Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

NÃO LIGAR
23676

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

GELÉIA REAL: Análises físico-químicas e químicas úteis para a caracterização e detecção da autenticidade ou adulteração do produto

Luis Henrique Garcia-Amoedo

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Ligia B. de Almeida-Muradian

São Paulo
1999

T
641
G216g

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

GELÉIA REAL: Análises físico-químicas e químicas úteis para a caracterização e detecção da autenticidade ou adulteração do produto

Luis Henrique Garcia-Amoedo

Dissertação para a obtenção do grau de MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Ligia B. de Almeida-Muradian

São Paulo
1999

16049

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002389

Ficha Catalográfica

Garcia-Amoedo, Luis Henrique
Geléia real: análises físico-químicas e químicas para a caracterização e detecção da autenticidade ou adulteração do produto / Luis Henrique Garcia-Amoedo. -- São Paulo, 1999.
69p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Almeida-Muradian, Ligia Bicudo

1. Ciência dos Alimentos 2. Geléia real: Ciência dos alimentos 3. Fraudes: Ciência dos Alimentos I.T. II. Almeida-Muradian, Ligia Bicudo, orientador.

Luis Henrique Garcia-Amoedo

GELÉIA REAL: Análises físico-químicas e químicas úteis para a caracterização e detecção da autenticidade ou adulteração do produto

Comissão Julgadora

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida-Muradian
Orientador / Presidente

Profa. Dra. Maria Apparecida Pourchet-Campos
1º Examinador

Profa. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez
2º Examinador

São Paulo, 02 de Junho de 1999.

SUMÁRIO

Assunto	página
1. Introdução	4
2. Revisão de literatura	7
3. Objetivo	18
4. Material e métodos	
4.1. Material - Geléia real	19
4.1.1. Preparo das amostras	19
a) Amostras ao natural	19
b) Amostras adulteradas	19
4.2. Métodos	
4.2.1. Composição Centesimal	20
a) Determinação da umidade	20
b) Determinação do resíduo mineral fixo	22
c) Determinação do teor lipídico	22
d) Determinação de nitrogênio total/proteínas	22
e) Determinação do teor de carboidratos	23
4.2.2. Determinação da acidez titulável	23
4.2.3. Determinação eletrométrica do pH	23
4.2.4. Determinação do teor do 10-HDA (ácido 10-hidroxi-trans-2-decenoico)	23
4.2.5. Determinação de vitaminas	25
a) Teor de vitamina B_6 (piridoxina)	25
b) Determinação do teor de β-caroteno	26
c) Determinação dos teores de vitamina E e de vitamina A	27
4.2.6. Análise das amostras adulteradas	28
a) Verificação da presença de amido com lugol	28
b) Verificação da solubilidade em meio alcalino	29

5. Resultados e discussão 30
5.1. Composição centesimal 30
a) Determinação de umidade 30
b) Determinação do resíduo por incineração 39
c) Determinação do teor lipídico 39
d) Determinação de proteínas 40
e) Determinação de carboidratos 41
5.2. Determinação da acidez titulável 42
5.3. Determinação eletrométrica do pH 44
5.4 Determinação do teor de 10-HDA 45
5.5. Determinação do teor de vitamina B_6 51
5.6. Determinação do teor de β-caroteno, e vitaminas A e E 53
5.7. Análises das amostras adulteradas 53
6. Conclusões
6.1. Ácido 10-hidrosi-trans-2-decenóico (10-HDA) 58
6.2. Composição centesimal 58
6.3. Análise de algumas vitaminas na geléia real 59
6.4. Fraudes na geléia real 59
7. Referências bibliográficas 61
Resumo 68
Summary 69

1- INTRODUÇÃO

A geléia real é uma substância viscosa, de coloração branco-amarelada ou branco-acinzentada, levemente opalescente, de odor característico e pungente, porém não desagradável ou rançoso.

Ela é secretada pelas glândulas mandibulares hipofaríngeas das abelhas operárias jovens. A geléia real é um dos produtos mais importantes para a colméia, pois serve de alimento para as larvas em desenvolvimento, e para a abelha rainha por toda a sua vida.

Ela é produzida quando as abelhas dispõem de água, pólen, mel e temperatura conveniente. Sua função reguladora na colméia é fundamental.

Pertencentes à classe *Insecta*, ordem *Hymenoptera*, sub-ordem *Apócrita*, superfamilia *Apoidea*, família *Apideae*, gênero e espécie *Apis mellifera*, as abelhas são também conhecidas por abelhas do reino, abelhas melíferas ou simplesmente abelhas.

As abelhas são insetos de vida social que vivem colméias (sociedades organizadas), nas quais é possível encontrar três espécies de indivíduos: uma rainha, algumas centenas de zangões e milhares de operárias. A abelha rainha é a fêmea fértil, os zangões são os machos, e as abelhas operárias, que são a maioria absoluta na colméia, são fêmeas não férteis.

A determinação do sexo nas abelhas, está relacionada com a fecundação do ovo. Ovos não fecundados geram indivíduos partenogenéticos, hemizigóticos, machos haplóides. Em ovos fecundados, os indivíduos heterozigóticos resultam em fêmeas, e os homozigóticos, em machos diplóides.

Já a determinação de castas, segue um mecanismo no qual o fator determinante envolve a quantidade e a qualidade do alimento oferecido à larva. O ovo (e mais tarde a larva) destinado a ser a abelha rainha de uma colméia, não é diferente, sob o ponto de vista genético, de qualquer outro ovo ou larva. Até o quarto dia do estágio larval não é possível notar qualquer diferença anatômica ou funcional entre estes. Pelos três primeiros dias,

todas as larvas são alimentadas com geléia real. No quarto dia, a alimentação é modificada quantitativa e qualitativamente: a larva da abelha que foi aleatoriamente escolhida para ser a rainha da colméia, continua a ser alimentada com uma dieta rica em geléia real por toda a sua vida. Por outro lado, as larvas destinadas a serem abelhas operárias passam a ser alimentadas regularmente com mel e pólen.

A partir de tal diferença na alimentação das larvas, algumas modificações ocorrem: a abelha rainha cresce mais e mais rapidamente que as outras abelhas. Ela desenvolve órgãos sexuais, ferrão retrátil (que é usado para defender o seu governo da colméia, mas não a colméia), curvatura, e vive cerca de 3 ou 4 anos. Ela não desenvolve ferramentas de trabalho, como glândulas especiais de secreção, ou corbículas para coleta de pólen. Entretanto, ela irá produzir ovos por toda a sua vida, o que pode chegar ao equivalente a duas vezes e meia o seu próprio peso corporal, diariamente. Essa grande diferença no desenvolvimento é baseada somente em sua dieta exclusiva e rica em geléia real.

As abelhas operárias, no curto período de vida que possuem (cerca de 4 semanas), desempenham várias tarefas como a construção dos alvéolos de cera onde posteriormente serão armazenados o mel e o pólen, e a coleta de néctar e de pólen das flores para produzir mel e alimentar a colônia. Elas elaboram o mel, alimentam e cuidam dos ovos e larvas em desenvolvimento, e defendem a colméia com o ferrão venenoso que têm na extremidade do abdome[25].

A indiscutível vitalidade que a dieta rica em geléia real proporciona à abelha rainha, tem incitado o interesse do público que busca a fórmula da longevidade. Em 1991 foi publicado um artigo na revista norte-americana "Newsweek" intitulado "Outsmart your genes, be young forever", que apregoou a geléia real, como sendo a única substância no mundo capaz de desacelerar o curso natural do relógio biológico que determina o tempo de vida no reino animal.

A promoção do produto geléia real ainda vai além. É bastante comum hoje em dia, vermos declarações em materiais promocionais distribuídos nos

locais de venda de produtos naturais e/ou apícolas, acerca dos benefícios que podem ser obtidos com o uso de geléia real. Bem-estar geral, embelezamento dos cabelos, da pele e das unhas, melhora no desempenho físico e intelectual, diminuição do "stress", suplementação vitamínica e mineral, são exemplos destes benefícios, os quais se tornam ainda mais evidentes, quando o uso da geléia real é associado a outros produtos da colméia e a vegetais.

No mercado varejista, são comuns os exemplos de méis adicionados de outros derivados da apicultura, como própolis, pólen e geléia real. Embora não se conheça a existência de Padrão de Identidade e Qualidade para estes produtos, nem para os méis adicionados deles, é cada vez mais freqüente sua oferta ao consumidor, com o propósito de fornecer produtos mais saudáveis, normalmente associados ao consumo de alimentos naturais.

Pretende-se no presente trabalho, realizar as análises físico-químicas e químicas que poderão ser usadas para a caracterização da geléia real, enfatizando-se a determinação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico. Tais análises proporcionarão maior conhecimento do produto, o que auxiliará em sua identificação e na verificação de adulteração, quer seja no produto puro ou em misturas (como por exemplo geléia real adicionada ao mel).

Assim, a proposta deste trabalho é justificada pela falta de legislação com relação a Padrões de Identidade e Qualidade da geléia real.

Os resultados obtidos nas análises de caracterização, ainda poderão fornecer dados para atualização da Tabela Nacional de Composição de Alimentos, contribuindo assim, com projeto do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Universidade de São Paulo.

2- REVISÃO DE LITERATURA

SWAMMERDAN segundo JOHANSSON (1955)[49] pode ter sido o primeiro investigador a tentar entender sobre a geléia real, quando em 1673, sugeriu o termo mel salivar para tal substância produzida pelas abelhas, e que era descrita da seguinte forma:

"... parece uma goma suave de amido, ou goma tragacante, com odor; tem cor de âmbar puro e sabor algo ácido..."

A partir desta elementar descrição de um produto aparentemente simples, iniciaram-se estudos que buscavam conhecer não somente a utilização da geléia real pelas abelhas, como também sua composição.

Somente no século seguinte, em 1740, RÉAUMUR segundo JOHANSSON (1955)[44] chegou à uma descrição mais aproximada do que se conhece atualmente sobre a geléia real, sua função na colméia, e seu decisivo papel na determinação das castas entre as abelhas.

Em 1888, a composição química (teor de proteína, gordura e glicose) da geléia real foi publicada por PLANTA, segundo HAYDAK 1943[42] .

Elaborando dietas que continham geléia real e administrando-as a ratos, EVANS *et al.*[15], em 1937, estabeleceram as relações entre a quantidade de vitamina E presente na geléia real e a fertilidade dos animais. Segundo os autores nenhuma atividade vitamínica E foi encontrada tanto na geléia real integral, como em suas frações lipofílicas.

HAYDAK & PALMER (1942)[22] utilizaram bio-ensaios para determinar o teor de vitamina B_6 (piridoxina) na geléia real e no pólen. Valores de cerca de 50 μg/g e 5 μg/g, respectivamente, foram encontrados.

PRATT & HOUSE (1949)[43] fizeram um trabalho para a identificação dos aminoácidos presentes na geléia real por cromatografia em papel, e os separaram em aminoácidos livres e aminoácidos que compõem proteínas.

Em 1951, WEAVER & KUIKEN[54] realizaram análises quantitativas de aminoácidos em amotras de geléia real e em amostras de seis tipos de pólen. A partir do fato de que as abelhas alimentam todas as larvas da colméia com geléia real pelos três primeiros dias, e em seguida com mel e

pólen (ficando a geléia real somente para a larva destinada a ser a abelha rainha), os autores buscaram descobrir uma possível diferença na composição de aminoácidos, que fosse responsável pelo decisivo papel que a geléia real desempenha na determinação das castas entre as abelhas. Como resultados, os pesquisadores verificaram que as porcentagens dos aminoácidos pesquisados (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) eram similares em todos os pólens e na geléia real, de onde puderam concluir que a substância responsável pela diferenciação não era um aminoácido.

HAYDAK lançou em 1943[21] um trabalho de revisão, do que se sabia na época, a respeito da alimentação da larva e o desenvolvimento das castas em abelhas.

Uma nova revisão sobre geléia real foi publicada por WILLSON[57] em 1955. Na primeira parte, o autor descreveu aspectos científicos a respeito da geléia real, dados de composição centesimal (umidade, matéria seca, proteínas, gorduras, cinzas e pH), além de um esquema ilustrativo das glândulas que produzem a geléia real nas abelhas. Na segunda parte[58], foram abordados alguns aspectos da produção, cuidados que devem ser tomados, os usos e pesquisas que estavam sendo desenvolvidas.

Dando continuidade aos trabalhos já iniciados em 1951 (WEAVER & KUIKEN)[54], WEAVER[53] demonstrou, em 1955, que há uma substância ou um grupo de substâncias presentes na geléia real, que iniciam ou controlam a diferenciação das larvas em abelhas rainhas. O autor descreveu que esta substância (ou grupo de substâncias) é altamente lábil, não promovendo o mesmo efeito quando a geléia real permanece armazenada por algum tempo; a privação desta substância não permite que as mesmas larvas se desenvolvam em abelhas rainhas, gerando assim abelhas operárias.

Em 1956, ARDRY[2] publicou um trabalho como "Contribution à l'étude de la gelée royale", e o dividiu em três partes. Na primeira parte apresentou as características físico-químicas e imunológicas da geléia real, na segunda parte, realizou estudos histoquímicos e na terceira parte, estudos hematológicos.

HABOWSKY & SCHUEL[20] fizeram, em 1959, a separação dos constituintes protéicos da geléia real por eletroforese contínua em papel.

A identificação do ácido 10-hidroxi-Δ2-decenóico (10-HDA) foi descrita por Barker *et al.*[4], em 1959.

