acima do que preconiza a legislação brasileira (umidade acima de 4%).

5.1.1- Processamento convencional

A variação de tempo, principalmente observada entre os processamentos de maio e novembro de 2005, pode estar relacionada com a umidade relativa do ar durante estes dias, visto que o aparelho funciona com sistema de circulação aberto.

5.1.2 - Processamento alternativo

De acordo com o fabricante, o longo tempo de desidratação observado em novembro de 2004, ocorreu devido à falha na vedação do aparelho que propiciava pequenas frestas com entrada de ar, impedindo uma atmosfera de umidade relativa em torno de 0%, isto também explicou a dificuldade no controle de temperatura, que foi em média 36,1° C, com picos entre 37 e 39° C. Nos processamentos posteriores, realizados em maio e novembro de 2005, as falhas detectadas no aparelho anteriormente, foram solucionadas. O tempo de desidratação diminuiu e a temperatura variou entre 29 e 32° C, provavelmente o aparelho Apilani seja menos influenciado pela umidade relativa do ambiente, visto que funciona com um sistema de circulação fechado.

5.2 – Determinação da umidade

5.2.1 - Umidade (coleta de outubro de 2004)

Os valores de umidade obtidos nos lotes de pólen apícolas coletados em outubro de 2004 estão apresentados na Tabela 7, variando entre 7,3 e 22,0% para as amostras frescas, entre 3,5 e 4,1 % para as amostras submetidas ao processamento alternativo A e entre 2,9 e 3,8% para amostras submetidas ao processamento convencional B. Estes resultados estão de acordo com a legislação brasileira (máx. 30% para amostras frescas e 4% para as desidratadas).

TABELA 7: Teores de umidade das amostras frescas e processadas de pólen apícola coletadas em outubro de 2004.

Umidade (%) *			
Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
1	11,2 ± 0,4	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1
2	8,1 ± 0,1	4,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2
3	8,1 ± 0,3	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,2
4	13,2 ± 0,5	3,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1
5	14,5 ± 0,2	3,9 ± 0,1	3,8 ± 0,2
6	22,0 ± 0,4	NP	3,8 ± 0,2
7	16,0 ± 0,3	NP	3,8 ± 0,2
8	12,5 ± 0,2	NP	3,6 ± 0,2
9	7,3 ± 0,1	NP	2,9 ± 0,1
10	15,6 ± 0,1	NP	3,65 ± 0,04

(*) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão; NP= amostras não processadas.

5.2.2 - Umidade (coleta de abril e outubro de 2005)

Os resultados de umidade dos lotes de pólen apícolas coletados em abril e outubro de 2005 estão apresentados na Tabela 8 e variaram entre 8,5 e 17,3% para as amostras frescas; 2,7 e 3,51% para amostras do processamento A e 2,5 e 3,5% para as amostras do processamento B. Todos os resultados estão de acordo com os limites estabelecidos pela legislação brasileira.

TABELA 8: Teores de umidade das amostras de pólen apícolas coletadas em abril e outubro de 2005.

Umidade (%) ^{1,2}				
Coleta	Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
A B R I L	1	15,9 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,1 ^b
	2	12,7 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,1 ^b
	3	10,8 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,3 ^b
	4	11,2 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,2 ^b
	5	17,3 ± 0,4 ^a	3,3 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,1 ^b
O U T U B R O	6	13,8 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,1 ^b	2,59 ± 0,04 ^c
	7	12,6 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,1 ^b	2,8 ± 0,1 ^c
	8	8,5 ± 0,1 ^a	3,51 ± 0,04 ^b	2,5 ± 0,1 ^c
	9	8,9 ± 0,2 ^a	3,5 ± 0,1 ^b	2,6 ± 0,1 ^c
	10	10,0 ± 0,2 ^a	3,44 ± 0,03 ^b	3,1 ± 0,1 ^c

(1) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão.

(2) valores médios na mesma linha seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si (valor-p < 0,05).

5.3 – Testes de metodologia para determinação de β -caroteno e α -tocoferol

Foram testadas cinco metodologias para análise simultânea de vitamina E e β -caroteno (pró-vitamina A) por CLAE. Dois detectores em série foram utilizados, sendo o detector UV-Vis ($\lambda=452$ nm) para carotenóides totais e o detector de fluorescência ($\lambda_{ex} = 295$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm) para α -tocoferol. Conforme apresentado nas Figuras 13 e 14, nos cromatogramas de cada metodologia ocorreu a separação adequada entre o α -tocoferol e os carotenóides totais (detectores e cromatogramas distintos), porém em todas tentativas não se observou separação adequada entre os diferentes carotenóides e entre o α -tocoferol, dificultando na identificação e conseqüentemente na quantificação destes analitos em estudo.

FIGURA 13: Análise de β -caroteno (n) e α -tocoferol (n') por CLAE em amostras de pólen apícola

(a e a') fase móvel: acetonitrila:diclorometano:metanol (70:20:10); coluna Vydac C18; (ALMEIDA-MURADIAN, RIOS, SASAKI, 1998); (b e b') fase móvel: metanol:diclorometano:água (79:15:6); coluna Vydac C18; (PRESOTO, RIOS, ALMEIDA-MURADIAN, 2000); (c e c') fase móvel: acetonitrila:metanol:água (88:9:3); coluna Vydac C18 (BIANCHINI, PENTEADO, 1999).

FIGURA 14: Análise de β -caroteno (n) e α -tocoferol (n') por CLAE em amostras de pólen apícola.

(a e a') fase móvel: metanol: acetonitrila:clorofórmio (47:47:6); coluna Vydac C18 (RIOS, 2001); (b e b') fase móvel: metanol:tetrahidrofurano (95:5); coluna Vydac C18 (LANE et al. ,1997).

Uma vez que não se conseguia uma boa resolução dos picos de β -caroteno e α -tocoferol por CLAE utilizando fase reversa, optou-se pela análise do β -caroteno através da metodologia de cromatografia por coluna aberta descrita por Rodriguez-Amaya (1976), Almeida e Penteado (1988) e Almeida-Muradian, *et al.* (2005) e pela determinação do α -tocoferol utilizando a metodologia descrita por Presoto, Rios e Almeida-Muradian (2000), onde se utilizou a cromatografia líquida de alta eficiência (fase normal).

5.4 – Determinação da vitamina E

5.4.1 – Vitamina E (coleta de outubro de 2004)

Os teores de vitamina E das amostras frescas e processadas de pólen apícola coletadas em outubro de 2004 estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9: Teores de vitamina E das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em outubro de 2004.

Vitamina E ($\mu\text{g/g}$) *			
Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
1	$33,3 \pm 2,0$	$34,4 \pm 0,3$	$33,3 \pm 3,6$
2	$23,5 \pm 2,2$	$19,3 \pm 0,2$	$22,1 \pm 0,5$
3	$28,4 \pm 3,2$	$19,2 \pm 0,8$	$26,4 \pm 2,1$
4	$25,1 \pm 0,6$	$29,5 \pm 0,6$	$29,5 \pm 0,2$
5	$21,8 \pm 2,0$	$33,8 \pm 0,7$	$34,7 \pm 0,6$
6	$8,3 \pm 0,5$	NP	$14,4 \pm 0,2$
7	$23,7 \pm 1,9$	NP	$25,3 \pm 0,5$
8	$17,3 \pm 2,1$	NP	$18,7 \pm 1,7$
9	$37,5 \pm 3,7$	NP	$24,7 \pm 0,3$
10	$28,4 \pm 0,9$	NP	$18,2 \pm 1,5$

(*) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão; NP= amostras não processadas.

De acordo com os valores expressos na Tabela 9 podemos observar que os teores de vitamina E das amostras frescas dos lotes 4, 5, 6, 7, e 8 encontram-se menores que aqueles determinados nas amostras processadas dos mesmos lotes.

Este fato pode estar relacionado com o conteúdo de água das amostras, visto que estas apresentavam os teores de umidade mais elevados, como observado na Tabela 7. De acordo com Vidal-Valverde *et al.*

(1993), a atividade de água é um fator importante na estabilidade do α -tocoferol, ou seja quanto maior seu valor, maior a degradação da vitamina.

Além disso, os teores de vitamina E encontrados nas amostras processadas, superiores àqueles encontrados nas amostras frescas ocorreram devido à demora nas análises para determinação da vitamina E que somente puderam ser realizadas em janeiro de 2005 (três meses após a coleta) devido a problemas técnicos (equipamentos), permanecendo as amostras, congeladas até o momento da análise.

Uma vez que os dados apresentaram problemas, resolveu-se descartar esses resultados.

