

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PÓLEN APÍCOLA BRASILEIRO: VALOR NUTRITIVO E
FUNCIONAL, QUALIDADE E CONTAMINANTES
INORGÂNICOS

Márcia Cristina Teixeira Martins

Mestre em Farmácia

Profa. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya

Orientadora

Dr. Marcelo Antonio Morgano

Co-Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M366p Martins, Márcia Cristina Teixeira
Pólen apícola brasileiro: valor nutritivo e funcional, qualidade e
contaminantes inorgânicos / Márcia Cristina Teixeira Martins. --
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Delia B. Rodriguez-Amaya
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Pólen apícola. 2. Composição centesimal. 3. Minerais. 4.
Flavonóides. 5. Contaminantes inorgânicos. I. Rodriguez-Amaya,
Delia B.. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Brazilian bee pólen: nutritive and functional value, quality and inorganic
contaminants

Palavras-chave em inglês (Keywords): Bee polen, Proximate composition, Minerals, Flavonoids,
Inorganic compounds

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Delia B. Rodríguez-Amaya
Deborah Helena Markowicz Bastos
Eduardo Vicente
Lísia Senger Huber
Regina Furlani

Data de defesa: 25/02/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA:

Dra Delia B. Rodriguez-Amaya
(Orientadora)

Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos

Dr. Eduardo Vicente

Dra. Lísia Senger Huber

Dra. Regina Prado Zanes Furlani

*Adquire a sabedoria,
adquire o entendimento
e não te esqueças
das palavras da minha boca
nem delas te apartes.*

Provérbios 4:5, Bíblia Sagrada

DEDICO,
esta conquista a Deus,
ao meu querido esposo Leonardo,
aos amados filhos Lucas Henrique e Jacqueline Sílvia e
à minha mãe amada Yara Maria,
por todo amor, carinho, apoio, incentivo e alegrias...

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, razão da minha existência, esperança da eternidade, fonte de sabedoria, amor e salvação. Presença constante e evidente em minha vida. *Este trabalho é fruto da Sua poderosa mão...*

Ao meu esposo **Leonardo** e filhos, **Lucas Henrique** e **Jacqueline Sílvia**, amados e amigos, grandes incentivadores, por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis e de grande sobrecarga... *Seu amor e apoio incondicionais me deram forças para prosseguir!*

À minha mãe, **Yara Maria**. *Sua mão sempre esteve a me auxiliar e a me aconselhar sabiamente, do início ao fim... Nunca poderei agradecer ou retribuir seu grande amor expresso em palavras e ações...*

À Profa. **Delia**, por sempre acreditar e confiar no meu trabalho. *Sua orientação foi para mim motivo de grande honra e de inestimável valor. Seu exemplo de excelência, ética e dedicação será inesquecível. Foi um privilégio ser sua aluna! Obrigada por mostrar-me que sempre é possível melhorar...*

Ao Dr. **Marcelo A. Morgano**, dedicado e competente co-orientador e coordenador dos Projetos de Pesquisa que resultaram neste trabalho. *Obrigada por confiar no meu trabalho e compartilhar seu conhecimento, confiança, convivência, apoio e amizade!*

Aos co-autores deste trabalho, Dra. **Maria Isabel Rodrigues**, Dr. **Eduardo Vicente**, Dra. **Sueli R. Bagio**, Dra. **Vera Sônia Nunes da Silva**, **Luana C. Rabonato**, **Raquel F. Milani** e **Katumi Yotsui Anagi**, pelo apoio técnico e valiosas contribuições.

Aos membros da banca examinadora, Dra. **Deborah Helena Markowicz Bastos**, Dr. **Eduardo Vicente**, Dra. **Lísia Senger Huber** e Dra. **Regina Furlani**, pelas excelentes sugestões e acurada revisão deste trabalho.

À **FAPESP** ao **CNPq** e ao **UNASP**, pelo apoio financeiro.