Em 1959, TOWNSEND *et al.*[51] descreveram a atividade do ácido 10-HDA contra a leucemia experimental e tumores ascíticos. No experimento, os autores prepararam suspensões de células de baço de camundongos que haviam morrido de leucemia expontânea; às suspensões foram adicionadas quantidades de geléia real "in natura", frações das amostras de geléia real, ou tampão de ácido cítrico ou fosfórico. As misturas foram então agitadas, seus pH determinados e imediatamente injetadas subcutaneamente nos animais. Cada camundongo recebeu entre 2 e 5 milhões de células. Suspensões de células tumorais foram preparadas de modo semelhante. Os estudos da atividade anti-tumoral foram conduzidos em três linhas: linfosarcoma, carcinoma mamário e carcinoma de Ehrlich. As misturas preparadas foram injetadas intra-peritonealmente, e cada camundongo recebeu entre 5 e 8 milhões de células. Em ambos os casos, o critério observado foi o da sobrevivência dos ratos e o desenvolvimento de tumores. Neste trabalho os autores verificaram que 30 mg de geléia real fresca por mililitro da suspensão de células inibiu por completo o desenvolvimento de leucemia transplantável. O efeito foi somente obtido quando a mistura contendo o material ativo foi adicionado antes da injeção nos animais. A atividade anti-leucêmica somente foi obtida quando o pH da suspensão estava abaixo de 6,0. Para os casos de tumores ascíticos, os autores verificaram que cerca de 100 mg de geléia real fresca por mililitro da suspensão de células foram requeridos para uma proteção completa. Em doses menores que essas, o desenvolvimento dos tumores foi retardado em 5 ou 6 dias. Da mesma forma que o ocorrido nos experimentos com células leucêmicas, o efeito antitumoral somente foi observado quando a mistura de geléia real foi feita à suspensão de células antes da injeção nos animais, e quando o pH da suspensão era ácido.

A atividade antibiótica do 10-HDA foi motivo de estudo para BLUM et al [7]; em 1959 os autores publicaram que o 10-HDA é o maior componente da fração lipídica da geléia real, e que apresenta atividade antibiótica contra bactérias e fungos. Conforme os autores, este ácido graxo apresenta atividade de até 1/4 da atividade da penicilina contra *Micrococcus piogenes*, e de até 1/5 da atividade da clortetraciclina contra *Escherichia coli*. Verificaram ainda, diminuição no desenvolvimento de *Neurospora sitophila* e de algunas leveduras não identificadas até o momento da pesquisa. Os autores notaram que o sal deste composto é consideravelmente menos ativo que o ácido livre.

Por meio de estudos eletroforéticos dos componentes protéicos da geléia real, PATEL *et al.* (1960)[40] buscaram estabelecer um padrão da composição das proteínas da geléia real oferecida às larvas, de acordo com a idade da larva, e casta a que pertence. Suas verificações mostraram que não há diferenças qualitativas aparentes entre as proteínas presentes na geléia real de larvas jovens de rainhas, operárias e zangões.

Dando continuidade aos trabalhos iniciados anteriormente, em busca de diferenças qualitativas e quantitativas dos componentes da geléia real conforme a idade das larvas e a diferenciação das castas, PATEL *et al.* (1961)[41] fizeram uma investigação cromatográfica dos constituintes da geléia real solúveis em uma mistura de metanol e clorofórmio.

BROWN *et al.* (1961)[8] descreveram alguns componentes da geléia real como os ácidos 10-hidroxidecanóico e p-hidroxibenzóico, e o esteróide 24-metileno-colesterol.

Baseando-se no fato de que vários trabalhos sistemáticos de investigação haviam sido feitos na década de 50, onde foram descobertas várias substâncias ativas presentes na geléia real, e comparativamente, pouco se sabia a respeito de compostos fosforados presentes na geléia real. MARKO *et al.* (1964)[36] utilizando técnicas de cromatografia em coluna, separaram nucleotídeos da adenina, guanidina, citidina, uridina, e inosina monofosfato.

DIXIT & PATEL (1964)[14] realizaram experimentos nos quais extraíram da geléia real uma substância com atividade insulínica. Tal substância, quando em sistema eletroforético, apresentou mobilidade idêntica à da insulina, no entanto, a imunorreatividade com antígenos anti-insulina provenientes de cobaias, não ocorreu.

REMBOLD (1965)[45] escreveu uma revisão bastante ampla a respeito das substâncias biologicamente ativas, importantes para a biologia das abelhas, que estão presentes na geléia real.

Contribuindo para o conhecimento da fração lipídica da geléia real, em 1969, WEAVER *et al.*[55] isolaram e identificaram três componentes na geléia real: os ácidos 8-hidroxi-octanóico, 3-hidroxi-decanóico e o 3,10-dihidroxi-decanóico; este último particularmente importante por ser um possível precursor do ácido 10-HDA.

GLINSKI & RZEDZICKI (1975)[18] realizaram análises qualitativas e quantitativas da composição dos aminoácidos da geléia real fresca e liofilizada. Os autores concluíram que os hidrolisados de ambas as amostras, tanto da geléia real fresca como da liofilizada continham os mesmos 15 aminoácidos. Diferenças significativas ocorreram entre os hidrolisados de geléia real fresca e da liofilizada, como a quantidade de lisina, serina, alanina e isoleucina e açúcares estarem aumentadas nas amostras liofilizadas. Os autores apontam degradações enzimáticas ocorridas na geléia real fresca como uma possível causa para as diferenças encontradas.

MINIERI *et al.*[37] publicaram em 1977, uma revisão resumida a respeito da origem, propriedades e usos da geléia real. Os aspectos apresentados pelos autores, foram algumas características físicas, propriedades anti-bacterianas e antibióticas, propriedades nutritivas e medicamentosas da geléia real, seu uso em medicina veterinária e em cosmética.

"Nos últimos anos, a geléia real foi tida como a panacéia para todos os males imagináveis. Infelizmente, como resultado deste anúncio distorcido, o público acreditou no potencial terapêutico deste produto" Com esta frase,

WELLS (1976)[56] iniciou um trabalho de revisão sobre geléia real, no qual procurou esclarecer sobre os usos da geléia real, apresentando os fatos comprovados a respeito do assunto.

Na qualidade de diretor do Departamento de Laboratórios do Hospital St. Mary's (Brooklin, Nova Iorque), CHO[12], publicou em 1977, relatos de casos clínicos nos quais a geléia real fora usada com o propósito hipocolesterolemiante. Como resultado o autor verificou a diminuição dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos, embora não tivesse as explicações das possíveis causas biológicas ou bioquímicas para o fato.

Em 1980, KOHASHI *et al.*[32] descreveram um método que usa a cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de pteridinas (estruturas heterocíclicas derivadas do núcleo pirazino-(2,3-d)-pirimidina, que ocorrem naturalmente em mamíferos, microorganismos, plantas superiores, invertebrados, anfíbios, répteis, peixes e insetos, e que atuam como cofatores em reações enzimáticas). O método apresentado permitiu analisar pteridinas em alimentos (por exemplo geléia real), e na urina humana.

LERCKER *et al.*[33] publicaram, em 1981, um trabalho no qual relatam que a partir da data em que foram iniciados os estudos a respeito da composição da geléia real, muitos trabalhos foram feitos no sentido de identificar as principais classes de componentes da geléia real, mas foram grandes as diferenças encontradas entre os autores, e portanto o conhecimento nesta área ainda era escasso nessa época. Com isso justificam seu trabalho, que foi estudar a fração lipídica da geléia real. O trabalho proposto foi dividido em duas partes. Na primeira parte, os autores utilizaram métodos como cromatografia em camada delgada, cromatografia a gás acoplada a espectro de massa. Eles identificaram uma série de ácidos graxos de cadeia curta, sendo inclusive alguns, dicarboxílicos, dentre os quais o 10-HDA. Na segunda parte, publicada em 1982, os autores[34] separaram hidrocarbonetos e esteróides da fração lipídica.

DEBLOCK-BOSTYN (1982)[13], ao escrever "L'abeille et ses produits", dividiu o trabalho em duas partes. Na primeira parte, "L'abeille", o autor

descreveu espécies e raças de abelhas, a morfologia e anatomia das abelhas. Na segunda parte, "Les produits de la ruche", são apresentados dados sobre propriedades físico-químicas, composição, produção e armazenamento de cera, mel, geléia real, pólen, própolis e veneno da abelha. Os métodos utilizados para tais verificações, no entanto, não foram descritos pelo autor, assim como não há citações de que tais dados tenham sido obtidos por outros pesquisadores.

VITTEK & SLOMIANY (1984)[52] isolaram da geléia real de *Apis mellifera* um composto com a mesma imuno-reatividade (determinada por radioimunoensaios), e com a mesma mobilidade, em cromatografia em camada delgada e em cromatografia a gás, da testosterona. Os autores discutem que os insetos possuem os sistemas enzimáticos Δ22- e Δ24-esterol redutase, que transformam os fitosterois em colesterol, sendo este um importante precursor para a biossíntese de metabólitos biologicamente ativos, e possivelmente o referido hormônio seja um intermediário das reações. A inibição destes sistemas enzimáticos em vários insetos causa interrupção na metamorfose e no desenvolvimento larval. Esta foi a primeira demonstração da ocorrência do hormônio esteróide nessa espécie (abelhas), e o significado da presença da testosterona na geléia real não é conhecido.

Análises para a determinação da composição centesimal de amostras de geléia real fresca e de outras amostras obtidas do comércio foram realizadas por HOWE *et al.* (1985)[23]. Foram determinados os teores de umidade, proteínas totais, lípides totais, a composição dos aminoácidos e dos ácidos graxos. As amostras frescas de geléia real foram tidas como autênticas. Os resultados obtidos para as amostras comerciais foram comparados aos daquelas, que serviram de padrão de identidade. À partir dos resultados, as amostras do mercado puderam ser classificadas como autênticas ou adulteradas.

Dando continuidade aos trabalhos iniciados com relação à composição da geléia real, LERCKER *et al.* (1986)[35] ativeram-se desta vez à análise da fração glicídica. Estes utilizaram a cromatografia à gás de alta

resolução para fazer a determinação dos carboidratos componentes da geléia real.

Em 1987, CAMPOS[9] deu uma "Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis", através de uma extensa revisão que fez a respeito da composição destes produtos.

KARAALI *et al.* (1988)[28] estudaram a caracterização e composição da geléia real turca e determinaram umidade, açúcares totais, lípides, proteínas, amino-ácidos, cinzas, minerais (ferro e cálcio) e vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina). As mesmas amostras analisadas foram liofilizadas em equipamento apropriado para escala laboratorial. A composição dos liofilizados foi investigada por períodos de estocagem de até 6 meses, e comparadas aos valores iniciais. As maiores alterações assinaladas pelos autores referem-se à cor (escurecimento) e aumento na acidez titulável.

ANDONDONSKAJA-RENZ & ZEITLER[1] demonstraram em 1989 um método para a determinação de pteridinas em geléia real, preparações farmacêuticas e caviar. O método apresentado pelos autores utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (semelhantemente ao método que havia sido apresentado por KOHASHI *et al.*[32] em 1980), e trata-se de um método alternativo para a determinação de pteridinas, pois os métodos tradicionais para a determinação de biopterina, neopterina e sepiapterina são baseados em bioensaios (com *Crithidia fasciculata*), cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada, respectivamente.

Utilizando cromatografia a gás e cromatografia líquida SERRA-BONVEHI (1990)[48] determinou os aminoácidos livres presentes na geléia real.

Uma proteína com potente atividade antibacteriana foi encontrada na geléia real por FUJIWARA *et al.* (1990)[17]. Tal proteína, chamada pelos autores pelo nome de "royalisin" (que, aportuguesando, diríamos realisina) foi extraída, purificada e determinada a sua estrutura primária. A realisina mostrou ser bastante ativa contra bactérias Gram-positivas mesmo em baixas concentrações (1 μM). Ela não apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas . As bactérias Gram-positivas testadas

foram dos gêneros *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e as Gram-negativas foram *Escherichia coli*, e os gêneros *Bacterioides*, *Klebsiella* e *Salmonella*.

Em 1992, PALMA[39], baseando-se no fato de não haver um padrão estabelecido que pudesse ser usado pelas agências regulatórias no Brasil para controlar a adulteração nos produtos comerciais derivados de geléia real, iniciou um estudo para determinar a composição química da geléia real de procedência brasileira. Trabalhando na composição da geléia real, PALMA analisou umidade, proteinas, cinzas, lípides, açúcares e acidez. O pesquisador verificou que sua composição é concordante com os valores descritos por outros autores, embora algumas diferenças possam ser indicadas, tais como o fato de as amostras brasileiras serem levemente mais úmidas que os exemplos citados na literatura.

SERRA-BONVEHÍ (1992)[47], tentando estabelecer parâmetros que garantissem a qualidade do produto, determinou a variação que pode ocorrer na composição dos açúcares da geléia real devido a forma de exploração da colméia, presença ou não da abelha-rainha e idade das abelhas operárias. As determinações foram feitas por cromatografia a gás, e nas amostras analisadas, foram encontrados os seguintes açúcares: ribose, xilose, glicose, frutose, sacarose, maltose e melibiose. O autor discutiu, que com exceção da glicose, frutose e sacarose, a maioria dos açúcares aparecem em porcentagens traço, sem interesse na caracterização da geléia real. Dos açúcares identificados, os monossacarídeos representam 92% dos açúcares totais. A relação glicose/frutose variou entre 0,62 e 1,02, sendo a frutose o açúcar predominante na maioria das amostras. O autor concluiu que os açúcares da geléia real puderam ser identificados, e que as condições de exploração do colmeal não influem na composição dos açúcares do produto. Este ainda acrescentou que não se pode garantir a qualidade da geléia real utilizando o espectro de açúcares.

BLOODWORTH *et al.* (1992)[6], conhecendo o fato de que o ácido 10-hidroxi-2-decenóico é o princípio ativo da geléia real, e reconhecendo sua importância na determinação da qualidade do produto, propuseram um

método para sua determinação por cromatografia líquida de alta eficiência, indicando como vantagens em relação a métodos por cromatografia a gás, um processo de extração mais simples e rápido, e a não necessidade de derivatização dos compostos. Sendo a geléia real o único produto no qual se relata a ocorrência de 10-HDA, este ácido pode ser utilizado como indicador de sua autenticidade, e nas verificações de produtos onde ela estiver contida.