5.4.2 – Vitamina E (coleta de abril e outubro de 2005)

Os teores de vitamina E das amostras frescas de pólen apícolas coletadas em abril e outubro de 2005 variaram entre 13,5 e 42,5 $\mu\text{g/g}$; nas amostras processadas, os teores variaram entre 8,2 e 32,4 $\mu\text{g/g}$, conforme apresentado na Tabela 10. Hakim (1994) apresentou o teor de vitamina E no pólen apícola desidratado entre 0,10 e 0,32 $\mu\text{g/g}$, sendo cerca de 100 vezes menor do que as apresentadas no presente trabalho.

TABELA 10: Teores de vitamina E das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril e outubro de 2005.

Vitamina E ($\mu\text{g/g}$) ^{1,2,3}				
Coleta	Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
A B R I L	1	32,3 $\pm$ 2,3 ^{bA}	31,1 $\pm$ 1,8 ^B	27,9 $\pm$ 1,4 ^C
	2	42,5 $\pm$ 2,7 ^{aA}	32,4 $\pm$ 0,8 ^B	25,4 $\pm$ 0,4 ^C
	3	33,3 $\pm$ 1,9 ^{bA}	21,4 $\pm$ 1,8 ^B	20,9 $\pm$ 0,9 ^B
	4	31,3 $\pm$ 2,6 ^{bA}	17,0 $\pm$ 0,6 ^B	21,1 $\pm$ 1,5 ^C
	5	31,1 $\pm$ 1,4 ^{bA}	11,5 $\pm$ 0,3 ^B	8,7 $\pm$ 0,3 ^C
O U T U B R O	1	13,5 $\pm$ 0,2 ^{ca}	8,6 $\pm$ 0,3 ^B	8,2 $\pm$ 0,4 ^C
	2	14,9 $\pm$ 0,4 ^{bA}	11,0 $\pm$ 0,1 ^B	9,1 $\pm$ 0,2 ^C
	3	17,9 $\pm$ 0,5 ^{aA}	11,8 $\pm$ 1,2 ^B	8,2 $\pm$ 0,4 ^C
	4	13,6 $\pm$ 0,3 ^{ca}	11,6 $\pm$ 1,2 ^B	9,4 $\pm$ 0,5 ^C
	5	14,3 $\pm$ 0,5 ^{bcA}	13,4 $\pm$ 0,4 ^B	9,4 $\pm$ 0,2 ^C

(1) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão.

(2) valores médios na mesma coluna seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor- $p < 0,05$).

(3) valores médios na mesma linha seguidos de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor- $p < 0,05$).

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. A IDR para vitamina E é de 15 mg/dia para adultos, conforme indicado no Dietary References Intakes (2000) e 15% deste valor consistiriam na ingestão de 2,25 mg de vitamina E por porção. A porção de consumo diária recomendada para o pólen apícola seco é de até 25g, o que forneceria entre 0,21 e 0,81 mg de vitamina E diariamente, deste modo não poderia ser considerada fonte desta vitamina.

Através do Quadro 1 observa-se que os teores da vitamina E, determinados nos lotes de pólen apícola fresco do mês de outubro de 2005 são menores em comparação àqueles teores do mês de abril do mesmo ano.

Há uma diferença estatisticamente significativa nos níveis desta vitamina entre os dois meses analisados (valor- $p = 0,000$).

Quadro 1: Variação entre os teores de vitamina E dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril e outubro de 2005.

No Quadro 2 são apresentadas as variações da vitamina E entre os lotes de pólen apícola fresco coletados em abril de 2005. Destaca-se que o segundo lote analisado no mês de abril registrou os maiores níveis de vitamina E em comparação aos demais lotes. Percebe-se também que todos os lotes apresentam uma variabilidade semelhante.

Quadro 2: Variação entre os teores de vitamina E dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril de 2005.

Pelo teste de Tukey pode-se concluir, com 99,18% de confiança, que as médias dos teores de vitamina E dos lotes 1, 3, 4 e 5 são estatisticamente semelhantes entre si e estatisticamente diferentes do lote 2.

No Quadro 3 são apresentadas as variações da vitamina E entre os lotes de pólen apícola fresco coletados em outubro de 2005. Observa-se que os lotes não apresentam uma variabilidade tão semelhante, quanto àquela observada nos lotes coletados em abril do mesmo ano.

Com 99,18% de confiança, nota-se que as médias dos teores de vitamina E entre dos lotes 1,4 e 5 e dos lotes 2 e 5 são estatisticamente semelhantes e que o lote 3 apresenta a maior média da vitamina E, diferente estatisticamente dos demais.

Quadro 3: Variação entre os teores de vitamina E dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em e outubro de 2005.

Com relação à influência dos processamentos nos teores de vitamina E das amostras, pode-se observar no Quadro 4 que, no mês de abril, as amostras do processamento A possuem médias de teores de vitamina E superiores a da amostra B nos lotes 1, 2 e 5. No lote 3 a diferença não é significativa e no lote 4 ocorre o oposto, a amostra B apresentou maior média do que a amostra A.

Quadro 4: Comparação das médias dos teores de vitamina E entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em abril de 2005.

Através do Quadro 5 percebe-se que, no mês de outubro de 2005, as amostras do processamento A possuem médias de teores de vitamina E superiores a da amostra B para todos os lotes, ou seja o processamento A foi mais eficiente que o processamento B na manutenção da vitamina E tanto para os lotes coletados em abril como em outubro de 2005.

A porcentagem média de perda da vitamina E das amostras desidratadas em relação às amostras frescas foi de 35,5% no processamento B e de 28,9% no processamento A, considerando as coletas de abril e outubro de 2005.

Quadro 5: Comparação das médias dos teores de vitamina E entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em outubro de 2005.

Na Figura 15 está representado um dos cromatogramas de padrão e de amostra obtidos na análise de determinação de α -tocoferol. Ambos cromatogramas obtidos utilizando-se coluna de sílica Shim-pack CLC-Sil (M) 25 cm, fase móvel composta de hexano e álcool isopropílico (99:1), fluxo de 2 mL/min e detector de fluorescência (λ_{ex} =295 nm e λ_{em} =330 nm).

FIGURA 15: (A) Cromatograma de amostra de pólen apícola (B) Cromatograma de padrão de α -tocopherol. Fase móvel: Shim-pack CLC-Sil (M) 25 cm, fase móvel composta de hexano e álcool isopropílico (99:1), fluxo de 2 mL/min e detector de fluorescência (λ_{ex} =295 nm e λ_{em} 330 nm).

5.4.3 Teste de recuperação

A adição de padrão à amostra antes do procedimento de extração, propiciou a recuperação do α -tocoferol. Os testes foram realizados em amostras frescas e a média de recuperação foi de 94,8% de α -tocoferol.

5.4.4 Teste de repetitividade

O coeficiente de variação entre os resultados obtidos após a determinação do teor de α -tocoferol na mesma amostra por seis vezes foi de 3%. Este resultado é considerado adequado, visto que para métodos que quantificam compostos em macro quantidades, recomendam-se um desvio padrão relativo ou coeficiente de variação de 1 a 3%. Já para análises de traços e impurezas se aceita uma variação de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

5.5 – Determinação de β -caroteno e carotenóides totais

5.5.1 – β -caroteno e carotenóides totais (coleta de outubro de 2004)

Nas análises dos três primeiros lotes frescos de pólen apícola de 2004, o β -caroteno não foi encontrado e suspeita-se que este fato esteja relacionado com a origem botânica das amostras.

Em virtude dos problemas ocorridos com os resultados na análise da vitamina E, conforme descrito no item 5.4.1 e que ocorreram também com a vitamina C, como será descrito no item 5.7.1 (coleta de outubro de 2004), foi decidido interromper as análises do β -caroteno, uma vez que não seria viável observar o efeito do processamento de desidratação sob as três vitaminas antioxidantes (C, E e o β -caroteno como pró-vitamina A).

5.5.2 – β -caroteno e carotenóides totais (coleta de abril e outubro de 2005)

Na Tabela 11 estão apresentados os valores de carotenóides totais das amostras frescas e processadas de pólen apícola coletadas em abril e outubro de 2005, onde se observa uma diferença estatisticamente significativa entre os valores das amostras frescas nas duas épocas de coleta. Os teores de carotenóides totais registrados no mês de outubro são muito inferiores aos do mês de abril.

TABELA 11: Teores de carotenóides totais das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril e outubro de 2005.