Aos irmãos, **Roberto Sidney e Carlos Eduardo**. *Sempre pude contar com vocês (a qualquer hora do dia ou da noite)... Obrigada!*

Aos sogros, **Sarah e Leonardo**. *Vocês são como pais para mim. Fonte de apoio constante e incondicional. Não há palavras para agradecer...*

Aos cunhados **Jussara e Mark** e sobrinhos **Alex e Stephanie**. *Vocês formam parte importante da “torcida organizada”!*

À toda a minha **família**, pela compreensão e constante incentivo. *Vocês são especiais!*

Aos queridos colegas de trabalho e alunos do **UNASP** e aos irmãos da **Igreja Adventista do Sétimo Dia**, pelas orações, incentivo e carinho cristão. *Jamais esquecerei o seu apoio. Vocês são amigos e irmãos de verdade e da verdade!*

À amiga **Lísia**, que acompanhou este trabalho desde o início até sua conclusão, por sua amizade, apoio e carinho.

Aos amigos queridos do Laboratório de Carotenóides, **Aline, Cíntia, Emilson, Giovanna, Michelle, Natália e Renato**, companheiros de todos os momentos que transformaram horas e horas de trabalho em momentos tão agradáveis e especiais! *Como agradecer toda força, auxílio e compreensão de vocês? Jamais esquecerei... Vocês são mais que especiais!*

Às queridas **Débora e Renata**, sempre dispostas a ajudar. *Obrigada! Levo vocês no meu coração...*

Aos caros, **funcionários** do Departamento de Ciência de Alimentos, da biblioteca e da secretaria de pós-graduação, especialmente ao **Cosme e Marcos** e aos demais funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelo auxílio constante.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram na construção desse trabalho, seja pelas sugestões, ou preciosa amizade.

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	xxi
INTRODUÇÃO GERAL.....	xxv

CAPÍTULO 1: O paradoxo do pólen apícola: efeitos biológicos, valor nutritivo, qualidade e uso como bioindicador de poluição ambiental.....	1
---	----------

Resumo.....	3
Summary.....	4
Introdução.....	5
Efeitos biológicos do pólen apícola.....	7
Fatores que influem na composição do pólen apícola.....	9
Valor nutritivo e qualidade do pólen apícola.....	10
Flavonóides em pólen apícola.....	21
Pólen apícola na alimentação humana.....	25
Pólen apícola como bioindicador de poluição ambiental.....	26
Considerações finais.....	29
Agradecimentos.....	30
Referências.....	30

CAPÍTULO 2: Pólen apícola brasileiro: composição química, qualidade e valor nutritivo.....	45
---	-----------

Resumo.....	47
Abstract.....	48
1. Introdução.....	49
2. Materiais e Métodos.....	53
2.1. Amostras.....	53
2.2. Análises físico-químicas.....	55
2.3. Análises estatísticas.....	57
2.4. Análise hierárquica de agrupamento e análise de componentes principais.....	58
3. Resultados e Discussão.....	59
3.1. Avaliação do método de titulação Karl Fischer para determinação de umidade...	59
3.2. Determinação da composição físico-química.....	62
3.3. Agrupamentos hierárquicos e componentes principais.....	79
4. Conclusões.....	81
Agradecimentos.....	83
Referências.....	83

CAPÍTULO 3: Mineral composition of bee pollen collected from eleven Brazilian states.....	91
Abstract.....	93
1. Introduction.....	94
2. Materials and Methods.....	96
2.1. Samples.....	96
2.2. Digestion of sample.....	97
2.3. Instrumentation.....	98
2.4. Analytical curves.....	99
2.5. Evaluation of method performance.....	100
2.6. Statistical analysis.....	100
2.7. Hierarchical Cluster Analysis and Principal Component Analysis.....	101
2.8. Estimation of microelement daily intake.....	101
3. Results and Discussion.....	102
3.1. Method performance.....	102
3.2. Composition of mineral elements in Brazilian bee pollen samples.....	106
3.3. Hierarchical cluster and principal components.....	115
3.4. Estimated micronutrient contribution of pollen to the diet.....	117
4. Conclusions.....	118
Acknowledgements.....	119
References.....	119