JIA *et al.* (1995)[27], ressaltando que o 10-HDA é o principal princípio ativo da geléia real, e citando algumas das aplicações da geléia real que são devidas ao 10-HDA propõem a aplicação da eletroforese capilar na separação e determinação do 10-HDA. Com o uso desta técnica, o 10-HDA pode ser quantificado em menor tempo e com menor manipulação da amostra, quando comparado aos outros métodos existentes. A técnica também pode ser utilizada para a detecção de 10-HDA em amostras nas quais a geléia real tenha sido adicionada, como no caso de "ginseng" com geléia real.

Estudos "in vitro" da atividade antifúngica e antibacteriana da geléia real foram realizados por NASSIS *et al.* (1995)[38]. As amostras foram testadas contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Microsporum canis*, *Aspergillus parasiticus* e *Cladosporium sphaerospermum*, e os resultados obtidos demonstraram atividade antibacteriana frente às bactérias Gram-positivas; para as bactérias Gram-negativas a atividade foi verificada contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp.; atividade antifúngica foi verificada contra as leveduras e os bolores, inclusive dermatófitos.

KIMURA *et al.* (1995)[31] fizeram a caracterização da estrutura de uma glicoproteína de peso 350-kDa que estimula a proliferação de monócitos humanos. Em 1996, dando continuação os trabalhos, os autores[30] purificaram a partir da fração solúvel da geléia real, uma glicoproteína bioativa, com massa molecular de 55-kDa, que é capaz de manter a alta viabilidade de cultura de células de fígado de ratos.

As diferenças entre a geléia real de *Apis cerana japonica* e de *Apis mellifera* foram estudadas por TAKENAKA & TAKENAKA (1996)[50]. Os autores verificaram a presença de maior quantidade de proteína e menor quantidade de carboidratos na geléia real de *Apis cerana japonica*.

CHEN & CHEN (1995)[11] estudaram algumas mudanças físico-químicas que ocorreram na geléia real quando estocada a –20°C, a 4°C e à temperatura ambiente, expostas e protegidas da luz por 7 meses. Os resultados mostraram que a viscosidade, a cor, a fração protéica solúvel em água e os carboidratos simples mudaram significantemente quando a geléia real foi estocada à temperatura ambiente; o mesmo não ocorreu em estocagem a -20°C. As principais modificações verificadas foram com relação ao aumento da viscosidade (que não foi discutido pelos autores), o aumento da cor do produto, e a diminuição no teor de carboidratos e da fração protéica solúvel (os três últimos fatores relacionados à reação de escurecimento não enzimático devida à reação de Maillard).

ISHIWATA *et al.* (1995)[26] descreveram em seu trabalho um método analítico para a detecção de p-hidroxibenzoato de metila (metil-parabeno) em geléia real, mel e outros produtos alimentícios produzidos pelas abelhas. Este trabalho tem particular interesse pois o metil-parabeno é tido como um produto sintético, que pode ser adicionado aos alimentos como conservante.

3- OBJETIVO

Estudar e estabelecer a metodologia analítica necessária para a caracterização do produto geléia real, o que garantirá a verificação de sua autenticidade. O objetivo será alcançado pela:

a) padronização da metodologia para determinação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (10-HDA)

b) determinação do teor médio do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico

c) análise da composição centesimal média do produto obtido por apicultores produtores do Estado de São Paulo.

d) análises de algumas vitaminas nas amostras

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Material (Geléia real)

4.1.1- Preparo das amostras

Cada uma das amostras de geléia real (total de 7 amostras) foi adquirida em um dos apiários ou entrepostos de comercialização de produtos apícolas filiados à ABRACAM (Associação Brasileira de Apicultores Criadores de Abelhas Mansas) ou à APACAME (Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas), ou ainda de outros apicultores produtores de geléia real no Estado de São Paulo.

a) Amostras ao natural

Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração a -18ºC e ao abrigo da luz, desde o momento do recebimento até o momento de análise. Cada amostra de geléia real foi proveniente de um apicultor fornecedor, e correspondente a um lote de produção apícola.

As amostras, foram marcadas com letras, que servirão para identificá-las nas citações, sendo: A, B, C, D, E, F e G.

As amostras A, B, D, e G, foram adquiridas de entrepostos de comercialização de produtos apícolas; as amostras C e F foram adquiridas diretamente de apicultores produtores; a amostra E foi adquirida de entreposto de comercialização apícola, e foi declarada pelo comerciante, como sendo de origem chinesa.

b) Amostras adulteradas

A partir da amostra B, que era a amostra em maior quantidade disponível, foram preparadas fraudes por adição de adulterantes nas proporções de 10, 25 e 50% (m/m) de:

- logurte natural
- Clara de ovo
- Água potável
- Pasta de amido
- Uma mistura de leite condensado com própolis

As adulterações foram preparadas em laboratório, de acordo com informações fornecidas por apicultores.

Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração a -18ºC e ao abrigo da luz, desde o momento da manipulação até o momento de análise.

4.2-Métodos

4.2.1- Composição Centesimal

a) Determinação da Umidade

A determinação da umidade na geléia real foi realizada por métodos gravimétricos convencionais e por método volumétrico.

Os métodos gravimétricos empregados tomaram por base a perda de massa da amostra, por dessecação até peso constante:

- em estufa à vácuo regulada para 60°C [24, 16]
- em estufa à vácuo regulada para 70ºC [24,16]
- em estufa convencional regulada para 105ºC [24, 16]
- em ambiente de baixa atividade de água[24], utilizando-se dessecador com ácido sulfúrico, e
- por secagem sob infravermelho[24], em equipamento "Unidade de secagem Mettler LTJ" ajustando-se a intensidade da radiação emitida de modo que a amostra atingisse 105ºC.

Em todos os casos, uma alíquota da amostra (analiticamente cerca de 1 g) foi submetida ao processo, até peso constante, e o teor de umidade foi calculado utilizando-se a equação (1):

$$\% \text{ umidade} = 100 - (((m'-t)/(m-t))x100) \qquad (1)$$

onde:

m = massa total do sistema (vidraria mais alíquota da amostra) no início do processo

m' = massa total do sistema (vidraria mais alíquota da amostra) no final do processo

t = massa da vidraria utilizada

100 = fator percentual de cálculo

Para a determinação de umidade por submissão da amostra a ambiente com baixa atividade de água, uma alíquota da amostra de cerca de 1 g foi tomada em vidro de relógio e imediatamente posta em um dessecador com ácido sulfúrico, nele permanecendo por 15 horas.

O equipamento para determinação de umidade por utilização de radiação infravermelho é composto por uma balança que possui acoplada uma fonte da radiação. Para a realização da análise, uma alíquota da amostra foi aplicada a um suporte previamente tarado (na maioria dos casos este suporte é um pequeno prato de alumínio). O conjunto suporte mais alíquota da amostra foi colocado na balança, e a massa inicial foi registrada. Em seguida fez-se incidir a radiação sobre a amostra, e a massa final após o processo foi novamente registrada.

A determinação de umidade pelo método volumétrico, baseou-se na aquametria com reagente de Karl Fischer [24,16].

O teor de umidade foi estimado tomando-se por base a quantidade de reagente (com seu respectivo fator de correção) necessária para titular a água presente na alíquota da amostra ensaiada. O cálculo foi feito utilizando a equação (2):

$$\% \text{ umidade} = ((v \times fc)/AAE) \times 100 \qquad (2)$$

onde:

v = volume de reagente de Karl Fischer gasto para titular a água presente na alíquota de amostra ensaiada

fc = fator de correção do equivalente em água capaz de ser neutralizado pelo reagente de Karl Fischer

AAE = alíquota de amostra ensaiada

100 = fator percentual de cálculo

b) Determinação de resíduo mineral fixo (cinzas)

A determinação do resíduo mineral fixo foi realizada por gravimetria após incineração do material em forno mufla a 550ºC [24, 16] até peso constante.

Para a determinação das cinzas, a alíquota da amostra foi submetida a aquecimento e dessecação prévia em estufa a 105ºC; em seguida foi submetida a processo de incineração em mufla a 550ºC até peso constante. O teor de cinzas foi calculado conforme a equação (3), a seguir:

$$\text{Resíduo mineral fixo} = (((m' - t)/(m - t) \times 100) \qquad (3)$$

onde:

m= massa total do sistema (vidraria mais alíquota de amostra) no início do processo

m'= massa total do sistema (vidraria mais alíquota de amostra) no final do processo

t = massa da vidraria utilizada

100 = fator percentual de cálculo

c) Determinação do teor lipídico[24]

A fração lipídica foi determinada em extrator intermitente de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente.

d) Determinação de Nitrogênio total / proteínas[3]

O teor de nitrogênio total foi determinado através do método Micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para transformação deste em proteínas.

e) Determinação do teor de Carboidratos

O teor de carboidratos foi estimado por cálculo.

4.2.2- Determinação da Acidez titulável[24]

A determinação de acidez das amostras foi obtida por titulação direta do material com hidróxido de sódio 0,01 M, e também por titulação de retorno, por adição de excesso de hidróxido de sódio (volume total de 10 mL de hidróxido de sódio 0,01 M) e titulação deste excesso com ácido clorídrico 0,01 M.

4.2.3- Determinação eletrométrica do pH

Foi realizada determinação eletrométrica do pH das amostras, diretamente, e em suas soluções. As soluções foram preparadas pesando-se cerca de 0,1 g e diluindo-se ao volume de 10 mL em água destilada recentemente fervida[24].

4.2.4- Determinação do teor de ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (10-HDA)

A determinação do 10-HDA seguiu metodologia preconizada por BLOODWORTH[6], com a modificação da coluna, originalmente C_{18} pela C_{18}-H. Utilizou-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: Sistema isocrático com bomba (Shimadzu® LC9A), com auto-injetor e com detector UV-VIS com arranjos de fotodiodo (Shimadzu® SPD-MXA). A coluna usada foi a C_{18}-H de fase reversa (Shimadzu® ODS-H dimensões 4,0x150 mm cód. 228-21336-01). Fase móvel composta por metanol/água (45:55) com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico, filtrada por membrana 0,45 μm Millipore® e degaseificada por 5 minutos com gás hélio. A vazão de fase móvel utilizada nas análises foi de 0,5 mL/minuto. O detector foi ajustado para detecção aos 225 nm. O tempo total de corrida foi de 30 minutos. Utilizou-se padronização interna com α-

naftol. Os dados obtidos foram adquiridos por "software" apropriado: SPD-MXA, que é parte integrante do sistema de cromatografia.

Para a realização da análise, foi construída uma curva padrão de 10-HDA com cinco pontos de concentração, crescentes a saber: 2,73 μg/mL, 5,46 μg/mL, 10,92 μg/mL, 16,38 μg/mL e 21,84 μg/mL de 10-HDA (respectivamente os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 da curva); em cada um dos pontos da curva foi adicionado α-naftol (como padrão interno) de modo a obter concentração final de 3,0 μg/mL . A curva foi construída utilizando fase móvel, e foi filtrada por membrana 0,22 μm, sendo 5 μL injetados no cromatógrafo. O padrão de referência do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico foi adquirido diretamente de Nippon Shoji Kaisha Ltd. - Chuo-Ku, Osaka, Japan.

A alíquota da amostra tomada para o ensaio (cerca de 30 mg) foi colocada diretamente em balão volumétrico de 10 mL, no qual adicionou-se quantidade conhecida de padrão interno (1 mL de solução de α-naftol com concentração de 30 μg/mL em fase móvel) e diluída ao volume com a fase móvel. Em seguida, esta foi filtrada em membrana com porosidade de 0,22μm, sendo 5μL injetados no cromatógrafo.

Os cálculos para a determinação do teor de 10-HDA foram efetuados com base na relação das áreas sob as curvas representativas do α-naftol e do 10-HDA, que aparecem nos cromatogramas.

Para os cálculos foram utilizadas as equações (4) e (5):

Para a determinação do fator de cálculo:

$$fc = (Api / Ahda) \times C \qquad (4)$$

Para a determinação do teor de 10-HDA por injeção:

$$\text{Teor de 10-HDA} = (AHDA / API) \times fc \qquad (5)$$

onde:

API = área embaixo da curva correspondente ao padrão interno (α-naftol)

AHDA = área embaixo da curva correspondente ao 10-HDA

fc = fator de cálculo da concentração de 10-HDA

C = concentração do padrão de 10-HDA em cada ponto da curva

4.2.5- Determinação de vitaminas

a) Teor de Vitamina B_6 (piridoxina)

A determinação de piridoxina foi baseada no procedimento descrito por CHASE & SOLIMAN[10] com modificações por BIANCHINI[5], utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas seguintes condições:

Foi usado sistema isocrático de bomba (Shimadzu® LC9A), com auto-injetor e com detector de fluorescência (Shimadzu® RF535). A coluna utilizada foi uma C_{18} (Vydac®, 5 mm; 4,6mm x 25cm; cód. 201TP54). A fase móvel foi composta por ácido hexanossulfônico, hidróxido de amônio, acetonitrila e água (0,09:0,05:9,02:90,84) com pH ajustado para 3,6 com ácido fosfórico, e vazão de 1,0 mL/minuto. O detector foi ajustado para os comprimentos de onda 295 nm em excitação e 395 nm em emissão. O tempo total de corrida foi de 10 minutos. Utilizou-se padronização externa (padrão piridoxina Sigma P-5669). Os dados foram obtidos utilizando-se "software" apropriado: C-R4A Chromatopack, que é parte integrante do sistema de cromatografia.

Uma curva padrão de piridoxina foi elaborada. Inicialmente, quantidade conhecida do padrão de piridoxina, foi solubilizada em solução de ácido clorídrico 0,1 M , de modo a obter concentração final de 0,1mg/mL (solução estoque), que em seguida foi diluída na fase móvel (diluição 1/10) produzindo a solução de trabalho, filtrada em

membrana 0,45 μm e injetada em cromatógrafo, sendo obtidos pontos com 0,2 , 0,4 , 0,6 , 1,0 e 2,0 μg de piridoxina.

A realização da análise seguiu conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

alíquota de amostra tomada para o ensaio (cerca de 0,9 g)

⇓

adição de 1 mL ácido tricloroacético a 8%

⇓

agitação (vortex)

⇓

ultra-som por 30 minutos

⇓

centrifugação (14000 rpm)

⇓

filtração do sobrenadante por membrana 0,22 μm

⇓

injeção (20 μL) em cromatógrafo líquido

Figura 1: Fluxograma do processo de determinação de piridoxina em amostras de geléia real.