Carotenóides totais ($\mu\text{g/g}$) ^{1,2,3}				
Coleta	Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
A B R I L	1	93,8 $\pm$ 5,0 ^{dA}	74,3 $\pm$ 2,7 ^B	72,1 $\pm$ 1,9 ^B
	2	222,9 $\pm$ 11,3 ^{cA}	146,21 $\pm$ 7,4 ^B	89,8 $\pm$ 3,6 ^C
	3	286,1 $\pm$ 11,0 ^{bA}	178,7 $\pm$ 3,4 ^B	131,5 $\pm$ 8,6 ^C
	4	321,3 $\pm$ 11,8 ^{aA}	174,3 $\pm$ 3,2 ^B	144,1 $\pm$ 2,7 ^C
	5	304,7 $\pm$ 15,9 ^{aA}	166,0 $\pm$ 2,8 ^B	150,3 $\pm$ 5,7 ^C
O U T U B R O	1	12,5 $\pm$ 0,7 ^{aA}	11,6 $\pm$ 1,2 ^B	10,7 $\pm$ 0,5 ^C
	2	9,3 $\pm$ 1,7 ^{bA}	7,8 $\pm$ 0,4 ^B	4,6 $\pm$ 0,1 ^C
	3	11,1 $\pm$ 0,4 ^{a bA}	10,8 $\pm$ 0,5 ^B	7,1 $\pm$ 0,3 ^C
	4	9,1 $\pm$ 0,4 ^{bA}	8,8 $\pm$ 0,3 ^B	8,3 $\pm$ 0,6 ^C
	5	10,3 $\pm$ 0,6 ^{a bA}	9,4 $\pm$ 0,9 ^B	8,2 $\pm$ 0,4 ^C

(1) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão.

(2) valores médios na mesma coluna seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor-p < 0,05).

(3) valores médios na mesma linha seguidos de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor-p < 0,05).

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na Tabela 11, o teor de carotenóides totais foi afetado pelo processo de desidratação, sendo que no processamento convencional observa-se uma diminuição maior no

teor de carotenóides. A porcentagem de perda dos carotenóides foi em média 27,6% para o processamento A e 40,4% para o processamento B.

As diferenças entre os teores de carotenóides totais observados entre as amostras frescas, processadas A e processadas B são estatisticamente significativas (valor- $p = 0,000$) e a temperatura mais alta, a que são submetida as amostras no processamento convencional, provavelmente seja a causa da diminuição dos carotenóides.

Os teores de β -caroteno das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril de 2005 estão apresentados na Tabela 12. Nos lotes coletados em outubro de 2005 observou-se ausência de β -caroteno, como havia ocorrido nos lotes coletados na mesma época do ano anterior (outubro de 2004) e como descrito por Almeida-Muradian *et al.* (2005).

Na literatura alguns autores relatam a presença de β -caroteno no pólen apícola, porém não quantificam, como Hakim (1994) e Ianuzzi (1993). Muniategui *et al.* (1990), obtiveram em média 10 μg de β -caroteno em amostras comerciais de pólen apícola. No presente trabalho os teores de β -caroteno nas amostras processadas variaram entre 32,3 e 90,48 ($\mu\text{g/g}$).

TABELA 12: Teores de β -caroteno das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril de 2005.

β -caroteno ($\mu\text{g/g}$) ^{1,2,3}			
Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
1	56,3 $\pm$ 3,8 ^{dA}	41,2 $\pm$ 2,2 ^B	32,3 $\pm$ 0,7 ^C
2	125,3 $\pm$ 3,5 ^{cA}	63,1 $\pm$ 3,5 ^B	56,9 $\pm$ 2,3 ^C
3	151,5 $\pm$ 13,2 ^{bA}	87,7 $\pm$ 0,8 ^B	65,8 $\pm$ 2,1 ^C
4	198,9 $\pm$ 13,3 ^{aA}	90,48 $\pm$ 4,8 ^B	66,9 $\pm$ 5,2 ^C
5	195,6 $\pm$ 1,8 ^{aA}	86,62 $\pm$ 7,4 ^B	77,8 $\pm$ 4,1 ^C

(1) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão.

(2) valores médios na mesma coluna, seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor- $p < 0,05$).

(3) valores médios na mesma linha, seguidos de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor- $p < 0,05$).

No Quadro 6 são apresentadas as variações de β -caroteno entre os lotes de pólen apícola fresco coletados em abril de 2005, onde se observa uma tendência de aumento no teor de β -caroteno.

Quadro 6: Variação entre os teores de β -caroteno dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril de 2005.

Através do teste de Tukey com 99,18% de confiança pode-se concluir que: o teor médio de β -caroteno do lote 1 é inferior e estatisticamente diferente de todos os outros lotes; que o lote 2 apresenta teores de β -caroteno inferiores aos dos lotes 3, 4 e 5; o lote 3 apresenta teores médios de β -caroteno estatisticamente inferiores aos dos lotes 4 e 5 e que estes dois últimos lotes (4 e 5) apresentam teores médios estatisticamente semelhantes.

Através do Quadro 7 observa-se que as amostras do processamento A, no mês de abril de 2005, possuem médias de teores de β -caroteno um pouco superiores em comparação com as amostras do processamento B.

Quadro 7: Comparação das médias dos teores de β -caroteno entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em abril de 2005.

Comparando-se os resultados obtidos dos teores de β -caroteno nas amostras frescas e processadas, observa-se que o processamento A foi mais eficiente, na manutenção do β -caroteno, que o processamento B, sendo as diferenças estatisticamente significativas. A porcentagem de perda do β -caroteno foi em média 46,4% para o processamento A e de 56,5% para o processamento B.

O β -caroteno foi o principal carotenóide encontrado no pólen apícola fresco (ou processado) coletado nas amostras de abril de 2005 e sua porcentagem representou em média 59,1% em relação aos carotenóides totais.

O valor pró-vitaminico A das amostras processadas variou entre 2,69 e 7,54 μg retinol (12 μg de β -caroteno correspondendo a 1 μg de retinol). A ingestão diária recomendada para vitamina A é de 900 μg /dia para homens e de 700 μg /dia para mulheres (ALMEIDA-MURADIAN, PENTEADO, 2003b; DRI, 2000), logo, em termos de rotulagem, as amostras de pólen apícolas coletadas em abril de 2005 podem ser consideradas fonte desta vitamina, através de quantidade de β -caroteno que apresentaram. A porção diária recomendada de pólen apícola seco de 25 g forneceria entre 67,3 e 188,5 μg

retinol, ou seja, de 7,5 a 20,9% da ingestão diária recomendada para homens e de 9,6 a 26,9% para mulheres.

Na Figura 16 está representado um dos espectros obtidos na determinação do β -caroteno, onde foi realizada varredura entre os comprimentos de onda 350 e 550 nm

FIGURA 16: Espectro absorção do β -caroteno entre os comprimentos de onda 350 e 550 nm. Picos máximos de absorção em 475, 448 e (425) nm em éter de petróleo (PE 30 - 60° C).

5.6 - Testes de metodologia para determinação de vitamina C

Inicialmente, foi testado o método microfluorimétrico (técnica 967.22, AOAC, 1995) para a determinação da vitamina C. De acordo com esta metodologia deveria ser preparada uma solução da amostra com concentração estimada de 100 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina C. Para se preparar 25 mL desta solução precisaríamos pesar em torno de 70 g de amostra o que seria

inviável para realizarmos a extração por centrifugação. Além disso, não teríamos amostra suficiente para realizar as análises com triplicatas de 70 g. O teste foi realizado com 5 gramas de amostra, que era a quantidade disponível para análise de todas as vitaminas em triplicata. Os resultados obtidos no microfluorímetro não foram satisfatórios, visto que os valores obtidos na leitura dos brancos se sobrepunham aos valores obtidos com a amostra.

Desta maneira, o método microfluorimétrico foi substituído pela determinação da vitamina C por titulação (técnica 967.21, AOAC, 1995). A determinação titulométrica foi testada com soluções de amostra mais diluídas que aquelas preconizadas pelo método microfluorimétrico, porém neste caso os resultados foram precisos frente aos padrões de concentrações correspondentes. Esta técnica foi modificada pela introdução de um eletrodo de óxido-redução em virtude da dificuldade de visualização do ponto final da titulação, visto que as amostras apresentavam cor variando do amarelo ao laranja. O método então utilizado para determinação da vitamina C foi a titulação potenciométrica.

5.7 – Determinação da Vitamina C

5.7.1 – Determinação de Vitamina C (coleta de outubro de 2004)

Na Tabela 13 estão apresentados os teores de vitamina C das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em outubro de 2004.

TABELA 13: Teores de vitamina C das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em outubro de 2004.

Vitamina C (mg/g) *			
Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
1	0,51 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,43 ± 0,04
2	0,72 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,67 ± 0,01
3	0,57 ± 0,01	0,464 ± 0,001	0,58 ± 0,01
4	0,268 ± 0,004	0,37 ± 0,01	0,548 ± 0,007
5	0,14 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,29 ± 0,02
6	0,019 ± 0,002	NP	0,279 ± 0,003
7	0,117 ± 0,005	NP	0,404 ± 0,001
8	0,233 ± 0,004	NP	0,41 ± 0,01
9	0,71 ± 0,03	NP	0,675 ± 0,005
10	0,027 ± 0,003	NP	0,51 ± 0,02

(*) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão; NP= amostras não processadas.