CAPÍTULO 4: Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta.....	123
RESUMO.....	125
ABSTRACT.....	126
INTRODUÇÃO.....	127
MATERIAL E MÉTODOS.....	130
Amostras.....	130
Reagentes e padrões.....	131
Equipamento e condições cromatográficas.....	132
Extração e hidrólise dos flavonóides.....	133
Planejamento experimental e análise de superfície de resposta.....	134
Validação da extração e método cromatográfico.....	135
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	136
Condições cromatográficas.....	136
Análise dos resultados dos DCCRs utilizados na otimização da extração/hidrólise das agliconas.....	139
Avaliação da metodologia analítica.....	147
CONCLUSÕES.....	149

AGRADECIMENTOS.....	149
REFERÊNCIAS.....	149
CAPÍTULO 5: Flavonóides em pólen apícola de três estados brasileiros.....	155
Resumo.....	157
Summary.....	158
1. Introdução.....	159
2. Materiais e Métodos.....	161
2.1. Amostras.....	161
2.2. Reagentes e padrões.....	162
2.3. Análise de flavonóides.....	163
2.4. Análise dos dados.....	164
3. Resultados e Discussão.....	165
4. Conclusões.....	170
Agradecimentos.....	171
Referências.....	171
CAPÍTULO 6: Inorganic Contaminants in Bee Pollen from Southeastern Brazil..	177
ABSTRACT.....	179
INTRODUCTION.....	180
MATERIALS AND METHODS.....	181
Sampling.....	181
Analytical Method and Instrumentation.....	182
Hydride Generator.....	183
Analytical Curves.....	183
Evaluation of the Method Performance.....	184
Statistical Analysis.....	184
Calculation of Potential Exposure.....	184
RESULTS AND DISCUSSION.....	184
Method Performance.....	184
Levels of the Inorganic Contaminants.....	186
Inorganic Contaminant Levels vs. Location of Apiary.....	193
Inorganic Contaminant Levels vs Rainfall.....	195
Risk Evaluation.....	197
CONCLUSIONS.....	199
ACKNOWLEDGEMENTS.....	200
LITERATURE CITED.....	201
CONCLUSÕES GERAIS.....	207

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Composição centesimal do pólen apícola apresentada por alguns estudos do Brasil.....	12
Tabela 2. Composição centesimal do pólen apícola apresentada por alguns estudos internacionais.....	13
Tabela 3. Limites estabelecidos para o pólen apícola desidratado quanto aos parâmetros umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, segundo as legislações brasileira e argentina.....	14
Tabela 4. Conteúdo de elementos minerais predominantes em pólen apícola.....	19
Tabela 5. Conteúdo de elementos minerais (componentes menores) em pólen apícola.....	20
Tabela 6. Flavonóides agliconas identificados em pólen apícola.....	22
Tabela 7. Flavonóides glicosídeos identificados em pólen apícola.....	24
Tabela 8. Teores de contaminantes inorgânicos em pólen apícola.....	28

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Procedência e número de amostras de pólen apícola brasileiro.....	54
Tabela 2. Influência da temperatura (n=5) e da massa (n=6) de pólen sobre os teores de umidade obtidos pelo método da titulação Karl Fischer.....	60
Tabela 3. Resultados obtidos das análises físico-químicas das 154 amostras de pólen apícola coletadas no período de 2007 a 2008.....	63
Tabela 4. Limites propostos por Campos et al. (2008) e estabelecidos pelas legislações brasileira e argentina para pólen apícola desidratado quanto aos parâmetros de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas.....	64
Tabela 5. Composição em aminoácidos livres em amostras pólen apícola (n=22) coletadas no período de 2007 a 2008.....	77