Para calcular o teor de piridoxina nas amostras, as áreas sob as curvas relativas à piridoxina que aparecem nos cromatogramas, foram aplicadas na equação da reta de regressão linear entre os pontos da curva de calibração.

b) Determinação do teor de β-caroteno

A determinação do teor de β-caroteno baseou-se na metodologia preconizada por GRANADO[19]. Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: Sistema isocrático com bomba (Shimadzu® LC9A), com auto-injetor e com detector UV-VIS com arranjos de fotodiodo (Shimadzu® SPD-M6A). Coluna C_{18} de fase reversa (Vydac® ODS

dimensões 4,6 x 250 mm). Fase móvel composta por acetonitrila/diclorometano/metanol (70:20:10), filtrada por membrana 0,45 μm Millipore® e degaseificada por 5 minutos com gás hélio. A vazão de fase móvel utilizada nas análises foi de 2,0 mL/minuto. O detector foi ajustado para detecção aos 452 nm. O tempo total de corrida foi de 18 minutos. Utilizou-se padronização externa. Os dados foram obtidos e tratados utilizando-se "software" apropriado: SPD-MXA, que é parte integrante do sistema de cromatografia.

Uma curva de calibração padrão de β-caroteno foi elaborada por solubilização de quantidades conhecidas do padrão de β-caroteno Sigma-Aldrich® em diclorometano (solução estoque), de modo que a concentração final tenha sido de 0,1mg/mL, que em seguida foi diluída (diluição 1/100) na fase móvel, produzindo a solução de trabalho, filtrada por membrana 0,45 μm e injetada em cromatógrafo, sendo obtidos pontos com 2 , 4 , 6, 8 e 10 μg de β-caroteno.

A alíquota da amostra tomada para o ensaio, cerca de 3 g, foi saponificada, a frio, por uma noite e extraída com éter de petróleo[29].

c) Determinação de Vitamina E e de Vitamina A

A determinação dos teores das vitaminas E e A baseou-se na metodologia preconizada por RETTENMEIER & SCHUEP[46]. Utilizou-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: Sistema isocrático com bomba (Shimadzu® LC9A), com auto-injetor e com detector de fluorescência (Shimadzu® RF535), coluna CLC-Sil Shimadzu® de dimensões 4,6 x 125 mm). Fase móvel composta por hexano/isopropanol (99:01), filtrada em membrana 0,45 μm Millipore® e degaseificada com gás hélio. A vazão de fase móvel utilizada nas análises foi de 2,0 mL/minuto. O detector foi ajustado para os comprimentos de onda de 325 nm em excitação e 480 nm em emissão para a vitamina A, e 295 nm em excitação e 330 nm em emissão para a vitamina E. O tempo total de corrida foi de 20 minutos. Utilizou-se padronização externa. Os dados foram obtidos e

tratados utilizando "software" apropriado: C-R4A Chromatopack, que é parte integrante do sistema de cromatografia.

Uma curva de calibração padrão das vitaminas A e E foi construída por solubilização de quantidades conhecidas dos padrões de retinol e de α-tocoferol, ambos Sigma-Aldrich®, em hexano (soluções estoque). Em seguida, essas soluções foram diluídas na fase móvel (soluções de trabalho), filtradas em membrana 0,45 μm e injetadas (20 μL) em cromatógrafo.

A alíquota da amostra tomada para o ensaio, cerca de 3 g, foi saponificada à temperatura ambiente por uma noite e extraída com éter etílico[29].

4.2.6- Análise das amostras adulteradas

As amostras de geléia real adulteradas por adição de água, de leite condensado com própolis, de clara de ovo, de iogurte natural e de pasta de amido, foram analisadas buscando a detecção da adulteração. Foram realizadas as determinações dos teores de umidade (em dessecador com ácido sulfúrico), lípides, nitrogênio total/proteínas, cinzas, ácido 10-hidróxi-trans-2-decenóico, a presença de amido por reação com lugol, e solubilidade das mesmas em meio alcalino.

a) Verificação da presença de amido com lugol

Todas as amostras foram submetidas ao teste com lugol, para a detecção de amido. Uma tomada de ensaio da amostra (por volta de 1,5 g) foi dispersa em 20 mL de água destilada, que em seguida foram aquecidos à ebulição e novamente resfriados. Três gotas de lugol, reagente à base de iodo, foram adicionadas às amostras.

Um controle positivo de cada amostra foi preparado em laboratório, para fornecer parâmetros de comparação.

b) Verificação da solubilidade em meio alcalino

A solubilidade das amostras em água foi testada. Uma tomada de ensaio da amostra (aproximadamente 1,0 g) foi dispersa em 20 mL de água destilada, resultando em turvação característica. Em seguida foi adicionada solução de hidróxido de sódio 20%, gota a gota, com agitação suave, até solubilização completa da amostra.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-Composição centesimal

a) Determinação de umidade

Dentre os itens mais freqüentemente analisados em alimentos, o teor de umidade é um importante dado de composição, e em alguns casos é também um indicador da qualidade do produto.

Sua determinação é normalmente feita por métodos gravimétricos, também conhecidos como dessecação até peso constante; estes métodos são indiretos, e determinam a umidade através da diferença de massa entre o alimento úmido e seco.

De acordo com as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"[24], o aquecimento direto da amostra à 105°C é o processo mais utilizado para a análise de alimentos em geral. Assim sendo, a determinação do teor de umidade das amostras de geléia real, foi realizada primeiramente em estufa convencional cuja temperatura fora regulada para 105°C.

Sob estas condições de processo, os resultados obtidos foram que as amostras, apresentaram aspecto vítreo e coloração castanho-escuro ao final do processo, características de caramelização. Originalmente, a geléia real, que apresenta coloração amarelo-claro e aspecto cremoso, é muito diferente do produto obtido após a secagem.

As amostras tiveram uma perda de massa média de 69%, variando entre 64,07 e 71,94%. Os resultados individuais, os resultados médios e os desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 1.

Quando as amostras se decompõem ou iniciam transformações à 105°C (como ocorreu com as amostras de geléia real), o teor de umidade deve ser obtido por processo semelhante, porém em estufa à vácuo com temperatura regulada para 70°C[24].

Os resultados obtidos sob essas condições também não foram satisfatórios. As amostras continuaram apresentando coloração escurecida, e pontos de caramelização.

À 70ºC, as amostras tiveram uma perda de massa média de 67,57%, variando entre 62,38% e 70,83%. Os resultados individuais, médios e os desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Teores de umidade de amostras de geléia real secas em estufa convencional a 105ºC, expressos em porcentagem

Amostras	Umidade (valor médio)	Desvios padrão
A	64,07	0,10
B	71,94	0,07
C	70,64	0,02
D	67,88	0,34
E	70,46	0,39
F	68,83	0,63
G	69,17	0,27

Tabela 2: Teores de umidade de amostras de geléia real secas em estufa a vácuo a 70ºC, expressos em porcentagem.

Amostras	Umidade (valor médio)	Desvios padrão
A	62,38	0,37
B	70,83	0,61
C	70,81	1,31
D	66,56	0,47
E	69,62	0,50
F	65,93	0,19
G	66,88	0,80

Buscando ainda resolver a questão do escurecimento que se forma durante a análise, as amostras foram então submetidas ao processo em estufa a vácuo regulada para 60°C.

Semelhantemente ao ocorrido anteriormente, as amostras submetidas a 60°C a vácuo também apresentaram pontos de caramelização e escurecimento.

Os resultados individuais, médios e os desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Teores de umidade de amostras de geléia real secas em estufa a vácuo a 60°C, expressos em porcentagem.

Amostras	Umidade (valor médio)	Desvios padrão
A	63,78	0,86
B	69,57	0,1
C	68,80	0,94
D	62,94	0,73
E	67,11	0,14
F	64,17	0,92
G	65,00	0,16

Ao comparar os resultados obtidos nos processos a 60°C, a 70°C e a 105°C, pôde-se notar em todas as amostras, que a intensidade da caramelização e do desenvolvimento de cor acompanhou o aumento de temperatura. As amostras submetidas à 105°C eram nitidamente mais escuras que as amostras submetidas à 70°C, e estas, mais escuras que as submetidas à 60°C.

A relação entre o aumento da temperatura e o escurecimento das amostras pode ser um indício da ocorrência do fenômeno "escurecimento não enzimático". Açúcares e aminoácidos livres que existem naturalmente na geléia real [35, 47, 48], podem ser apontados

como os possíveis responsáveis pelo fato. Os estudos realizados por CHEN & CHEN[11], demonstram que durante o armazenamento de geléia real em condições ambientes, já é possível notar escurecimento, devido à reação de Maillard.

A partir destes resultados, experimentou-se um método alternativo, que foi a determinação de umidade sob radiação infravermelha. Este método, embora exponha as amostras a um aumento de temperatura, o faz por períodos curtos, fato este, que contribui para a preservação da integridade das mesmas.

Na determinação de umidade por exposição sob radiação infravermelha, o teor médio obtido foi de 63,74%, variando entre 59,89 e 66,04%. Os resultados individuais, médios e os desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 4.

Ao final do processo, as amostras apresentavam-se claras e endurecidas, com aspecto resinoso, e com o odor característico da geléia real, porém mais acentuado.

Tabela 4: Teores de umidade de amostras de geléia real obtidos em unidade de secagem Mettler® JRT ajustada para obter 105°C, expressos em porcentagem.

Amostras	Umidade (valor médio)	Desvios padrão
A	59,89	0,79
B	64,09	0,47
C	63,16	0,70
D	63,22	0,37
E	66,04	0,71
F	65,53	0,59
G	64,24	0,48

Foram ainda utilizados métodos que não empregam o calor. As amostras foram então submetidas a um ambiente com baixa atividade

de água (dessecador com ácido sulfúrico), e também à aquametria por titulação com reagente de Karl Fischer.

A aquametria por titulação com reagente de Karl Fischer revelou resultado médio de 65,77%, entre um mínimo de 60,92% e um máximo de 67,82%. Os resultados e os desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 5. Os valores por nós obtidos são próximos aos descritos por SERRA-BONVEHI[47] (66,40%) na análise de amostras de origem chinesa.

Durante a realização destas análises, foi possível notar que ao adicionar a amostra ao frasco de titulação, assim que ela entra em contato com o metanol anidro, forma-se em sua superfície uma película endurecida e de cor branca. Tal fato, nos leva a crer que o endurecimento produzido, possivelmente por denaturação protéica, aprisiona o conteúdo de seu interior, tornando as trocas com o ambiente mais lentas, o que torna o tempo necessário para a titulação maior (cerca de 20 minutos). A umidade do ambiente pode estar sendo incorporada ao metanol, devido à exposição excessiva requerida para a finalização da análise.

No processo em dessecador com ácido sulfúrico, as amostras apresentaram um aspecto final semelhante àquele descrito quando da análise por radiação infravermelho: coloração clara, consistência endurecida, como se formasse um filme plástico.

Neste caso, as amostras tiveram uma perda de massa média de 63,24%, variando entre 61,45 e 67,58%. Os resultados individuais, médios, os desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 5: Teores de umidade de amostras de geléia real determinados por aquametria com reagente de Karl Fischer, expressos em porcentagem.

Amostras	Umidade (valor médio)	Desvios padrão
A	60,92	0,46
B	67,82	0,55
C	66,93	0,82
D	65,10	0,71
E	67,55	0,52
F	65,82	0,70
G	66,28	0,61

Tabela 6: Teores de umidade de amostras de geléia real determinados em ambiente com baixa atividade de água (dessecador com ácido sulfúrico), expressos em porcentagem.

Amostras	Umidade (valor médio)	Desvios padrão
A	61,45	0,12
B	67,58	0,56
C	63,44	0,06
D	61,99	0,76
E	63,76	0,87
F	62,33	0,56
G	62,14	2,03

Na Figura 2 são apresentados os valores médios de umidade de todas as amostras, em relação aos métodos utilizados.

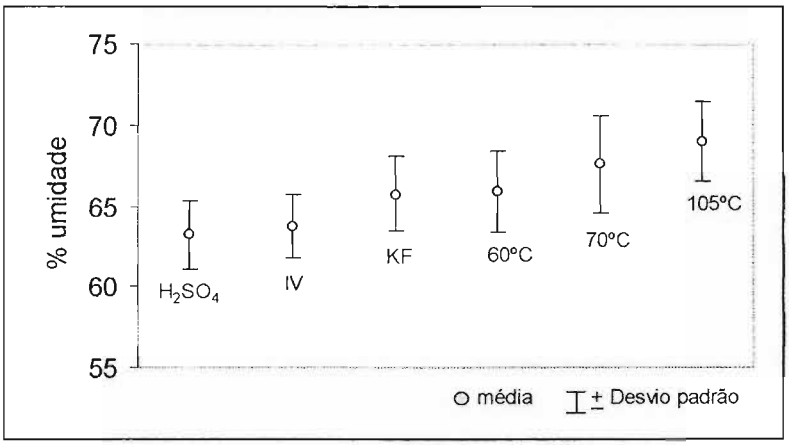

Figura 2: Valores médios de umidade encontrados em amostras de geléia real; comparação entre processos.

60°C = Determinação de umidade em estufa à vácuo regulada para 60° C

70°C = Determinação de umidade em estufa à vácuo regulada para 70° C

105°C = Determinação de umidade em estufa regulada para 105°C

InfraV = Determinação de umidade por exposição da amostra à radiação infravermelha

H_2SO_4 = Determinação de umidade por exposição da amostra a ambiente de baixa atividade de água (dessecador de ácido sulfúrico)

K F = Aquametria por titulação com reagente de Karl Fischer

É possível notar que de modo geral, nos processos nos quais o calor é empregado, os valores de umidade são maiores que nos outros processos; exceção deve ser feita à exposição da amostra à radiação infravermelho, onde há aplicação de calor, porém por um curto período de tempo. Há ainda que ressaltar, que nos processos que envolvem o calor, outros componentes voláteis das amostras podem ser perdidos nas condições de análise. Os ácidos graxos de cadeia curta, naturalmente presentes na geléia real[55], compostos voláteis e água provenientes de reação de escurecimento não

enzimático, podem ser exemplos dessas perdas durante a realização das análises.