O mesmo tipo de problema ocorrido na análise da vitamina E, descrito no item 5.4.1, foi observado com a vitamina C (amostras processadas com teores maiores de vitamina C do que nas amostras frescas). O método inicialmente proposto (microfluorimétrico) teve que ser substituído pelo titulométrico e este por sua vez só apresentou resultados satisfatórios (visualização correta do ponto final da titulação) após a otimização da metodologia com a introdução do eletrodo de óxido-redução, com isso tivemos um atraso na análise das amostras.

Na Tabela 13 observa-se que os teores de vitamina C das amostras frescas de umidade mais elevada (lotes 4, 5, 6, 7, 8, 10) encontram-se menores que os encontrados nas amostras processadas dos mesmos lotes.

Suspeita-se que o ácido ascórbico, que é mais instável em solução, tenha sido degradado durante os cinco meses de armazenamento antes da análise.

Uma vez que os dados apresentaram problemas, resolveu-se descartar esses resultados, assim como os resultados da vitamina E, embora estes alertem para o fato de que os apicultores, que armazenam o pólen apícola em freezer até juntar quantidade suficiente para a desidratação, podem estar diminuindo o valor nutricional deste produto.

5.7.2 – Vitamina C (coleta de abril e outubro de 2005)

No presente trabalho foram observados teores da vitamina C entre 152,8 e 542,2 $\mu\text{g/g}$, conforme apresentado na Tabela 14. Estes resultados assemelham-se àqueles descritos por Ianuzzi (1993) e Hakim (1994), que observaram valores médios de vitamina C de 350 $\mu\text{g/g}$ e entre 152 e 640 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

TABELA 14: Teores de vitamina C das amostras frescas e processadas de pólen apícola, coletadas em abril e outubro de 2005.

Vitamina C ($\mu\text{g/g}$) ^{1,2,3}				
Coleta	Lotes	Frescas	Processamento A	Processamento B
A B R I L	1	364,7 $\pm$ 12,7 ^{aA}	238,9 $\pm$ 5,6 ^B	289,1 $\pm$ 7,1 ^C
	2	273,9 $\pm$ 8,6 ^{cA}	152,8 $\pm$ 5,0 ^B	233,6 $\pm$ 11,1 ^C
	3	306,9 $\pm$ 12,2 ^{bA}	239,2 $\pm$ 4,6 ^B	291,0 $\pm$ 20,7 ^C
	4	327,1 $\pm$ 15,8 ^{bA}	266,5 $\pm$ 8,0 ^B	286,7 $\pm$ 0,7 ^C
	5	334,7 $\pm$ 4,8 ^{abA}	282,2 $\pm$ 1,9 ^B	280,5 $\pm$ 4,3 ^C
O U T U B R O	1	537,3 $\pm$ 0,9 ^{cA}	507,5 $\pm$ 1,2 ^B	489,8 $\pm$ 5,6 ^C
	2	540,7 $\pm$ 5,6 ^{cA}	522,4 $\pm$ 0,8 ^B	498,0 $\pm$ 2,7 ^C
	3	559,3 $\pm$ 4,0 ^{abA}	538,3 $\pm$ 4,4 ^B	516,4 $\pm$ 3,2 ^C
	4	560,3 $\pm$ 2,9 ^{aA}	542,2 $\pm$ 3,2 ^B	512,6 $\pm$ 21,6 ^C
	5	546,4 $\pm$ 8,5 ^{bcA}	523,7 $\pm$ 3,0 ^B	504,3 $\pm$ 1,9 ^C

(1) média realizada em triplicata, seguida de desvio-padrão.

(2) valores médios na mesma coluna, seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor- $p < 0,05$).

(3) valores médios na mesma linha, seguidos de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si (valor- $p < 0,05$).

Em termos de rotulagem, o pólen apícola coletado em outubro de 2005 pode ser considerado um alimento fonte de vitamina C, pois forneceria numa porção diária de 25 g, entre 12,2 e 13,6 mg da vitamina e de acordo com a IDR (DRI, 2000), o consumo de vitamina C deve ser de 90 mg/dia para homens e de 75 mg/dia para mulheres. Um alimento para se considerado fonte desta vitamina deve fornecer 15% da recomendação diária desta vitamina, ou seja, 13,5 e 11,3 mg de vitamina C para homens e mulheres, respectivamente.

Através do Quadro 8 observa-se que os teores da vitamina C determinados nos lotes frescos de pólen apícola coletados no mês de outubro são muito superiores e com menor variabilidade em comparação aos teores dos lotes do mês de abril. Conclui-se que há uma diferença estatisticamente significativa nos teores de vitamina C entre as duas épocas do ano (valor-p = 0,000).

Quadro 8: Variação entre os teores de vitamina C dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril e outubro de 2005.

No Quadro 9 estão apresentadas as variações da vitamina C entre os lotes de pólen apícola fresco coletados em abril de 2005. Destaca-se que o primeiro lote analisado no mês de abril apresentou teor de vitamina C superior que nos demais lotes, sendo o lote 2 o que apresentou menor teor desta vitamina.

Quadro 9: Variação entre os teores de vitamina C dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em abril de 2005.

Através do teste de Tukey, com 99,18% de confiança, pode-se concluir que: os teores médios de vitamina C entre os lotes 3, 4 e 5 são estatisticamente semelhantes, assim como nos lotes 1 e 5; o teor médio da vitamina C encontrado no lote 2 é estatisticamente diferente que os teores dos demais lotes.

No Quadro 10 estão apresentadas as variações da vitamina C entre os lotes de pólen apícola fresco coletados em outubro de 2005.

Quadro 10: Variação entre os teores de vitamina C dos lotes de pólen apícolas frescos coletados em outubro de 2005.

Através do teste de Tukey, com 99,18% de confiança, pode-se concluir que: os teores médios de vitamina C encontrados nos lotes 1,2 e 5 são estatisticamente semelhantes, assim como entre os lotes 3 e 5 e entre os lotes 3 e 4.

Com relação à influência dos processamentos nos teores de vitamina C das amostras, pode-se observar no Quadro 11 que o processamento B foi mais eficiente na manutenção dos teores de vitamina C em relação ao processamento A, somente no lote 5 observa-se o contrário.

Quadro 11: Comparação das médias dos teores de vitamina C entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícolas coletadas em abril de 2005.

A porcentagem de perda da vitamina C foi em média de 13,8% para o processamento B e de 27,0% para o processamento A. Este resultado não era esperado, visto que as condições de temperatura foram mais drásticas no processamento B do que no processamento A. Ocorreu que as amostras não puderam ser submetidas aos dois processos de desidratação no mesmo dia. A desidratação pelo método A foi realizada uma semana após a desidratação pelo método B, devido ao atraso do fabricante na entrega do aparelho Apilani (problemas técnicos). O teor de vitamina C contido nas amostras frescas pode ter sido degradado antes do processamento (na estocagem de uma semana no freezer). Este problema não ocorreu na desidratação realizada

nas amostras coletadas em outubro de 2005, visto que as amostras foram colocadas nos dois aparelhos simultaneamente.

No Quadro 12 está apresentada a avaliação da eficiência entre os dois tipos de processamento na manutenção dos teores de vitamina C nas amostras de pólen apícolas coletadas em outubro de 2005.

Quadro 12: Comparação das médias dos teores de vitamina C entre as amostras frescas (F) e processadas (A e B) de pólen apícola coletadas em outubro de 2005.

O processamento A foi mais eficiente na manutenção dos teores de vitamina C em relação ao processamento B em todos os lotes analisados em outubro de 2005, conforme era esperado.

A porcentagem média de perda da vitamina C das amostras desidratadas em relação às amostras frescas (coletadas em outubro de 2005) foi de 8,1% no processamento B e de 4,0% no processamento A.

5.8 Análise Polínica

Na Tabela 15 podemos observar e comparar a frequência dos tipos polínicos obtidos nas coletas de outubro de 2004 e outubro de 2005.

TABELA 15: Porcentagens de tipos polínicos obtidos em amostras frescas de pólen apícola, coletados por *Apis mellifera* L. em Pindamonhangaba, SP em outubro de 2004 e 2005.