CAPÍTULO 3

Table 1. Operating conditions of the microwave digester for bee pollen sample mineralization.....	98
Table 2. Operating conditions of the ICP OES equipment for determining mineral elements in bee pollen.....	99
Table 3. Performance characteristics of the method for determining bee pollen mineral elements.....	103
Table 4. Mean recovery percentages obtained for the elements studied.....	104
Table 5. Comparison of the mineral contents obtained by ICP OES using microwave-assisted digestion and the certified values for the NIST 1566a certified reference material (oyster tissue).....	105
Table 6. Mineral contents of 154 dehydrated bee pollen samples collected from 11 Brazilian states and the Federal District.....	107
Table 7. Percentage contribution of the mineral elements to Dietary Reference Intakes (DRI) for adults in relation to the mean levels found in the 154 Brazilian bee pollen samples.....	118

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Condições experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as respostas para os flavonóides analisados nas amostras de pólen apícola.....	140
Tabela 2. Estimativas dos coeficientes da regressão do modelo polinomial quadrático e significância (p-valor), para a resposta dos teores de flavonóides agliconas nas amostras de pólen analisadas.....	144
Tabela 3. Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl (x_1) e tempo de hidrólise (x_2) presentes nas amostras de pólen analisadas.....	145
Tabela 4. Propriedades das curvas padrão.....	148
Tabela 5. Teores de flavonóides em amostra de pólen do estado de São Paulo e seus respectivos coeficientes de variação.....	148
Tabela 6. Quantidades adicionadas, percentagens de recuperação e coeficientes de	

variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados em amostra de pólen do estado da Bahia.....	148
--	-----

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Teores de flavonóides agliconas em 36 amostras de pólen apícola desidratado coletadas nos estados: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC).....	168
--	-----

CAPÍTULO 6

Table 1. Performance characteristics of the method for determining bee pollen inorganic contaminants.....	185
Table 2. Mean recovery percentages obtained for the elements studied.....	186
Table 3. Inorganic contaminants levels in dehydrated bee pollen samples collected in one year in Brazilian Southeastern states.....	188
Table 4. Occurrence of inorganic contaminants, weekly ingestion and percentage of PTWI estimated for the consumption of one daily portion of dehydrated bee pollen of 25 g for adults and 10 g for children, based on average values found in 43 samples collected in three states from Southeastern states during a year.....	198

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Influência do tamanho das partículas do grão de pólen na curva de titulação Karl Fischer.....	62
Figura 2. Dendograma obtido a partir da composição físico-química de 154 amostras de pólen apícola desidratado procedente de 11 estados e Distrito Federal.....	80
Figura 3. Componente principal 1 versus componente principal 2 obtidos a partir da composição físico-química de 154 amostras de pólen apícola desidratado procedente de 12 estados do Brasil.....	81

CAPÍTULO 3

Figure 1. Localization of bee pollen sample collection areas. Southern states: Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), and Paraná (PR). Southeastern states: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES). Midwestern state: Mato Grosso (MT). Northeastern states: Bahia (BA), Ceará (CE), Piauí (PI), Sergipe (SE). Central region: DF = Federal District.....	96
Figure 2. Graph showing the proportion in percentage of the mean composition of bee pollen samples from 11 Brazilian states and the Federal District.....	108
Figure 3. Monthly variation of zinc, copper and selenium levels of bee pollen during one year of production from the same sites of the following states: Santa Catarina (SC), São Paulo (SP), Sergipe (SE) and Bahia (BA).....	111
Figure 4. Dendogram obtained from mean composition of mineral elements in 154 dehydrated bee pollen samples from 11 Brazilian states and the Federal District.....	115
Figure 5. Principal components 1 and 2 obtained from mean composition of mineral elements present in 154 dehydrated bee pollen samples from eleven Brazilian states and the Federal District.....	116

CAPÍTULO 4.