PALMA[39] ao analisar amostras brasileiras de geléia real, por aquecimento a 65°C, encontraram valor médio de umidade entre 67,8 e 69,4% e concluíram a partir destes dados que as amostras brasileiras parecem ter maior umidade quando comparadas aos resultados obtidos por outros autores.

Foi realizada a análise de variância das médias dos teores de umidade obtidos através dos distintos processos, e conclui-se que em nível de significância de 5% estas não são estatisticamente iguais. A análise de variância está apresentada na Tabela 7:

Fonte	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Estatística F	Sig. do F	Conclusão *
Efeito do Trata-mento	5	507,1	101,42	62,28	0,000	Significante
Efeito da Amostra (Bloco)	6	509,3	84,88	52,13	0,000	Significante
Resíduo (Erro)	144	185,6	1,62			
Total	125	1202,1	9,62			

* conclusão ao nível de significância de 5 %

Modelo:
Umidade = μ + tratamento + bloco + ε

Hipóteses do teste:

- H_0 : todas as médias são iguais
- H_A : pelo menos uma média é diferente

Estatística do teste:

$F_{OBS} > F_{CRITICO}$ (ou equivalente se o significado do F_{OBS} for menor que 0,050) rejeita a hipótese H_0 , ou seja, pelo menos uma média difere, e portanto existe efeito da fonte de variação.

Tabela 7: Análise de Variância

Nem todos os processos resultam o mesmo valor de umidade. Através do método de contraste pode-se obter quais destes

processos que resultam valores estatisticamente iguais. Vide Tabela 8:

Diferenças				d. m. s.	Conclusão a 5%
105°C	-	H_2SO_4	= 5,76	0,88393	Significante
105°C	-	IV	= 5,26	0,86836	Significante
70°C	-	H_2SO_4	= 4,33	0,86836	Significante
105°C	-	KF	= 3,24	0,84862	Significante
70°C	-	IV	= 3,83	0,84862	Significante
60°C	-	H_2SO_4	= 2,67	0,84862	Significante
105°C	-	60°C	= 3,09	0,82136	Significante
70°C	-	KF	= 1,81	0,82136	Significante
60°C	-	IV	= 2,17	0,82136	Significante
KF	-	H_2SO_4	= 2,52	0,82136	Significante
105°C	-	70°C	= 1,43	0,78043	Significante
70°C	-	60°C	= 1,66	0,78043	Significante
60°C	-	KF	= 0,15	0,78043	Não significante
KF	-	IV	= 2,02	0,78043	Significante
IV	-	H_2SO_4	= 0,50	0,78043	Não significante

Conclusão Geral :

H_2SO_4 IV KF 60°C 70°C 105°C

— = Médias estatisticamente iguais

Tabela 8: Análises de contrastes (método de Duncan)

Através desta análise pôde-se notar que em nível de significância de 5%, possuem médias estatisticamente iguais os seguintes tratamentos:

- Aquametria por titulação com reagente de Karl Fischer e gravimetria após aquecimento em estufa a vácuo regulada para 60°C.
- Gravimetria em aparelho para determinação de umidade por exposição da amostra à radiação infravermelho e exposição da amostra a ambiente de baixa atividade de água (dessecador de ácido sulfúrico).

Por não empregar temperatura elevada, este processo de exposição da amostra a ambiente de baixa atividade de água (dessecador de ácido sulfúrico) preserva a integridade das amostras,

e minimiza a possibilidade de erros devidos à volatilização de compostos naturalmente presentes na geléia real, ou de outros que se formam à temperatura de análise.

Há ainda que se considerar, que sua execução não exige aparelhagem sofisticada, fato este que contribui para sua adoção na rotina do controle da qualidade do produto geléia real, mesmo em laboratórios menos equipados e favorecidos.

b) Determinação do resíduo por incineração (cinzas)

Nas análises para a determinação das cinzas em mufla, as amostras apresentaram um resíduo médio de 1,06%, variando entre 0,93 e 1,17%. Os resultados individuais, médios, desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resíduo mineral fixo de amostras de geléia real determinados em mufla a 550°C, expressos em porcentagem.

Amostras	Resíduo mineral fixo	Desvios padrão
A	1,17	0,12
B	0,93	0,01
C	0,97	0,10
D	1,11	0,02
E	1,06	0,09
F	1,11	0,06
G	1,08	0,05

c) Determinação do teor lipídico

Método farmacopéico de análise do teor lipídico em drogas vegetais[16], a extração com solventes, seguida da evaporação ou destilação do solvente empregado, é também descrita pelas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz", como um dos métodos mais comuns de determinação de lípides em alimentos[24].

As extrações assim obtidas, não contém somente ácidos graxos, mas todos os compostos lipossolúveis que podem ser extraídos pelo solvente, nas condições de análise, como esteróis, fosfolípides, vitaminas lipossolúveis, carotenóides, óleos essenciais, ceras, entre outros. Portanto, a denominação mais adequada para os resultados obtidos por este processo quando se usa o éter como solvente, é extrato etéreo.

Os extratos obtidos, devem ser medidos gravimetricamente, e em alguns casos especiais, volumetricamente, como no método de Gerber, utilizado para leite e derivados.

Os resultados dos ensaios realizados em extrator intermitente de Soxhlet estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Teores lipídicos de amostras de geléia real determinados em extrator intermitente de Soxhlet, expressos em porcentagem.

Amostras	Lípides (valor médio)	Desvios padrão
A	2,17	0,10
B	4,20	0,15
C	4,22	0,05
D	3,25	0,34
E	2,86	0,17
F	3,90	0,08
G	2,38	0,16

d) Determinação de Nitrogênio total/proteínas

Os valores de proteínas na geléia real, foram obtidos por meio da determinação do Nitrogênio total, multiplicados pelo fator 6,25. Os valores individuais, médios, os desvios padrão entre as determinações estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Teores de proteínas de amostras de geléia real, expressos em porcentagem

Amostras	Proteínas (valor médio)	Desvios padrão
A	14,01	0,25
B	11,99	0,07
C	12,42	0,04
D	13,63	0,33
E	13,28	0,11
F	13,26	0,08
G	13,25	0,43

e) Determinação do teor de carboidratos

Os valores de carboidratos foram calculados por diferença, e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 12, juntamente com os demais dados da composição centesimal da geléia real.

Tabela 12: Composição centesimal da geléia real

Amostra	Determinações				Obtido por cálculo
	Umidade	Cinzas	Lípides	Proteínas	Carboidratos
A	61,45	1,17	2,17	14,01	21,20
B	67,58	0,93	4,20	11,99	15,30
C	63,44	0,97	4,22	12,42	18,95
D	61,50	1,11	3,25	13,63	20,51
E	63,76	1,06	2,86	13,28	19,04
F	62,33	1,11	3,90	13,26	19,40
G	62,14	1,08	2,38	13,25	21,15
Média	63,00	1,00	3,50	13,00	19,50

Com relação à determinação da composição média da geléia real, os valores obtidos são semelhantes àqueles citados por outros

autores, como TAKENAKA *et al.*[50], KARAALI *et al.*[28], HOWE *et al.*[23], LERCKER *et al.*[35] e PALMA[39].

Os valores de umidade encontrados nas amostras analisadas, estão na mesma faixa daqueles relatados em literatura, diferentemente do que foi descrito por PALMA[39], que afirmou serem estes ligeiramente maiores que aqueles. Já os valores de lípides (3,5%), que são semelhantes aos descritos pelo mesmo autor, são menores que os relatados em literatura. Enquanto os valores descritos por LERCKER *et al.*[35], TAKENAKA *et al.*[50] e KARAALI *et al.*[28] são respectivamente 7,6%, 6,1% e 8,2%, PALMA[39] descreve para os lípides uma faixa entre 2,90 e 3,98%.

5.2-Determinação da acidez titulável

Nos processos de decomposição dos alimentos, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, quase sempre os valores de acidez são alterados, e por isso, a determinação da acidez pode fornecer dados importantes à respeito do seu estado de conservação[24].

KARAALI *et al.*[28] ao estudar o comportamento da geléia real turca, "in natura" e liofilizada, obtiveram valores de 14,6 mg de NaOH para neutralizar um grama de geléia real fresca. Com o passar do tempo, a acidez das amostras aumentou, e a amostra que inicialmente consumira 14,6 mg de NaOH/g de geléia real, passou a consumir 21,4 mg de NaOH/g de geléia real. Assim sendo, concluíram os autores que o valor de acidez titulável, pode vir a indicar o grau de frescor do produto.

Os valores da acidez titulável presente nas amostras de geléia real estão expressos (em mg de NaOH/g de geléia real) na Tabela 13. Estes valores são concordantes com os relatados por KARAALI *et al.*[28], para a maior parte das amostras. As amostras C e F apresentaram já de início valores da ordem de 20,53 mg/g e 22,23 mg/g, respectivamente, que contrariam os resultados citados pelos

autores a respeito da geléia real turca. Estes resultados das amostras C e F (cerca de 20 mg/g) são semelhantes àqueles relatados por KARAALI *et al.*[28] para amostras que já haviam passado por algum período de armazenamento, o que nos sugere que medir a acidez titulável das amostras talvez nos forneça informações pouco confiáveis a respeito do frescor das mesmas.

Outros valores de acidez titulável foram obtidos também por titulação de retorno devido à dificuldade de visualização do ponto de viragem na titulação original (Tabela 13).

É possível notar, que os resultados obtidos pela titulação direta das amostras, apresentam valores menores com desvios maiores que os obtidos por titulação de retorno.

Os resultados das análises obtidos por titulação de retorno, parecem ser mais confiáveis que os obtidos por titulação direta, uma vez que a subjetividade na determinação do ponto de viragem, praticamente desaparece.

Tabela 13: Acidez titulável em amostras de geléia real (valores expressos em mg de NaOH/g de geléia real)

Amostras	Acidez titulável por titulação direta	Desvios padrão	Acidez titulável por titulação de retorno	Desvios padrão
A	14,66	1,21	15,86	1,07
B	19,97	1,08	22,03	0,77
C	20,53	0,28	23,32	0,12
D	16,38	0,60	16,45	0,14
E	14,82	0,28	15,85	0,16
F	22,23	0,39	23,91	0,11
G	13,66	0,24	16,07	0,36

5.3-Determinação eletrométrica do pH

De acordo com as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"[24] o pH de alimentos sólidos deve ser determinado no líquido sobrenadante, após a amostra ter sido suspensa ou dissolvida em água recentemente fervida. No caso de amostras líquidas, o pH deve ser obtido pela inserção direta do eletrodo do potenciômetro na amostra.

As amostras de geléia real não apresentam características de alimentos sólidos e nem de alimentos líquidos, pontanto foram analisadas das duas formas: primeiramente seus valores de pH foram determinados diretamente. Em seguida, foram determinados os valores de pH de suas soluções aquosas. Os resultados das determinações estão apresentados na Tabela 14.

Com os dados obtidos, é possível verificar que o pH da solução de geléia real, permanece constante, independentemente da massa de amostra tomada para o preparo da solução.

Os valores encontrados das medidas de pH em solução não apresentam variação entre as determinações da mesma amostra.

Os resultados do pH em medida direta parecem estar mais proximamente relacionados aos valores de acidez titulável.

Tabela 14: Valores de pH das amostras de geléia real em solução e por medida direta

Amostra	Alíquota da amostra (g)	pH da solução	PH medida direta
A	0,1545 0,1358 0,1654	3,9 3,9 3,9	4,2
B	0,1037 0,117 0,1211	3,8 3,8 3,8	4,0
C	0,101 0,0967 0,1235	3,8 3,8 3,8	3,9
D	0,2354 0,2044 0,2475	3,9 3,9 3,9	4,1
E	0,1842 0,1968 0,1362	3,9 3,9 3,9	4,1
F	0,0788 0,1366 0,1109	3,7 3,7 3,7	3,8
G	0,1483 0,1308 0,1039	3,9 3,9 3,9	3,7

5.4-Determinação do teor do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico

As Figuras 3 e 4, apresentam cromatogramas característicos dos ensaios realizados. Na Figura 3, o ponto intermediário da curva padrão, na Figura 4 uma análise da amostra B, representativa das demais amostras.

Os resultados das determinações do teor do 10-HDA estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Teores do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (10-HDA) em amostras de geléia real, expressos em porcentagem.