Família	Frequência (%) *									
Gênero / Espécie	Outubro 2004					Outubro 2005				
	Dias de coleta (lotes)									
	07/10	10/10	13/10	16/10	19/10	07/10	10/10	13/10	16/10	19/10
<i>Anadenathera</i>										
<i>sp.</i>	3,6 PII	8 PII	2,2 PI	4,7 PII	3,9 PII	2,6 PI	13,7 PII	8,6 PII	2,2 PI	24,4PA
<i>Cecropia sp.</i>	22,7PA	12,1PII	4,6 PII	0,1 PI	0,2 PI	1,1 PI	1,4 PI	0,2 PI	4,6 PII	0,4 PI
<i>Croton urucurana</i>		0,4 PI							2,9 PI	21,3PA
<i>Eucalyptus sp</i>	30,2 PA	24,3PA	2,9 PI	2,6 PI	14,3PII	53,5PD	34,6PA	14 PII		
<i>Malvaceae</i>						0,1 PI				
<i>Mimosa caesalpineafolia</i>						0,1 PI		0,1 PI		
<i>Philodendron sp</i>	3,3 PII	17 PA	17,7 PA	1,8 PI	7,5 PII	0,9 PI	6,5 PII	29 PA	18 PA	29 PA
<i>Pinus sp</i>						0,1 PI				
<i>Poaceae</i>						0,1 PI	0,5 PI	1,8 PI		
<i>Raphanus sp</i>							0,1 PI			
<i>Struthantus</i>		0,3 PI	0,5 PI							
Tipo <i>Arecaceae</i>	27,6 PA	16,2PA	4,7PII	6,1PII	3,8PII	39,4PA	29,8PA	30 PA	4,7 PII	15,1PA
Tipo <i>Myrcia</i>	10,8 PII	19,2PA	67,3PD	85 PD	70 PD	0,8 PI	1,6 PI	0,1 PI	67 PD	0,4 PI
<i>Zea mays</i>						1,4 PI				
<i>Zinnia elegans</i>							11,7PII	14 PII		4,3 PII
NI	1,7 PI	3 PI				0,1PI	0,1PI	2 PI		1,2 PI

* valores médios de análises em triplicata;

PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 15% a 45%); PII = pólen isolado importante (de 3% a 14%); PI = pólen isolado (< 3%); NI = não identificado.

Verifica-se que os tipos polínicos que apresentam frequências importantes (PD= pólen dominante, PA = pólen acessório e PII = pólen acessório importante) aparecem tanto em outubro de 2004 como em outubro de 2005, com exceção da espécie *Zinnia elegans*, que se apresenta apenas em 2005. Os demais tipos polínicos, que não se apresentam concomitantemente nas duas épocas mencionadas aparecem como pólen isolado (PI). Isto nos sugere que na mesma época do ano, tanto em 2004 como em 2005, tivemos fontes similares para alimentação das abelhas, onde provavelmente encontraríamos valores nutricionais similares.

O tipo *Myrcia* apareceu como pólen dominante em 3 amostras (dias 13, 16 e 19 de outubro) no ano de 2004 e em uma amostra em outubro de 2005. Os tipos *Eucalyptus sp* e *Philodendron sp* apareceram como pólen acessório em duas amostras em outubro de 2004. Em outubro de 2005, também tiveram contribuição importante, como fonte polínica para as abelhas, sendo o tipo *Eucalyptus sp* dominante e acessório (duas amostras) e o tipo *Philodendron sp* acessório em três amostras. O gênero *Anadenathera sp* aparece nos dois períodos de coleta, sendo na proporção de pólen isolado importante em 6 amostras, pólen isolado em 3 amostras e pólen acessório em apenas uma amostra, indicando que pode se tornar fonte de coleta de pólen se ocorrer em grande quantidade na área.

O tipo *Arecaceae* apareceu como PA em seis amostras, considerando outubro de 2004 e 2005, indicando que as abelhas visitam estas plantas para coleta de pólen e que, embora não apareça como dominante, aparece em todas as amostras.

Na Tabela 16 podemos confrontar os tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen coletadas em abril e outubro de 2005.

TABELA 16: Porcentagens de tipos polínicos obtidos em amostras frescas de pólen apícola, coletados por *Apis mellifera* L. em Pindamonhangaba, SP em abril e outubro de 2005.

Família	Frequência (%) *									
Gênero	Abril 2005					Outubro 2005				
Espécie	Dias de coleta (lotes)									
	14/04	17/04	20/04	23/04	26/04	07/10	10/10	13/10	16/10	19/10
<i>Anadenanthera sp.</i>						2,6 PI	13,7 PII	8,6 PII	2,2 PI	24,4
<i>Cecropia sp.</i>						1,1 PI	1,4 PI	0,2 PI	4,6 PII	0,4
<i>Eucalyptus sp</i>	55,9 PD	24,3 PA	19,1PA	26,1PA	15,3 PA	53,5 PD	34,6 PA	14,5 PII	2,9 PI	21,3
<i>Macroptilium sp</i>	2,4 PI	13,5 PII	44,2PA	42,9 PA	48,5PD					
<i>Malvaceae</i>						0,1PI				
<i>Mikania sp</i>		0,7 PI	0,1 PI		0,5 PI					
<i>Mimosa caesalpineafolia</i>	15,5 PA	48,2 PD	19,1PA	1,2 PI	21,9 PA	0,1 PI		0,1 PI		
<i>Momordica charantia</i>	0,1PI		1,7 PI							
<i>Philodendron sp</i>	0,1 PI		0,1 PI			0,9 PI	6,5 PII	28,6PA	17,7PA	29,4
<i>Pinus sp</i>						0,1 PI				
<i>Poaceae</i>			0,3 PI			0,1 PI	0,5 PI	1,8 PI		
<i>Raphanus sp</i>	6,9 PII	6,4 PII	5,4 PII	14 PII	0,4 PI		0,1PI			
<i>Salvia splendens</i>	0,6 PI	0,5 PI		0,3 PI	6,1 PII					
<i>Solanum sp</i>	2,1 PI									
<i>Stenolbium sp</i>		0,5 PI		1,7 PI	2,2 PI					
Tipo <i>Arecaceae</i>	0,9 PI					39,4 PA	29,8 PA	30,3PA	4,7 PII	15,1
Tipo <i>Myrcia</i>	4,1 PII	1,5 PI	0,1 PI	3 PI	0,1 PI	0,8 PI	1,6 PI	0,1 PI	67,3PD	0,4
<i>Trema sp</i>			6,5 PII							
<i>Vernonia sp</i>	0,4 PI									
<i>Zinnia elegans</i>						1,4 PI	11,7 PII	13,7 PII		4,3
NI **	3,2	4,2	3,4	6,5	4,9	0,1	0,1	2		1,;

* valores médios de análises em triplicata; ** não foi colocada a classificação polínica, pois em NI estão inclusos três diferentes tipos de pólen não-identificados.

PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 15% a 45%); PII = pólen isolado importante (de 3% a 14%); PI = pólen isolado (< 3%); NI = não identificado.

No período de coleta de abril de 2005 o pólen de *Eucalyptus sp*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e de *Macroptilium sp* apareceram como pólen dominante (PD) em uma amostra cada um, aparecendo em outras amostras como pólen acessório (PA), mostrando que estas são as principais fontes de coleta de pólen pelas abelhas. *Raphanus sp*, *Trema sp* e o tipo *Poaceae* só apareceram na proporção de pólen isolado importante (PII), indicando que podem se tornar fontes de coleta de pólen se ocorrerem em grande número na área (assim como a espécie *Zinnia elegans* em outubro do mesmo ano). Em outubro de 2005, apenas os tipos *Eucalyptus sp*, *Philodendron sp*, *Arecaceae* podem ser considerados fontes principais de alimentação para as abelhas.

Com relação à influência dos tipos polínicos nos teores de vitamina C, podemos observar que os valores encontrados em outubro de 2005 são cerca de 60% maiores em relação àqueles encontrados em abril do mesmo ano (Tabela 14). Embora, os teores da vitamina C apresentem diferenças estatisticamente significativas entre as duas épocas de coleta, a variação foi pequena em cada uma delas. Pela Tabela 16 podemos observar que os tipos *Arecaceae sp* e *Philodendron sp*, que aparecem nos dois meses de coleta, podem estar contribuindo para o aumento dos teores da vitamina C, pois também aumentaram sua frequência no mês de outubro (de pólen isolado - PI, para pólen acessório - PA). Do mesmo modo, o gênero *Anadenanthera sp*, que aparece no mês de outubro em três lotes como pólen isolado importante (PII) e que não aparece em abril, pode estar contribuindo com o aumento da vitamina C. O tipo *Eucalyptus sp*, único tipo polínico que ocorre com importância nas duas épocas e praticamente com a mesma porcentagem (28,1% em abril e 25,4% em outubro), também pode estar contribuindo para a ocorrência desta vitamina.

Os teores de vitamina E encontrados nas amostras coletadas em outubro de 2005 são aproximadamente a metade em relação àqueles encontrados nas amostras coletadas em abril do mesmo ano (Tabela 10), sendo que, durante as duas épocas de coleta, os teores da vitamina apresentaram pouca variação, apesar das diferenças estatísticas. Através da Tabela 16 observamos que os tipos polínicos *Raphanus sp* (em quatro lotes de abril como PII), *Eucalyptus sp* (em quatro lotes de abril como PA e em um

como pólen dominante - PD) e *Mimosa caesalpineafoli* (em três lotes de abril como PA e em um como PD), que aparecem nos dois meses de coleta, podem estar contribuindo para o aumento dos teores da vitamina E no mês de abril, visto que estes apresentaram maior frequência em relação ao mês de outubro do mesmo ano. Assim como o gênero *Macroptilium sp*, presente apenas em abril de 2005.