Figura 1. Método empírico para obtenção de fase móvel com a força cromatográfica ótima para separação de flavonóides agliconas (M: miricetina, L: luteolina, Q: quercetina, A: apigenina, I: isoramnetina e K: kanferol): (A) Fase móvel (FM):

Metanol:THF:H₂O 50:33:17, (B) FM: Metanol:THF:H₂O 42:28:30, (C): FM: Metanol:THF:H₂O 35:23:42; (D) FM: Metanol:THF:H₂O 26:17:57. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm). FMs acidificadas com 0,3% de ácido fórmico), Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 µL, detecção: UV, 370 nm... 138

Figura 2. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, I=isoramnetina, K=kanferol, dos extratos hidrolisados de pólen do estado da Bahia, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) sem HCl por 30 minutos, (B) com HCl 1,0M por 30 minutos e (C) com HCl 1,7M por 51 minutos. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), fase móvel Metanol:THF:H₂O 26:17:57 (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) em corrida isocrática. Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 µL, detecção: UV, 370 nm..... 142

Figura 3. Curvas de contorno para a concentração das agliconas miricetina, luteolina, quercetina, isoramnetina e kanferol como uma função do tempo (minutos) e da concentração de ácido clorídrico (M) em amostras de pólen apícola provenientes dos estados: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC)..... 146

CAPÍTULO 5

Figura 1. Cromatogramas dos flavonóides agliconas M=miricetina, L=luteolina, Q=quercetina, I=isoramnetina e K=kanferol, dos extratos hidrolisados de amostras pólen apícola desidratado coletadas em São Paulo (SP), Bahia (BA) e Santa Catarina (SC) para coluna Symmetry C18, fase móvel composta por metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17), acidificada com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática..... 166

CAPÍTULO 6

Figure 1. Localization of bee pollen sample collection areas. Southeastern states: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES)..... 182

Figure 2. Annual variation of inorganic contaminant levels in bee pollen samples collected in an urban and a rural site in two Brazilian Southeastern states..... 194

Figure 3. Inorganic contaminant average levels in bee pollen samples from Brazilian Southeastern states during one year..... 196

Figure 4. Monthly accumulated precipitation in Brazilian Southeastern states: Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) and São Paulo (SP) states during a year (data conceded by National Institute of Meteorology – INMET)..... 197

RESUMO GERAL

Considerando o mercado favorável ao consumo de produtos naturais de elevado valor nutritivo, complementares à dieta ou com efeitos terapêuticos, as perspectivas positivas para o Brasil na cadeia produtiva apícola por seu clima e flora propícios, bem como o possível emprego do pólen apícola como indicador de poluição ambiental, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o pólen apícola nacional desidratado e pronto para o consumo quanto à composição química, de minerais, flavonóides e contaminantes inorgânicos.

A literatura é discutida no Capítulo 1, no qual são apresentados estudos brasileiros e de outros países sobre a composição do pólen apícola, focalizando o seu valor nutritivo, o alto conteúdo de flavonóides, bem como a presença de contaminantes inorgânicos e suas implicações sobre a segurança do produto e poluição ambiental.

O Capítulo 2 apresenta os resultados da análise de 154 amostras de pólen apícola desidratado, pronto para consumo, procedentes de 11 diferentes estados do Brasil e do Distrito Federal, coletadas nos anos de 2007 e 2008, quanto à sua composição centesimal (umidade, acidez livre, proteínas, lipídeos totais, cinzas e açúcares), sendo os aminoácidos livres identificados e quantificados em 22 amostras. O método de Karl Fischer para a determinação de umidade foi otimizado e aplicado. A composição das amostras de pólen apícola apresentou grande variação de resultados dentro e entre todos os estados brasileiros, sendo: 3,00 a 9,39 % para umidade; 1,33 a 4,13 g/100g para cinzas; 4,01 a 13,32 g/100g para lipídeos; 12,28 a 27,07 g/100g para proteínas; 6,99 a 21,85 g/100g para glicose; 12,59

a 23,62 g/100g para frutose e 105,3 a 609,9 meq/Kg para acidez. Os resultados foram discutidos em relação aos padrões de qualidade vigentes e ao valor nutritivo do produto na alimentação humana e apontam para a necessidade da revisão de tais padrões e para o controle da cadeia de produção deste produto.