Amostras	10-HDA (valor médio)	Desvios padrão
A	1,58	0,10
B	3,17	0,23
C	3,39	0,37
D	2,70	0,30
E	1,98	0,12
F	3,10	0,14
G	1,82	0,28

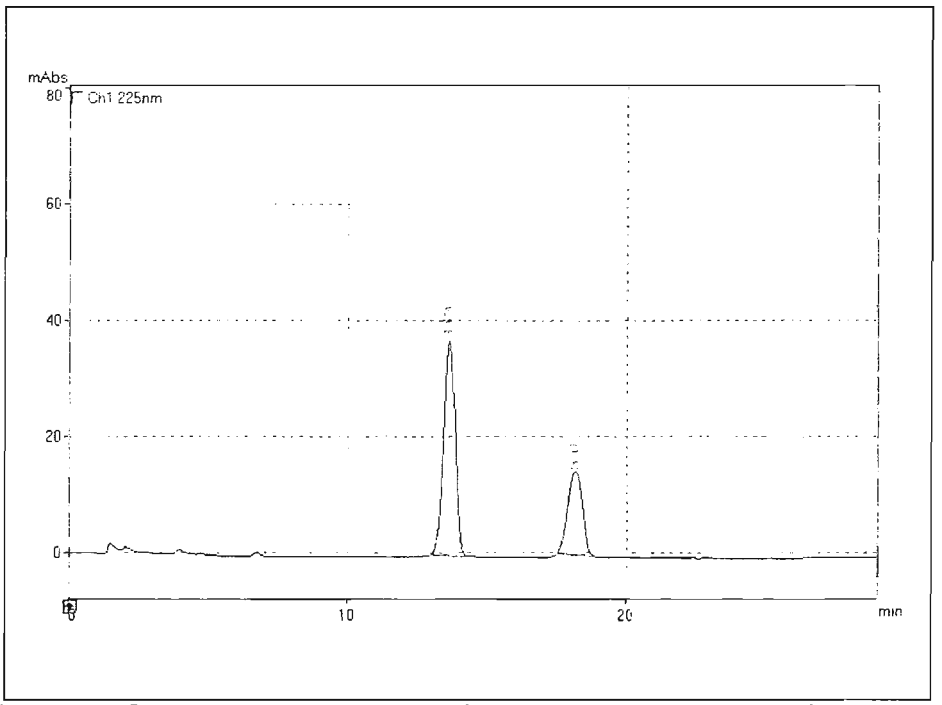

Figura 3: Cromatograma característico do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (ponto intermediário da curva padrão)

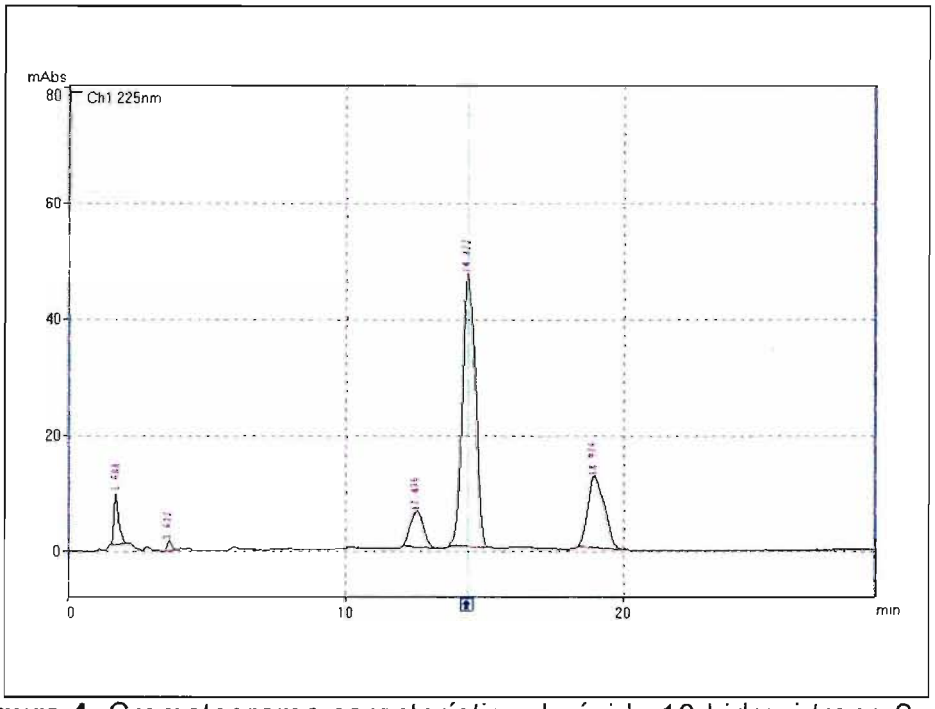

Figura 4: Cromatograma característico do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (amostra B)

Com o teste de recuperação, obteve-se um valor de 99,81% e o limite de detecção foi de 21,41 ng de 10-HDA.

O "software" SPD-MXA, com o qual o equipamento cromatográfico está equipado, nos permite fazer a sobreposição do espectro de absorção do padrão e da amostra analisada. Assim, o pico representativo do 10-HDA que aparece nos cromatogramas das amostras pôde ser confrontado com o pico reprentativo do padrão de referência do 10-HDA. A similaridade nos espectros de absorção (com correlação de 99,97%), indica a identificação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (Figura 5).

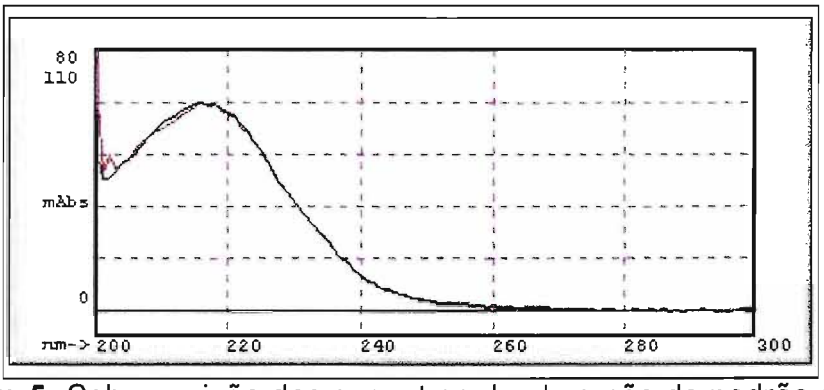

Figura 5: Sobreposição dos espectros de absorção do padrão de referência do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico e do pico representativo do 10-HDA nos cromatogramas das amostras.

Foi realizada a análise de variância das médias dos teores de 10-HDA obtidos, e conclui-se que em nível de significância de 5% estas não são estatisticamente iguais. A análise de variância está apresentada na Tabela 16.

Os resultados de 10-HDA não são equivalentes. Através do método de contraste pode-se obter quais resultados possuem valores estatisticamente iguais. Vide Tabela 17:

Fonte	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Estatística F	P-valor	Conclusão *
Efeito da amostra	6	9,682	1,617	27,61	0,000	Significante
Resíduo (Erro)	14	0,818	0,006			
Total	20	10,501	0,525			

* conclusão ao nível de significância de 5 %

Modelo:
10-HDA = μ + amostra + erro

Hipóteses do teste: H_0 : todas as médias são iguais
H_A : pelo menos uma média é diferente

Estatística do teste: Fobs > Fcritico (ou equivalente se o significado do Fobs for menor que 0,050) rejeita a hipótese H_0 , ou seja, pelo menos uma média difere, e portanto existe efeito da fonte de variação.

Tabela 16: Análise de Variância

Diferenças	d. m. s.	Conclusão a 5%
C - A = 1,81	0,47491	Significante
C - G = 1,57	0,47059	Significante
B - A = 1,60	0,47059	Significante
C - E = 1,41	0,46459	Significante
B - G = 1,35	0,46459	Significante
F - A = 1,53	0,46459	Significante
C - D = 0,69	0,45607	Significante
B - E = 1,19	0,45607	Significante
F - G = 1,28	0,45607	Significante
D - A = 1,13	0,45607	Significante
C - F = 0,29	0,44351	Não Significante
B - D = 0,47	0,44351	Significante
F - E = 1,12	0,44351	Significante
D - G = 0,88	0,44351	Significante
E - A = 0,40	0,44351	Não Significante
C - B = 0,22	0,42328	Não Significante
B - F = 0,07	0,42328	Não Significante
F - D = 0,40	0,42328	Não Significante
D - E = 0,72	0,42328	Significante
E - G = 0,16	0,42328	Não Significante
G - A = 0,24	0,42328	NãoSignificante

Conclusão Geral :

C B F D E G A

— = Médias estatisticamente iguais

Tabela 17: Análises de contrastes (método de Duncan)

Através desta análise pôde-se notar que em nível de significância de 5%, possuem médias estatisticamente iguais as amostras C, B e F (faixa de 3%) e as amostras E, G e A (faixa de 1,8%).

BLOODWORTH *et al.*[6] relataram teores de 10-HDA de 2,80, 6,37 e 4,21% em amostras chinesas, 2,79% em amostras australianas e 1,98% em amostras de procedência ignorada.

Os valores por nós encontrados para o teor do 10-HDA em amostras brasileiras de geléia real, são concordantes com os relatados por BLOODWORTH *et al.*[6].

Ainda em relação ao teor de 10-HDA nas amostras analisadas, pôde-se notar que os valores por nós obtidos e os de BLOODWORTH

BIBLIOTECA

et al.[6] encontram-se basicamente em duas faixas, sendo as nossas por volta de 1,8% e de 3%, e as de BLOODWORTH *et al.*[6] estavam entre 4 e 6%. Com relação às nossas determinações, valores situados ao redor de 3% ocorreram nas amostras que foram colhidas diretamente dos apicultores produtores, ou que foram fornecidas por entrepostos de beneficia-mento/comercialização apícola que declararam quais são os seus fornecedores (amostras B, C, D e F). As demais amostras (A e G), mostraram-se na faixa de 1,8%, igualmente a amostra E, dita de origem chinesa.

5.5-Determinação do teor de vitamina B_6 (piridoxina)

A determinação de piridoxina nas amostras, revelou resultados entre 0,49 e 5,71 μg de piridoxina / g de geléia real. Os resultados das análises do teor de vitamina B_6 na geléia real estão apresentados na Tabela 18.

REMBOLD[45] apresentou um intervalo de 2,2 a 50 μg de piridoxina por grama de geléia real fresca e ARDRY[2] citou o valor de 2,4 μg/g. HAYDAK & PALMER[22] em análises por métodos microbiológicos encontraram valores da ordem de 50 μg de piridoxina/ g de geléia real.

A Figura 6 apresenta um cromatograma típico da determinação de piridoxina nas amostras de geléia real.

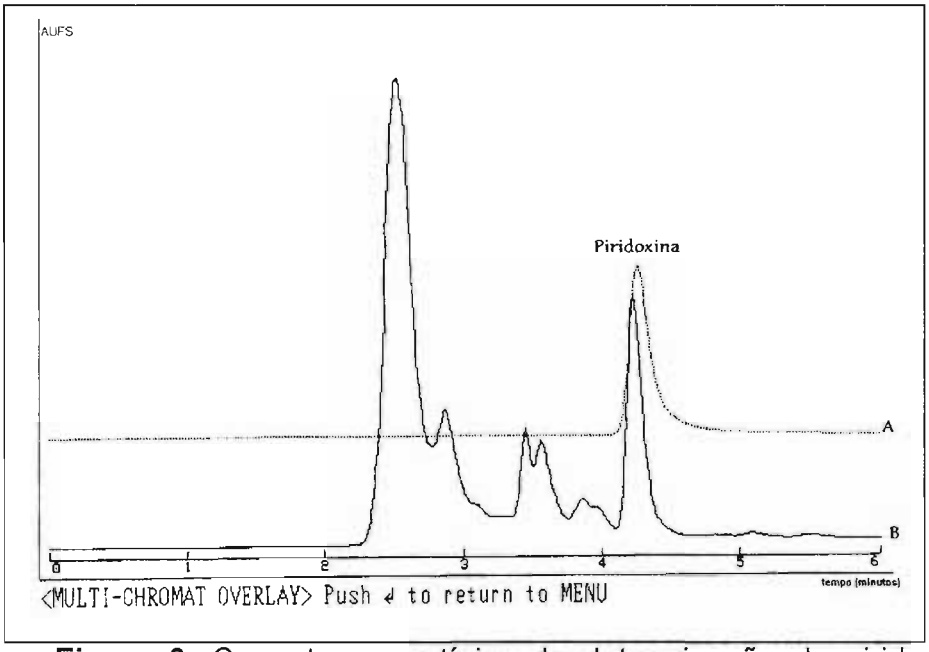

Figura 6: Cromatograma típico da determinação de piridoxina em amostras de geléia real, comparado ao padrão de piridoxina.

Tabela 18: Teores de vitamina B6 (piridoxina) em amostras de geléia real, expressos em μg/g.

Amostras	Piridoxina (valor médio)	Desvios padrão
A	1,72	0,03
B	4,89	0,17
C	1,80	0,02
D	1,06	0,05
E	0,49	0,04
F	5,71	0,67
G	1,07	0,02

5.6-Determinação dos teores de β-caroteno, Vitamina A e Vitamina E.

Nas análises cromatográficas realizadas, não se pôde demonstrar a presença de Vitaminas A, E ou β-caroteno.

5.7-Análise das amostras adulteradas.

A composição centesimal das amostras adulteradas e o teor do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico são apresentados na Tabela 19.

Os resultados indicam que nas adulterações por adição de iogurte, clara, água e pasta de amido, os valores de umidade aumentam proporcionalmente à adição dos adulterantes, enquanto que os valores de cinzas, lípides, proteínas, carboidratos e 10-HDA diminuem.

Todavia, quando o adulterante é leite condensado, ocorre um aumento dos valores de cinzas, lípides e carboidratos, enquanto que os valores de umidade, proteínas e 10-HDA, diminuem proporcionalmente à adulteração.

O teste para verificação da presença de amido com lugol, mostrou-se satisfatório para os três níveis de adulteração.

As amostras adulteradas mostraram pouca solubilidade em meio alcalino, restando em todos os casos turvação em maior ou menor grau quando da adição de hidróxido de sódio 20% à dispersão de amostra preparada. Este teste bastante simples, pode ser de grande utilidade na sugestão de fraude no produto geléia real, uma vez que as amostras autênticas (não adulteradas) são completamente solúveis em meio alcalino.

Tabela 19: Composição centesimal e teor de 10-HDA em amostras adulteradas de geléia real, expressos em porcentagem.

Amostras	Determinações					
	Umidade	Cinzas	Lípides	Proteínas	Carboidratos	10-HDA
Original (B)	67,58	0,93	4,20	11,99	15,30	3,17
10% Leite	59,96	0,90	4,67	12,21	22,26	2,88
25% Leite	52,96	1,01	5,25	11,08	29,7	2,44
50% Leite	40,70	1,89	6,31	9,83	41,27	1,63
10% Iogurte	67,87	0,85	3,92	11,16	16,20	2,75
25% Iogurte	70,7	0,74	3,43	9,98	15,15	2,51
50% Iogurte	75,11	0,67	2,70	7,65	13,87	0,96
10% Clara	66,74	0,84	3,65	12,12	16,65	2,80
25% Clara	70,21	0,74	3,12	11,76	14,17	2,48
50% Clara	76,16	0,66	2,21	11,45	9,52	1,47
10% Água	69,01	0,81	3,7	11,24	15,24	2,83
25% Água	73,99	0,66	2,98	9,21	13,16	2,47
50% Água	81,95	0,48	2,25	6,3	9,02	1,42
10% Amido	67,43	0,85	3,73	11,44	16,55	2,81
25% Amido	72,69	0,61	3,09	9,22	14,39	2,48
50% Amido	79,57	0,42	2,18	6,52	11,31	1,41

Nas figuras 7, 8, 9, 10 e 11 estão apresentados os cromatogramas característicos das determinações do teor de 10-HDA nas amostras adulteradas com iogurte, leite condensado e própolis, clara de ovo, água e pasta de amido, respectivamente.