Com relação ao β -caroteno, talvez nenhum dos tipos polínicos apresentados na Tabela 16, que são encontrados em outubro de dois anos consecutivos, se correlacione com a presença desse carotenóide. Observa-se que pode haver relação entre os teores de β -caroteno (apenas encontrados nas amostras coletadas em abril de 2005), com o gênero *Raphanus sp* e com a espécie *Mimosa caesalpineafoli*, que aparecem praticamente só em abril (em outubro temos 2 amostras de *Mimosa caesalpineafoli* e uma de *Raphanus sp*, todas como pólen isolado) e com o gênero *Macroptilium sp*, que aparece apenas no mês de abril 2005 com frequência importante.

5.8.1 – Tipos polínicos

Nas Figuras 17, 18 e 19 estão apresentados os tipos polínicos observados em cada um das coletas: outubro de 2004 e em abril e outubro de 2005.

FIGURA 17: Tipos polínicos encontrados nas amostras frescas de pólen apícola coletadas em outubro de 2004.

FIGURA 18: Tipos polínicos encontrados nas amostras frescas de pólen apícola coletadas em abril de 2005.

FIGURA 19: Tipos polínicos encontrados nas amostras frescas de pólen apícola coletadas em outubro de 2005.

Nas Figuras 20, 21 e 22 estão identificados alguns dos tipos polínicos observados nas amostras de pólen apícola coletadas outubro de 2004 e em abril e outubro de 2005.

FIGURA 20: Identificação dos tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.

- (A) *Anadenanthera* sp
- (B) *Cecropia* sp,
- (C e D) *Eucalyptus* sp
- (E) tipo *Myrcia*
- (F) *Philodendron* sp
- (G) tipo *Arecaceae*

FIGURA 21: Identificação dos tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.

- (A1 e A2) *Eucalyptus* sp
- (B1, B2 e B3) *Macroptilium* sp
- (C) *Mimosa caesalpineaeefoliae*

FIGURA 22: Identificação dos tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola.

- (A) *Anadenanthera* sp
- (B1 e B2) *Eucalyptus* sp
- (C) *Philodendron* sp
- (D) tipo *Arecaceae*
- (E) tipo *Myrcia*.

6 – CONCLUSÕES

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

- Os teores de vitaminas das amostras frescas de pólen apícola coletadas em abril de 2005 variaram de 273,9 a 364,7 $\mu\text{g/g}$ de vitamina C; 31,1 a 42,5 $\mu\text{g/g}$ de vitamina E, assim como de 56,3 a 198,9 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno. Essas amostras podem ser consideradas fonte deste carotenóide, visto que mesmo as amostras desidratadas, forneceram 15% do valor pró-vitamínico recomendado de vitamina A, na sua porção diária.
- Os teores das três vitaminas antioxidantes das amostras frescas de pólen apícola coletadas em outubro de 2005 variaram de 13,5 a 17,9 $\mu\text{g/g}$ para a vitamina E e de 537,3 a 560,3 $\mu\text{g/g}$ para a vitamina C. Essas amostras podem ser consideradas fonte de vitamina C, visto que mesmo desidratadas, forneceram 15% do valor recomendado de desta vitamina C, na sua porção diária. Observamos ausência de β -caroteno nas amostras de pólen apícolas coletadas em outubro de 2005.
- Os dois aparelhos foram eficientes na desidratação do pólen apícola, porém esforços devem ser feitos para a otimização do processo, como a diminuição do tempo de processamento e aumento das cargas a serem colocadas nos aparelhos.
- Ocorreram perdas dos teores das vitaminas antioxidantes nos dois tipos de processamentos de desidratação, porém o processamento A (desumidificador Apilani com temperatura entre 29 e 32°C) foi mais eficiente na conservação dos teores das vitaminas frente ao processamento B (estufa Ballardin com temperatura entre 40 e 42°C).
- Durante o período de armazenamento do pólen apícola fresco em freezer ocorreram perdas das vitaminas C e E, visto que detectamos nas amostras desidratadas teores maiores do que nas amostras frescas, tendo estas sido congeladas simultaneamente. Além disso, o processamento de desidratação, embora promova perda vitamínica,

sucessivamente a este fato, auxilia na conservação dos teores das vitaminas em estudo.

- Ocorreram diferenças significativas em relação à origem botânica do pólen coletado entre os meses de abril e outubro, porém ocorreu similaridade entre as amostras de pólen coletadas em outubro de 2004 e 2005.
- Podemos observar uma tendência na relação entre os teores das vitaminas e sua origem botânica, sendo os gêneros *Raphanus sp* e *Macroptilium sp*, juntamente com a espécie *Mimosa caesalpineafoli*, para o β -caroteno; os gêneros *Raphanus sp*, *Eucalyptus sp* e *Macroptilium sp*, juntamente com a espécie *Mimosa caesalpineafoli* para a vitamina E e os gêneros *Anadenanthera sp*, *Arecaceae sp* e *Philodendron sp* para vitamina C.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Stability of vitamins A, E and B complex in infant milks claimed to have equal final composition in liquid and powered form. **J. Food Sci.**, Chicago, v.65, n.6, p.1052-1055, 2000.
- ALMEIDA, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenoids Brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.). **J. Food Compos. Anal.**, Amsterdam, v.1, p.341-352, 1988.
- ALMEIDA, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A de cenouras (*Daucus carota* L.) comercializadas em São Paulo, Brasil. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.23, n.2, p.133-141, 1987a.
- ALMEIDA, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenóides e valor pró-vitamínico A da mandioquinha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) consumidas em São Paulo. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.23, n.1, p.52-57, 1987b.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; FIORINI, F. Composição e valor pró-vitamínico A das vagens macarrão e manteiga, comercializadas em São Paulo, Brasil. **Semina, Ciênc. Agrar.**, Londrina, v.17, n.1, p.49-52, 1996.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; FIORINI, F.; PENTEADO, M.V.C. Provitamin A evaluation of external and internal leaves of cabbage (*Bassica oleracea* L. var. capitata L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.15, n.2, p.108-111, 1995.

* 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.

- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MAGRI, L.M.; RIOS, M.D.G. Chemical characterization of Brazilian beet leaves: provitamin A value with and without the saponification step for raw and cooked samples. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, v.136, n.7, p.537-542, 1997.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **J. Food Compos. Anal.**, Amsterdam, v.18, n.1, p.105-111, 2005.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenóides. In: PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003a. p.3-52.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina A. In: PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003b. p.54-74.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; POPP, V.; FARIAS, M.P. Provitamin A activity of Brazilian carrots leaves and roots, raw and cooked and their chemical composition. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.17, n.2, p.120-124, 1997.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; RIOS, M.D.G.; SASAKI, R. Determination of provitamin A of green leafy vegetables by high performance liquid chromatography and open column chromatography. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, v.137, n.7, p.290-294, 1998.
- 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.

ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.C.C.; SILVA, E.C.A.; SILVA, R.M.B.; TEIXEIRA, E.W.; OTSUK, I.P. Quantidade diária de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.): efeito da suplementação protéica sobre a quantidade de pólen coletado e o desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) usando diferentes modelos de coletores. **Bol. Ind. Anim.**, Nova Odessa, v.54, n.1, p.97-102, 1997a.

ALVES, M.L.T.M.F.; SILVA, E.C.A.; MORETI, A.C.C.C.; SILVA, R.M.B. Efeito da suplementação protéica sobre a quantidade de pólen coletado e o desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). **Bol. Ind. Anim.**, Nova Odessa, v.54, n.1, p.85-89, 1997b.

AMAN, R.; BAYHA, S.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Determination of carotenoid stereoisomers in commercial dietary supplements by high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, p.6086–6090, 2004.

ANTONELLI, M.L.; DÁSCENZO, G.; LAGANÀ, A.; PUSCEDDU, P. Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination. **Talanta**, Amsterdam, v.58, p.961-967, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Vitamins and other nutrients. In: _____. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. cap.45, p.16-18.

ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **J. Food Compos. Anal.**, Amsterdam, v.16, n.6, p.647-657, 2003.

BALL, G.F.M. **Bioavailability and analysis of vitamins in foods**. London, New York: Chapman & Hall, 1998. p.163-193.

BALL, G.F.M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London, New York: Chapman & Hall, 1994. p.79-93.

BARRETO, L.L.R.C.; RABELO, P.C.; BELÉZA, C.O. Perfil protéico do pólen coletado por *Apis mellifera* L. (Híbrida africanizada) no período outono-inverno no apiário 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. **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.

BASTOS, D.H.M.; BARTH, O.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S.; MICHELAN, M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **J. Apic. Res.**, Cardiff, v.43, n.2, p.35-39, 2004.

BASTOS, D.H.M.; ROCHA, C.I.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; TORRES, E.A.S. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.62, n.3, p.239-244, 2003.