No Capítulo 3 a composição mineral foi determinada nas 154 amostras de 11 estados brasileiros e do Distrito Federal, coletadas em 2007 e 2008. Os elementos minerais foram quantificados usando espectrometria de emissão ótica em plasma com acoplamento indutivo (ICP OES). Os níveis médios obtidos foram 828 a 4670 mg/Kg para cálcio, 3 a 25 mg/Kg para cobre, 11 a 552 mg/Kg para ferro, 1431 a 9910 mg/Kg para potássio, 348 a 3621 mg/Kg para magnésio, 12 a 211 mg/Kg para manganês, <0,004 a 1466 mg/Kg para sódio, 2177 a 8165 mg/Kg para fósforo, <0,01 a 4.4 mg/Kg para selênio e 5 a 76 mg/Kg para zinco. Manganês, selênio, cobre, zinco e ferro foram os elementos que apresentaram maiores contribuições nos valores de ingestão diária recomendada (IDR), quando se considera o consumo de uma porção diária de 25 g, alcançando 70%, 37%, 27%, 17% e 15% da IDR, respectivamente.

O Capítulo 4 descreve o desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas em amostras de pólen apícola desidratado coletadas em três estados brasileiros. Utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional, obteve-se a melhor condição para extração e hidrólise dos flavonóides encontrados na forma glicosídica a suas respectivas agliconas: 1,0M de HCl por 30 minutos. A melhor separação (CLAE) dos flavonóides foi conseguida com a coluna de fase reversa Symmetry

C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17), acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática.

Aplicando as condições estabelecidas para a análise no Capítulo 4, no Capítulo 5 foram identificados e quantificados os flavonóides de 36 amostras de pólen apícola desidratado produzidas em três estados brasileiros (Bahia, Santa Catarina e São Paulo). Apigenina não foi identificada em nenhuma das amostras, enquanto quercetina foi a aglicona mais frequente, estando presente em quase todas as amostras estudadas. As agliconas frequentes nas amostras analisadas foram: de SP, miricetina, luteolina e quercetina; BA, quercetina e isoramnetina; SC, quercetina e kanferol. Os teores variaram entre 119 e 5587 μ g/g para miricetina; 14,4 e 3429 μ g/g para luteolina; 28,1 e 2700 μ g/g para quercetina; 11,6 e 1879 μ g/g para isoramnetina e 70,2 e 3056 μ g/g para kanferol, sendo variável também entre amostras do mesmo local.

No Capítulo 6 são apresentados os experimentos de desenvolvimento e validação do método para determinação de contaminantes inorgânicos em 43 amostras de pólen apícola coletadas na região sudeste do Brasil durante um ano. A digestão ácida das amostras foi realizada em sistema fechado assistido por microondas e a quantificação dos elementos foi feita por ICP OES. O método apresentou desempenho satisfatório com boa exatidão e precisão. As faixas dos teores médios foram: 10,4 a 268,0 mg/Kg para Al, <0,01 a 1,38 mg/Kg para As, 2,78 a 17,63 mg/Kg para Ba, 0,003 a 0,233 mg/Kg para Cd, <0,01 a 1,11 mg/Kg para Co, <0,01 a 2,32 mg/Kg para Cr, <0,10 a 1,13 mg/Kg para Ni, <0,01 a 0,44 mg/Kg para Pb, <0,035 a 1,33 mg/Kg para Sb e <0,0004 a 0,0068 mg/Kg para Hg. A estimativa de ingestão mostrou que Al e As apresentaram as maiores contribuições para a