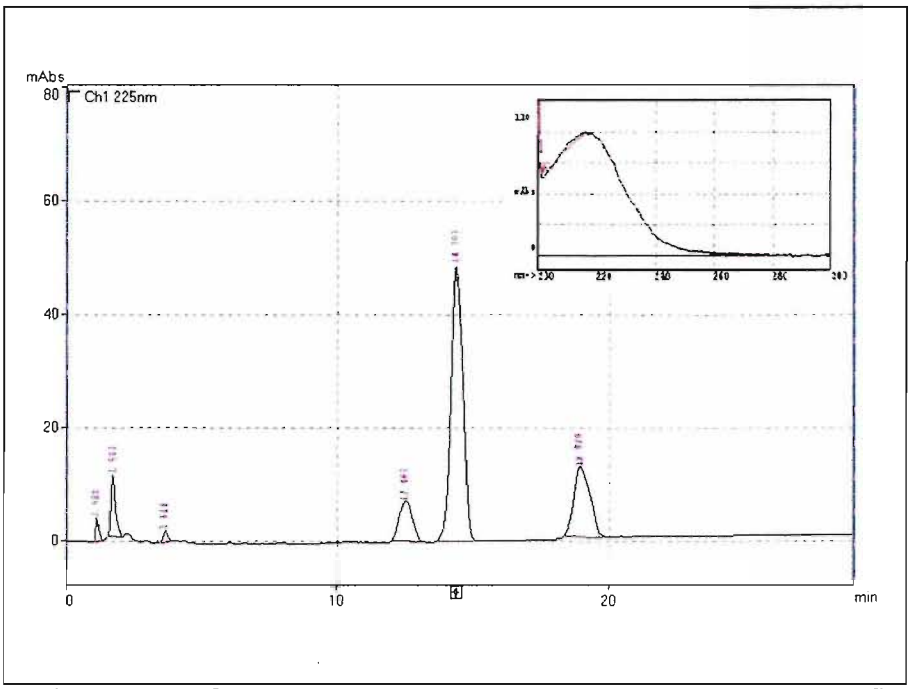

Figura 7: Cromatograma característico da determinação do ácido 10-hidro-xi-trans-2-decenóico em amostras de geléia real adulteradas com iogurte.

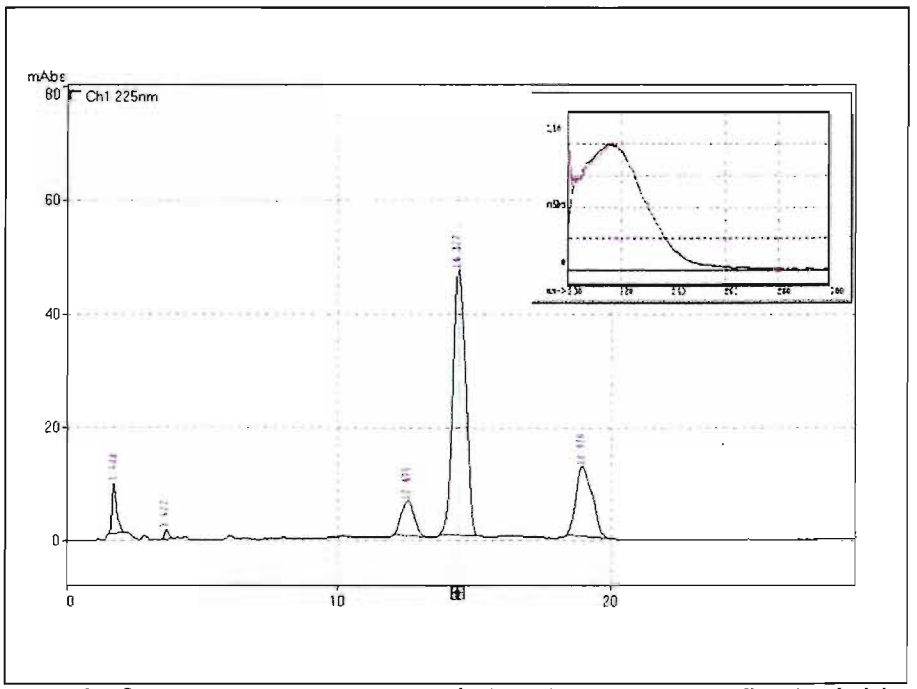

Figura 8: Cromatograma característico da determinação do ácido10-hidroxi-trans-2-decenóico em amostras de geléia real adulteradas com leite condensado.

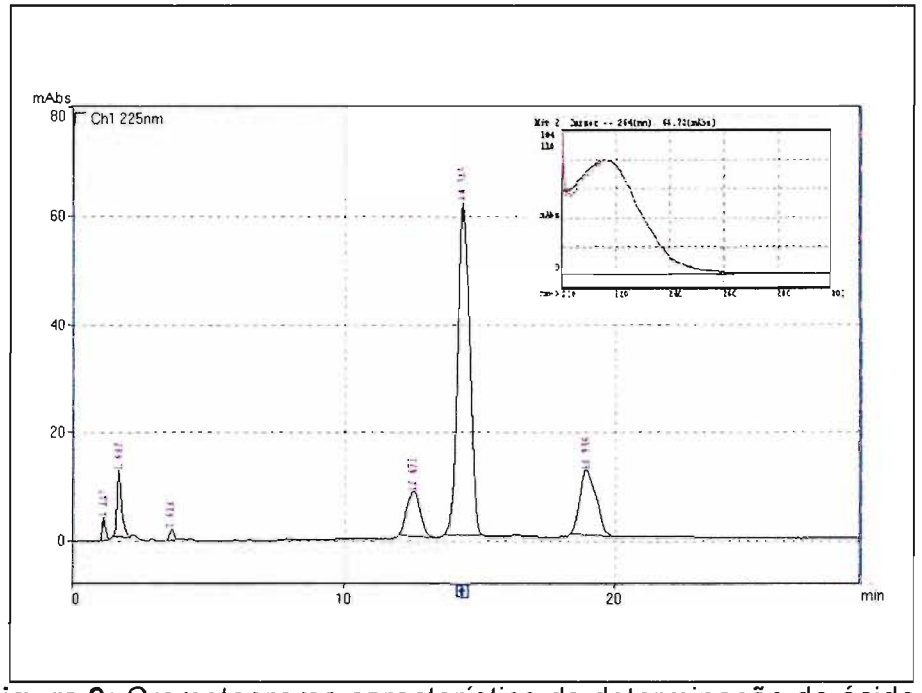

Figura 9: Cromatograma característico da determinação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico em amostras de geléia real adulteradas com clara de ovo.

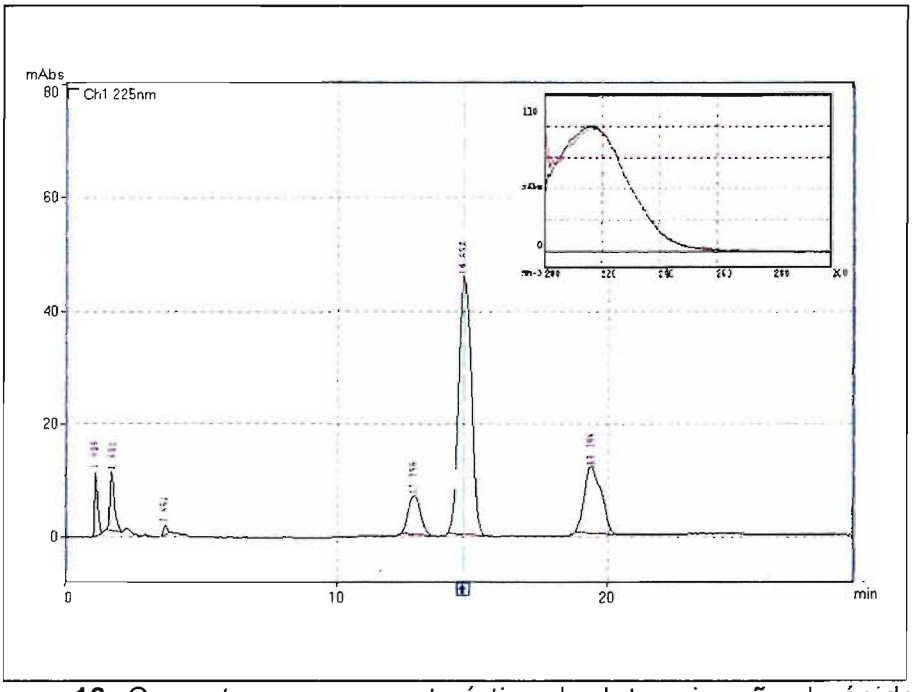

Figura 10: Cromatograma característico da determinação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico em amostras de geléia real adulteradas com água.

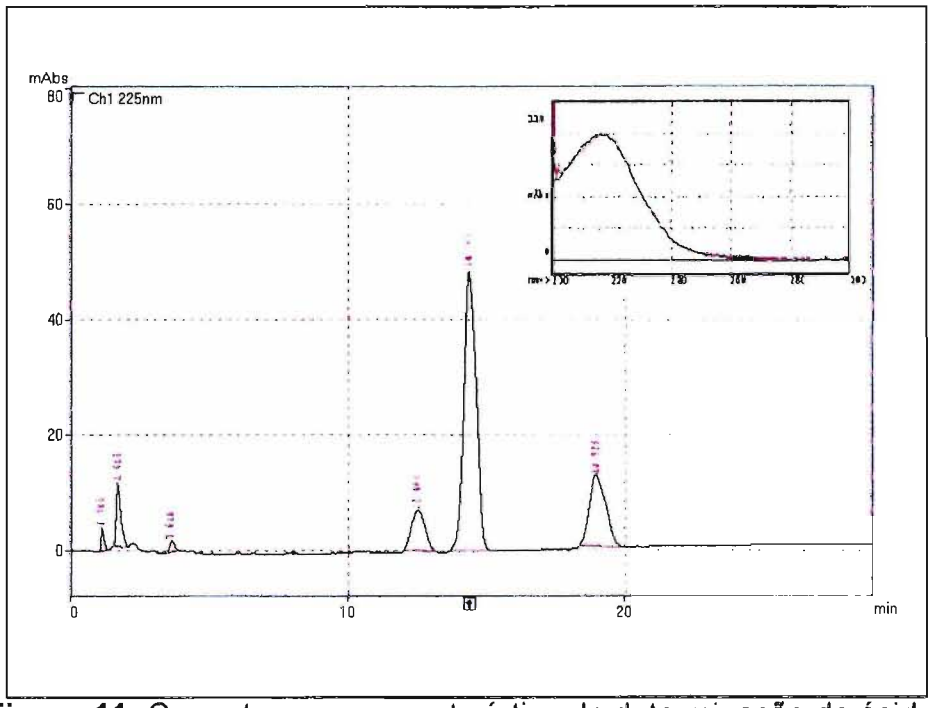

Figura 11: Cromatograma característico da determinação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico em amostras de geléia real adulteradas com pasta de amido.

6- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

6.1- Ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (10-HDA)

O teor de 10-HDA foi obtido por CLAE com o uso de α-naftol como padrão interno. Nestas determinações foi possível assegurar a identificação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico, através da sobreposição dos espectros de absorção do pico representativo do padrão de referência do 10-HDA em relação ao da amostra, com correlação da ordem de 99,97%. O método para análise do 10-HDA apresentou uma recuperação de 99% e limite de detecção de 21 ng, e uma vez que a sua concentração nas amostras é da ordem de mg, considera-se o método satisfatório.

Pelos dados obtidos pudemos afirmar que:

a) A presença do 10-HDA é indicadora da presença de geléia real na amostra.
b) O teor de 10-HDA parece ocorrer entre duas faixas de percentual: por volta de 1,8% e de 3%, o que parece qualificar a geléia real.

6.2-Composição centesimal

Os dados obtidos através das determinações realizadas nos revelam a seguinte composição centesimal média da geléia real:

Umidade	63,00 %
Cinzas	1,00 %
Lípides	3,50 %
Proteínas	13,00 %
Carboidratos	19,50 %

Nas determinações de umidade parece-nos correto afirmar que deve-se dar preferência aos métodos que não utilizam calor, pois o aquecimento torna possível a ocorrência de reações de

escurecimento não enzimático, envolvendo os componentes da amostra, fato este que pode interferir nos resultados.

O emprego do calor para a determinação de umidade, pode ainda favorecer o desprendimento de componentes voláteis normalmente presentes na geléia real, ou de ácidos graxos de cadeia curta, ou ainda de outros compostos que se formam durante o processo.

Assim sendo, nos parece correto dizer que o método baseado na exposição da amostra a ambiente de baixa atividade de água (conseguido em dessecador com ácido sulfúrico) é satisfatório para determinar o teor de umidade em amostras de geléia real.

6.3- Análise de algumas vitaminas na geléia real

Embora tenhamos encontrado nas amostras por nós examinadas, valores que variam de 0,49 a 5,71 μg/g de vitamina B_6, a geléia real não pode ser considerada como boa fonte desta vitamina pois não atende às necessidades diárias recomendadas(2,0 mg/dia para adultos) na quantidade usualmente consumida.

As vitaminas lipossolúveis: vitamina A, pró-vitamina A (β-caroteno) e vitamina E não foram encontradas nas amostras analisadas.