BASU, T.K.; DICKERSON, J.W.T. **Vitamins in human health and disease**. Wallingford: CAB International Press, 1996. p.125-147.

- BELL, R.R.; THORNBUR, J.; SEET, J.L.L.; GROVES, M.T.; HO, N.P.; BELL, D.T. Composition and protein quality of honeybee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. **J. Nutr.**, Bethesda, v.113, p.2479-2484, 1983.
- BENDER, D.A.; BENDER, A.E. **Nutrition, a reference handbook**. Oxford, New York: Oxford University Press, 1997. p.416-419.
- BERMAN, K.; BRODATY, H. Tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's diseases and other neurodegenerative disorders. **CNS Drugs**, Auckland, v.18, n.12, p.807-825, 2004.
- BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.V.C. Carotenóides de pimentões amarelos (*Capsicum annuum* L.): caracterização e verificação de mudanças com o cozimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.18, n.3, p.283-288, 1998.
- BIANCHINI, R.; PENTEADO, M.V.C. Teores de retinol, β -caroteno e α -tocoferol em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.19, n.3, p.349-355, 1999.
- BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina E. In: PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003. p.123-164.
- 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: 09/01/06.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Portaria n.31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais, constante do anexo desta Portaria. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=64&word=>. Acesso em: 09/01/06.

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

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. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, p.742-745, 2003.

CARVALHO, C.R.L.; CARVALHO, P.R.N.; COLLINS, C.H. High-performance liquid chromatographic determination of the geometrical-isomers of β -carotene in several foodstuffs. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.697, n.1/2, p.289-294, 1995.

- CARVALHO, C.A.L.; MORETI, A.C.C.C.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R.M.O.; OLIVEIRA, P.C.F. Pollen spectrum of honey of "uruçu" bee (*Melipona scutellaris* Latraielle, 1811). **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v.61, n.1, p.63-67, 2001.
- CASTELLINI, C.; BOSCO, A.D.; BERNARDINI, M. Improvement of lipid stability of rabbit meat by vitamin E and C administration. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.81, p.46-53, 2000.
- COHEN, S.H.; YUNGINGER, J.W.; ROSENBERG, N.; FINK, J.N. Acute allergic reaction after composite pollen ingestion. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Orlando, v.64, p.270-274, 1979.
- COLLIN, S.; VANHAVRE, T.; BODART, E.; BOUSETA, A. Heat treatment of pollens: impact on their volatile flavour constituents. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.444-448, 1995.
- CONNELL, P.J.O.; GORMALLY, C.; PRAVDA, M.; GUILBAULT, G.G. Development of an amperometric L-ascorbic acid (Vitamin C) sensor based on electropolymerised aniline for pharmaceutical and food analysis. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.431, p.239-247, 2001.
- CORNEJO, L.G. **Pólen**: tecnologia de su produccion, procesado, y comercializacion. Buenos Aires: IPTEA, 1994. 114p.
- COSTA, M.A.L.; PENTEADO, M.V.C. Alterações decorrentes de dois tipos de cozimento sobre os teores de carotenóides pró-vitamínicos A em escarolas (*Cichorium endivia* L.). **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.32, n.2, p.95-100, 1996.

COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977, 262p.

COZZOLINO, S.M.F., org. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005. 878p.

CRANE, E. **O livro do mel**. São Paulo: Nobel, 1983. 226p.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W., ed. **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. 2.ed. London, New York: Academic Press, 1976. v.2, p.38-165.

DJENANE, D.; SANCHEZ-ESCALANTE, A.; BELTRÁN, J.A.; RONCALÉS, P. Ability of α -tocopherol, taurine and rosmariny, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. **Food Chem.**, Amsterdam, v.76, p.407-415, 2002.

DIETARY Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc (2000). Disponível em: <http://books.nap.edu/books/0309072794/html>. Acesso em: 09/01/06.

DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S., coords. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403p.

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

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; MCGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D.M.; TRUSCOTT, T.G.; YOUNG, A. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem.**

Biophys., New York, v.430, p.37-48, 2004.

ELLIOT, J.G. Application of antioxidant in foods and beverages. **Food Technol.**, Chicago, v.53, n.2, p.46-48, 1999.

ERDTMAN, O.G.E. **Pollen morphology and plant taxonomy**: angiosperms. Watham: Chronica Botânica; Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1952. 539p. (Introduction to Palynology, 1).

FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M. Composição bromatológica e mineral do pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* na região de Botucatu (SP). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, Florianópolis, 2000. **Anais**. Florianópolis: CBA, 2000. 1 CD-Room.

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

GIMÉNEZ, R.; CABRERA, C.; OLALLA, M.; RUIZ, M.D.; LÓPEZ, M.C. Ascorbic acid in diet supplements: loss in the manufacturing process and storage. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Basingstoke, v.53, p.509-518, 2002.

GÖKMEN, V.; KAHRAMAN, N.; DEMIR, N.; ACAR, J. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.881, n.1/2, p.309-316, 2000.

GREGORY III, J.F. Vitamins. In: FENNEMA, O.R., ed. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.531-568. (Food science and technology).

- HAKIM, H. Le pollen – aliment médicamente. Faculté de Médecine de Bordeaux, Paris, França, 37p., 1994 *apud* LENGLER, S. **Pólen apícola**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 16p.
- HERBET Jr., E.W.; SHIMANUKI, H. An evaluation of seven potential pollen substitutes for honey bees. **Am. Bee J.**, Hamilton, v.120, n.5, p.349-350, 1980.
- HERBET Jr., E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, Les Ulis, v.9, n.1, p.33-40, 1978.
- HORWITT, M.K. International symposium on vitamin E. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.27, p.939-1194, 1974.
- IANNUZZI, J. Pollen: food for honey bee and man? III. **Am. Bee J.**, Hamilton, v.133, n.8, p.557-563, 1993.
- JACOB, R.A. Vitamin C. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C., eds. **Modern nutrition in health and disease**. 9.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.467-484.
- KILCAST, D. Effect of irradiation on vitamins. **Food Chem.**, Amsterdam, v.49, p.157-164, 1994.
- KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. Rome: FAO, 1996. 87-113p. (FAO Agricultural Services Bulletin, v.124).

KRINSKY, N.I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, New York, v.17, n.10, p.815-817, 2001.

KRINSKY, N.I.; MATHEWS-ROTH, M.M.; TAYLOR, R.F., eds. **Carotenoids: chemistry and biology**. New York: Plenum Press, 1989. 382p. (Based on the proceedings of the eighth International Symposium on Carotenoids, held 1987, in Boston, Massachusetts).

KURILICH, A.C.; JUVIK, J.A. Simultaneous quantification of carotenoids and tocopherols in corn kernel extracts by HPLC. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, Philadelphia, v.22, n.19, p.2925-2934, 1999.

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

LANE, J.R.; WEBB, L.W.; ACUFF, R.V. Concurrent liquid chromatographic separation and photodiode array detection of retinol, tocopherols, all-trans- α -carotene, all-trans- β -carotene and the mono-cis isomers of β -carotene in extracts of human plasma. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.787, n.1/2, p.111-118, 1997.

LEVINE, M.; RUMSEY, S.; WANG, Y.; PARK, J.; KWON, O.; XU, W.; AMANO, N. Vitamin C. In: ZIEGLER, E.E.; FILER Jr., L.J., eds. **Present knowledge in nutrition**. 7.ed. Washington: ILSI Press, 1996. p.147-159.

LIEBELT, R.A.; LYLE, D.; WALKER, J. Effects of a bee pollen diet on survival and growth of inbred strains of mice. **Am. Bee J.**, Hamilton, v.134, n.9, p.615-620, 1994.

LINSKENS, H.F.; JORDE, W. Pollen as food and medicine: a review. **Econ.**

Bot., New York, v.51, n.1, p.78-87, 1997.

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**, Les Ulis, v.11, n.1, p.63-73, 1980.

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

MACHLIN, J.L. Vitamin E. In: MACHLIN, J.L. **Handbook of vitamins**. 2.ed.
New York: Marcel Dekker, 1991. cap.3, p.99-145. (Food science and
technology, 40).

MANSFIELD, L.E.; GOLDESTINE, G.B. Anaphylatic reaction after ingestion of
local bee pollen. **Ann. Allergy**, McLean, v.47, p.154-156, 1981.

MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; TEIXEIRA, E.W.; SILVA, E.C.A.;
RODRIGUES, R.R.; SOUZA, V.C. Plantas visitadas por abelhas
africanizadas em duas localidades do Estado de São Paulo. **Sci. Agric.**,
Piracicaba, v.58, n.2, p.413-420, 2001.

MATA, L.O.A.L.T. Noções de melissopalynologia. In: PRODUÇÃO de pólen.
Pindamonhangaba: Instituto de Zootecnia do Centro de Apicultura
Tropical, 1997. p.16-23.

MEYDANI, M. Vitamin E. **Lancet**, London, v.345, p.170-175, 1995.