6.4-Fraudes na geléia real

Fraudes no produto geléia real, podem ser detectadas através da análise conjunta de sua composição centesimal, do teor de 10-HDA e dos testes de solubilidade em meio alcalino e com lugol. Nas situações de fraude estudadas, as principais modificações que podem indicar a adulteração do produto são:

- aumento do teor de umidade e diminuição do teor lipídico e proteíco, acompanhado de diminuição do teor de 10-HDA e insolubilidade da amostra em meio alcalino, quando estiver

adulterada por adição de iogurte, clara de ovo, água e pasta de amido, em concentrações superiores a 25%.

- discreto aumento do teor de umidade e diminuição muito discreta do teor lipídico e proteíco, acompanhado de diminuição do teor de 10-HDA e insolubilidade da amostra em meio alcalino, quando estiver adulterada por adição de iogurte, clara de ovo, água e pasta de amido, em concentrações ao redor de 10%.
- aumento do teor lipídico e proteíco e diminuição do teor de umidade, acompanhado de diminuição do teor de 10-HDA e insolubilidade da amostra em meio alcalino, quando estiver adulterada por adição de leite condensado, em concentrações superiores a 10%.
- ausência de 10-HDA quando for falsificação.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

1. ANDONDONSKAJA-RENZ, B., ZEITLER, H.J. Determination of pteridines in royal jelly and caviar by reversed phase high-performance liquid chromatography. *J. Micronutr. Anal.*, Barking, v.5, p.83-90, 1989.

2. ARDRY, R. Contribution à l'étude de la gelée royale. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.14, p.97-118, 1956.

3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 14.ed. Arlington, 1984. p.834-835.

4. BARKER, S.A., FOSTER, A.B., LAMB, D.C., HODGSON, N. Identification of 10-hydroxy-Δ2-decenoic acid in royal jelly. *Nature*, London, v.183, n.4666, p.996-997, 1959.

5. BIANCHINI, R. Análise de vitaminas e β-caroteno em leite bovino. São Paulo, 1998. 161p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

6. BLOODWORTH, BC., HARN, C.S., HOCK, C.T., BOON, Y.O. Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly. *J. AOAC Int.*, Washington, v.78, n.4, p.1019-1023, 1995.

7. BLUM, M.S., NOVAK, A.F., TABER, S. 10-hydroxy-Δ2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science*, Washington, v.130, p.452-453, 1959.

---

[1] De acordo com a NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

8. BROWN, W.H., FELAUER, E.E., FREURE, R.J. Some new components of royal jelly. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v.39, p.1086-1089, 1961.

9. CAMPOS, M.G.R. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, Coimbra, v.11, p.17-47, 1987.

10. CHASE Jr., G.W., SOLIMAN, A.M. Analysis of thiamin, riboflavin, pyridoxine and niacin in multivitamin premixes and supplements by high performance liquid chromatography. *J. Micronutr. Anal.*, Barking, v.7, p.15-25, 1990.

11. CHEN, C., CHEN, S.Y. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chem.*, Barking, v.54, p.195-200, 1995.

12. CHO, Y.T. Studies on royal jelly and abnormal cholesterol and triglycerides. *Am. Bee J.*, Hamilton, v.117, p.36-38, 1977.

13. DEBLOCK-BOSTYN, G. L'abeille et ses produits. *Bull. Soc. Pharm. Lille*, Lille, v.3, p.181-203, 1982.

14. DIXIT, P.K., PATEL, N.G. Insulin-like activity in larval foods of the honeybee. *Nature*, London, v.202, n.4928, p.189-190, 1964.

15. EVANS, H.M., EMERSON, G.A., ECKERT, J.E. Alleged vitamin E content in royal jelly. *J. Econ. Entomol.*, Baltimore, v.30, n.4, p.642-646, 1937.

16. FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt.1

17. FUJIWARA, S., IMAI, J., FUJIWARA, M., YAESHIMA, T., KAWASHIMA, T., KOBAYASHI, K. A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.265, n.19, p.11333-11337, 1990.

18. GLINSKI, Z., RZEDZICKI, J. Analysis of royal jelly of honeybees. *Pol. Arch. Weter.*, Warsaw, v.18, n.3, p.411-418, 1975.

19. GRANADO, F., OLMEDILLA, B., BLANCO, I., HOJAS-HIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.40, n.11, p.2135 -2140, 1992.

20. HABOWSKY, J. E. J., SHUEL, R. W. Separation of the protein constituents of the larval diets of the honeybee by continuous paper electrophoresis. *Can. J. Zool.*, Ottawa, v.37, p.957-964, 1959.

21. HAYDAK, M.H. Larval food and development of castes in the honey bee. *J. Econ. Entomol.*, Baltimore, v. 36, n. 5, p.778-792, 1943.

22. HAYDAK, M.H., PALMER, L.S. Royal jelly and bee bread as sourcer of vitamins B1, B2, B6, C and nicotinic and pantothenic acids. *J. Econ. Entomol.*, Baltimore, v.35, n.3, p.319-320, 1942.

23. HOWE, S.R., DIMICK P.S., BENTON, A.W. Composition of freshly and commercial royal jelly. *J. Apic. Res.*, London, v.24, n.1, p.52-61, 1985.

24. INSTITUTO ADOLFO LUTZ, São Paulo. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1, p.21-22, 27-28, 42-43.

25. IOIRICH, N.P. **As abelhas, farmacêuticas com asas**. 2.ed. Moscovo: Mir, 1986. 248p.

26. ISHIWATA, H., TAKEDA, Y., YAMADA, T., WATANABE, Y., HOSAGAI, T., ITO, S., SAKURAI, H., AOKI, G., USHIAMA, N. Determination and confirmation of methyl p-hydroxybenzoate in royal jelly and other foods produced by the honey bee. *Food Addict. Contam.*, London, v.12, n.2, p.281-285, 1995.

27. JIA, L., ZHANG, H.X., KOU, X.L., HU, Z.D. Separation and determination of 10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, Braunscheweig, v.41, n.9/10, p.605-609, 1995.

28. KARAALI, A., MEYDANOGLU, F., EKE, D. Studies on composition, freeze-drying and storage of turkish royal jelly. *J. Apic. Res.*, London, v.27, n.3, p.182-185, 1988.

29. KIMURA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., GODOY, H.T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoid and provitamins A. *Food Chem.*, Barking, v.35, p.187-195, 1990.

30. KIMURA, Y., KAJIYAMA, S., KANAEDA, J., IZUKAWA, T., YONEKURA, M. N-linked sugar chains of 55-kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Tokyo, v.60, n.12, p.2099-2102, 1996.

31. KIMURA, Y., WASHINO, N., YONEKURA, M. N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Tokyo, v.59, n.3, p.507-509, 1995.

32. KOHASHI, M., TOMITA, K., IWAI, K. Analysis of unconjugated pterins in food resources and human urine. *Agric.Biol.Chem.*, Tokyo, v.44, n.9, p.2089-2094, 1980.

33. LERCKER, G., CAPELLA, P., CONTE, L.S., RUINI, F., GIORDANI, G. Components of royal jelly. I. Identification of the organic acids. *Lipids*, Champaign, v.16, n.12, p.912-919, 1981.

34. LERCKER, G., CAPELLA, P., CONTE, L.S., RUINI, F., GIORDANI, G. Components of royal jelly. II. The lipid fraction, hydrocarbons and sterols. *J. Apic. Res.*, London, v.21, n.3, p.178-184, 1982.

35. LERCKER, G., SAVIOLI, S., VECCHI, M.A., SABATINI, A.G., NANETTI, A., PIANA, L. Carbohydrate determination of royal jelly by high resolution gas chromatography (HRGC). *Food Chem.*, Barking, v.19, p.255-264, 1986.

36. MARKO, P., PECHÁN, I., VITTEK, J. Some phosphorus compounds in royal jelly. *Nature*, London, v.202, n.4928, p.188-189, 1964.

37. MINIERI, L., CHIARAMELLO, S., BUONO, L. La gelatina reale: provenienza, proprietá, utilizzazione. *Acta Med. Vet.*, Naples, v.23, p.265-289, 1977.

38. NASSIS, C.Z., RODRIGUES, A.P., CASSETTARI, A., LÚCIA, A.M.S., MELLO, F.R.L.H. Estudo "in vitro" da atividade antifúngica e antibacteriana da geléia real. *Jornal Bras. Med.*, Rio de Janeiro, v.69, n.5/6, p.80-82, 91-92, 95, 1995.

39. PALMA, M.S. Composition of freshly harvested brazilian royal jelly: identification of carbohydrates from the sugar fraction. *J. Apic. Res.*, London, v.31, n.1, p.42-44, 1992.

40. PATEL, N.G., HAYDAK, M.H., GOCHNAUER, T.A. Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature*, London, v.186, n.4725, p. 633-364, 1960.

41. PATEL, N.G., HAYDAK, M.H., LOVELL, R. Chromatographic investigation of the methyl alcohol/ chloroform-soluble constituents of honeybee larval foods. *Nature*, London, v.191, n.4786, p.362-363, 1961.

42. PLANTA, A. (1888) Ueber den Futtersaft der Bienen. Z. Physiol. Chem. 12: 327-354 Apud: HAYDAK, M.H. Larval food and development of castes in the honey bee. *J. Econ. Entomol.*, Baltimore, v.36, n.5, p.778-792, 1943.

43. PRATT Jr., J.J., HOUSE, H.L. A qualitative analysis of the amino acids in royal jelly. *Science*, Washington, v.110, p.9-10, 1949.

44. RÉAUMUR [Sem dados bibliográficos]. Apud: JOHANSSON, T.S.K. Royal jelly. *Bee World*, Gerrards Cross, v.36, n.1, p.9-13, 1955.

45. REMBOLD, H. Biologically active substances in royal jelly. *Vitam. Horm.*, San Diego, v.23, p.359-382, 1965.

46. RETTENMEIER, R., SCHÛEP, W. Determination of vitamins A and E in liver tissue. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.62, p.312-317, 1992.

47. SERRA-BONVEHÍ, J. Azucares, acidez y pH de la jalea real. *An. Bromatol.*, Madrid, v.44, p.65-69, 1992.

48. SERRA-BONVEHÍ, J. Estudio de la proteina y aminoacidos libres de la jalea real. *An. Bromatol.*, Madrid, v. 42, n. 2, p. 353-365, 1990.

49. SWAMMERDAM [Sem dados bibliográficos]. Apud: JOHANSSON, T.S.K. Royal jelly. *Bee World*, Gerrards Cross, v.36, n.1, p.9-13, 1955.

50. TAKENAKA, T., TAKENAKA, Y. Royal jelly from Apis cerana japonica and Apis mellifera. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Tokyo v.60, n.3, p.518-520, 1996.

51. TOWNSEND, G.F., MORGAN, J.F., HAZLETT, B. Activity of 10-hydroxydecenoic acid from royal jelly against experimental leukaemia and ascitic tumours. *Nature*, London, v.183, n.4670, p.1270-1271, 1959.

52. VITTEK, J., SLOMIANY, B. L. Testosterone in royal jelly. *Experientia*, Basel, v.40, p.104-106, 1984.

53. WEAVER, N. Rearing of honeybee larvae on royal jelly in the laboratory. *Science*, Washington, v.121, p.509-510, 1955.

54. WEAVER, N., KUIKEN, K. A. Quantitative analysis of the essencial amino acids of royal jelly and some pollens. *J. Econ. Entomol.*, Baltimore, v.44, n.5, p.635-638, 1951.

55. WEAVER, N., JOHNSTON, N.C., BENJAMIN, R., LAW, J.H. Novel fatty acids from the royal jelly of honeybees (Apis mellifera, L.). *Lipids*, Champaign, v.3, n.6, p.535-538, 1969.

56. WELLS, F.B. Hive product uses: royal jelly. *Am. Bee J.*, Hamilton, v.116, p.560-561, 565, 1976.

57. WILLSON, R.B. Royal jelly: a review. Part I. *Am. Bee J.*, Hamilton, v.95, p.15-21, 1955.

58. WILLSON, R.B. Royal jelly: a review. Part II. *Am. Bee J.*, Hamilton, v.95, p.55-59, 1955.

RESUMO

A geléia real é um dos principais produtos da colméia que serve como alimento para as larvas em desenvolvimento, assim como para a abelha rainha por toda a sua vida. Tem sido utilizada pelas pessoas como um complemento alimentar devido às suas propriedades revitalizantes. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer as análises físico-químicas e químicas que poderão ser usadas para a caracterização da geléia real e detecção de sua autenticidade ou adulteração, enfatizando-se a determinação do ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (10-HDA). A proposta do trabalho está justificada pela falta de legislação com relação a padrões de identidade e qualidade da geléia real e derivados. Foram determinados emalostras puras e adulteradas (com clara de ovo, água potável, iogurte natural, pasta de amido e uma mistura de leite condensado com própolis) os teores de umidade, cinzas, lípides, proteínas, carboidratos, 10-HDA, pH, acidez titulável, reação com lugol e teste de solubilidade em meio alcalino. Como análises complementares foram determinados os teores das vitaminas B_6, A, pró-vitamina A (β-caroteno) e vitamina E nas amostras puras. Considerando-se os resultados obtidos preconizou-se as determinações de umidade, cinzas, lípides, proteínas, carboidratos, 10-HDA e teste de solubilidade em meio alcalino como os principais itens a serem observados.

SUMMARY

Royal jelly is one of the most important products from beehive, which is used by growing up larves like food, and also for the queen bee for her entire life. It has being used by people as a complement because of the revitalizing properties. The main objective of this work was to establish the physical-chemical and chemical analysis, which could be used for characterization of the adulteration of royal jelly, mainly the 10-hidroxy-trans-2-decenoic acid (10-HDA). The purpose of this study is justified by the lack of legislation concerning the quality and identity standards of royal jelly and derivatives. There were determined in pure and adulterated samples (with condensed milk, water, yogurt, starch, egg white) the analysis of moisture, ash, lipids, proteins, carbohydrates, 10-HDA, pH, titrate acidity, iodine reaction, solubility test in alkaline solution. For complementary tests It was determined the values of vitamin B_6, A, provitamin A, and E in pure samples. Considering the obtained results it was suggested the use of moisture content, ash, lipids, proteins, carbohydrates, 10-HDA and solubility in alkaline solution, as the main items to be observed.