MINITAB® Release 14.1.0 (Minitab.Inc) – 1972-2005.

MIQUEL, E.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; CLEMENTE, G.

Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.14, p.1003-1011, 2004.

MORENO, F.S.; RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; PENTEADO, M.V.C.

Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, Oxford, v.12, n.10, p.1817-1822, 1991.

MORENO, F.S.; WU, T.S.; PENTEADO, M.V.C.; RIZZI, M.B.S.L.; JORDÃO, A.A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; DAGLI, M.L.Z.

A comparison of beta-carotene and vitamina A effects on a hepatocarcinogenesis model. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Bern, v.65, n.2, p.87-94, 1995.

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. 89p.

MUNITEGUI, S.; SANCHO, M.T.; LOPEZ, J.; HUIDOBRO, J.F.; SIMAL, J.

Determination of carotenes from bee-collected pollen by high performance liquid chromatography. **J. Apic. Res.**, Cardiff, v.29, n.3, p.147-150, 1990.

MUNTEANU, A.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E: myth or reality? **J. Cell. Mo. Med.**, Bucharest, v.8, n.1, p.59-76, 2004.

- 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. **Nutr. Res.**, Orlando, v.22, p.519-526, 2002.
- NIELSEN, N.; GRÖMMER, J.; LUNDÉN, R. Investigation on the chemical composition of pollen from some plants. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.9, n.7, p.1100-1105, 1955.
- NISHINO, H.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y.; MASUDA, M.; BU, P.; ONOZUKA, M.; YAMAGUCHI, S.; OKUDA, Y.; TAKAYASU, J.; TSURUTA, J.; OKUDA, M.; ICHIISHI, E.; MURAKOSHI, M.; KATO, T.; MISAWA, N.; NARISAWA, T.; TAKASUKA, N.; YANO, M. Cancer prevention by carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, Research Triangle Park, v.71, n.12, p.2273-2278, 1999.
- PAIVA, S.A.R.; RUSSEL, R.M. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **J. Am. Coll. Nutr.**, Denville, v.18, n.5, p.426-433, 1999.
- PALACE, V.P.; KHAPER, N.; QIN, Q.; SINGAL, P.K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.26, n.5/6, p.746-761, 1999.
- PASSOTO, J.A.; PENTEADO, M.V.C.; MANCINI-FILHO, J. Oxidative resistance and antioxidative activity of some carotenoids in food. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, v.134, n.6, p.306-311, 1994.
- PENTEADO, M.V.C., org. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003. 612p.

PENTEADO, M.V.C.; ALMEIDA, L.B. Ocorrência de carotenóides em raízes de cinco cultivares de mandioca (*Manihot wsculenta* Crantz.) do Estado de São Paulo. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.24, n.1, p.39-49, 1988.

PRESOTO, A.E.F.; RIOS, M.D.G.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. HPLC determination of alpha-tocoferol, beta-carotene and proximate analysis of Brazilian parsley leaves. **Boll. Chim. Ig.**, Milano, n.7, p.111-114, 2000.

PRICE, K.D.; PRICE, C.S.C.; REYNOLDS, R.D. Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.158, p.1-12, 2001.

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

RIOS, M.D.G. **Efeitos da radiação ionizante de ⁶⁰Co sobre as concentrações de α -tocoferol e ácido ascórbico em alho (*Allium sativum* L.)** São Paulo, 2001. 76p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

RIOS, M.D.G.; PENTEADO, M.V.C. Determinação de α -tocoferol em alho irradiado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Quím. Nova**, São Paulo, v.26, n.1, p.10-12, 2003a.

RIOS, M.D.G.; PENTEADO, M.V.C. Vitamin C. In: PENTEADO, M.V.C., org.

Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003. p.201-225.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Carotenoids and food preparation:** the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. Arlington: OMNI, 1997. 88p.

RODRIGUEZ, D.B., RAYMUNDO, L.C., LEE, T.C., SIMPSON, K.L., CHICHESTER, C.O., Carotenoids pigments changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Ann. Bot.**, London, n.40, p. 615-624, 1976.

ROJAS, A.M.; GERSCHENSON, L.N. Ascorbic acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.81, p.1433-1439, 2001.

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

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; ANCOS, B.; CANO, M.P. Vitamin, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, p.647-853, 2003.

SANT'ANNA, Z.M.; PENTEADO, M.V.C. Alterações dos carotenóides decorrentes do cozimento convencional e em forno microondas de três hortaliças. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.32, n.1, p.53-58, 1996.

SCHMIDT, J.O. Bee products: chemical composition and application. In: MIZRAHI, A.; LENSKEY, Y., eds. **Bee products:** properties, applications and apitherapy. New York: Plenum Press, 1997. p.15-26. (Proceedings of

an International Conference on Bee Products: properties, applications, and apitherapy, held may 26-30, 1996, in Tel Aviv, Israel). p.15-26.

SCHMIDT, J.O.; BUCHMANN, S.L. Other products of hive. In: GRAHAM, J.M.; AMGROSE, J.T.; LANGSTROTH, L.L., eds. **The hive and te 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.

SCHMIDT, J.O.; SCHMIDT, P.J. Pollen digestibility and its potential nutritional value. **Glean. Bee Cult.**, Medina, v.112, p.320-322, 1984.

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

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

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

SILVA, S.R.; MERCADANTE, A.Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.22, n.3, p.254-258, 2002.

SILVA, R.M.B.; MORETI, A.C.C.C.; SILVA, E.C.A.; ALVES, M.L.T.M.F. Fluxo nectarífero na região de Pindamonhangaba, SP. I. Períodos de secreção. **Bol. Ind. Anim.**, Nova Odessa, v.52, n.1, p.23-28, 1995.

SILVA, R.M.B.; SILVA, E.C.A.; MORETI, A.C.C.C.; ALVES, M.L.T.M.F. Levantamento e estudo da flora apícola do Vale do Paraíba. **Zootecnia**,

Nova Odessa, v.31, n.2, p.59-67, 1993.

SILVA, R.M.B.; SILVA, E.C.A.; MORETI, A.C.C.C.; ALVES, M.L.T.M.F.
Período de fluxo nectarífero na região de Pindamonhangaba, SP:
calendário apícola. **Zootecnia**, Nova Odessa, v.33, n.4, p.137-142, 1995.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen**: biology, biochemistry,
management. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1974. 307p.

TAI, C.Y.; CHEN, B.H. Analysis and stability of carotenoids in the flowers of
daylily (*Hemerocallis disticha*) as affected by various treatments. **J. Agric.
Food Chem.**, Columbus, v.48, p.5962-5968, 2000.

TANG, B.; WANG, Y.; DU, M.; GE, J.; CHEN, Z. Catalytic spectrophometric
determination of ascorbic acid in tea drink with 1,5-bis(p-
hydroxybenzaldene)thiocarbohydrazone as the substrate for horseradish
peroxidase. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, p.4198-4201, 2003.

TRIGUEIRO, I.N.S.; PENTEADO, M.V.C. Mudanças nos teores de alfa e beta
caroteno em óleo de dendê durante o armazenamento a temperatura
ambiente (26° C). **Bol. CEPPA**, Curitiba, v.11, n.1, p.1-10, 1993.

VIDAL-VALVERDE, C.; RUIZ, R.; MEDRANO, A. Effects of frozen and other
storage conditions on α -tocoferol content of cow milk. **J. Dairy Sci.**,
Urbana, v.76, p.1520-1525, 1993.

VILLANUEVA, M.T.O.; MARQUINA, A.D.; SERRANO, R.B.; ABELLÁN, G.B.
The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its
composition. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Basingstoke, v.53, n.3, p.217-224,
2002.

- VIVINO, A.E.; PALMER, L.S. The chemical composition and nutritional value of pollens collected by bees. **Arch. Biochem.**, New York, v.4, p.129-136, 1944.
- WINSTON, M.L. **The biology of the honey bee**. Cambridge: Harvard University Press, 1987. 281p.
- WITHERELL, P.C. Otros productos de la colmena. In: DADANT, E. **La colmena y la abeja mellifera**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1975. p.684.
- WOJCICKI, J.; SAMOCHOWIEC, L.; BARTLOMOWICZ, B.; HINEK, A.; JAWORSKA, M.; GAWRONSKA-SZKARZ, B. Effect of atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.62, p.39-45, 1986.
- ZERDIN, K.; ROONEY, M.L.; VERMUE, J. The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. **Food Chem.**, Amsterdam, v.82, p.387-395, 2003.
- ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chem.**, Amsterdam, v.88, p.503-509, 2004.
- 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*. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.38, p.735-738, 1995.

ZHAO,B.; THAM,S.; LU,J.; LAI,M.H.; LEE,L.K.H.;MOOCHHALA,S.M.

Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **J. Pharmaceut Sci**, Edmonton, v.7, n.2, p.200-204,2004.