dieta, com os teores médios de PTWI (ingestão semanal tolerável provisória) de 27% e 8%, respectivamente. O pólen apícola do estado de Espírito Santo apresentou níveis menores de contaminantes.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil e no mundo a ascensão econômica e o crescimento da população urbana têm afetado o seu modo de vida e apresenta reflexos importantes no seu padrão de consumo alimentar. Também crescente é a conscientização da população sobre a importância de se promover a saúde por meio de uma alimentação equilibrada. Com isso aumenta também a demanda por produtos naturais, de elevado valor nutritivo, complementares à dieta ou com efeitos terapêuticos. Entre esses, encontram-se os produtos apícolas (mel, própolis, geléia real e pólen).

A produção brasileira de pólen apícola iniciou de forma modesta no final da década de 80, mas tem apresentado crescente desenvolvimento graças ao potencial apícola do Brasil, que, pela extensão de seu território, floradas diversificadas e seu clima propício possibilitam a produção durante todo o ano. Atualmente, a procura de pólen apícola, tanto no mercado interno como externo, tem impulsionado essa modalidade da cadeia produtiva apícola. Com isso, faz-se necessária a investigação científica do produto com vistas à sua qualidade, valor nutritivo e presença de componentes bioativos.

Se, por um lado, o pólen apícola pode ser indicado como complemento ou suplemento alimentar, por outro tem sido apontado na literatura científica como um bioindicador de poluição ambiental. Deste modo, é imprescindível investigar neste produto a presença de contaminantes inorgânicos tanto para obter informações sobre a poluição ambiental quanto para verificar a segurança do seu consumo.

Este trabalho, portanto, teve como objetivo geral caracterizar quanto à composição de minerais, contaminantes inorgânicos, flavonóides e composição centesimal o pólen apícola

brasileiro, obtido de diferentes regiões produtoras. Os objetivos específicos foram: (1) determinar a composição físico-química (umidade, acidez-livre, proteínas, lipídeos totais, principais açúcares, cinzas e aminoácidos livres); (2) quantificar elementos minerais cálcio, cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, sódio, selênio e zinco e os contaminantes inorgânicos alumínio, arsênio, bário, cádmio, crômio, níquel, chumbo, antimônio e mercúrio após validação da metodologia com digestão da amostra em sistema fechado assistido por microondas e (3) identificar e quantificar flavonóis e flavonas, após otimização das condições para extração e hidrólise das amostras de pólen apícola.

CAPÍTULO 1

O paradoxo do pólen apícola: Efeitos biológicos, valor nutritivo, qualidade e uso como bioindicador de poluição ambiental

MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA MARTINS

DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

MARCELO ANTONIO MORGANO

Artigo a ser submetido à Revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición

**O PARADOXO DO PÓLEN APÍCOLA: EFEITOS BIOLÓGICOS, VALOR
NUTRITIVO, QUALIDADE E USO COMO BIOINDICADOR DE POLUIÇÃO
AMBIENTAL**

Marcia C. TEIXEIRA MARTINS^{1,2}, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA^{1*}, Marcelo A. MORGANO³

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, 13083-862, Campinas, SP. Telefone: (19) 3521-4013. E-mail: delia@fea.unicamp.br

²Centro Universitário Adventista de São Paulo (UNASP), Estr. Itapecerica, 5898, 05858-001, São Paulo, SP.

³Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, 13070-178.

RESUMO. O Brasil é considerado um importante produtor de pólen apícola e apresenta grande potencial de crescimento, pois o clima, a flora e a vasta extensão territorial são altamente favoráveis à atividade apícola. O pólen apícola tem sido empregado na alimentação humana, reconhecido por sua composição nutritiva, rica em proteínas, vitaminas, minerais e alguns tipos de carboidratos, além do interesse por suas propriedades funcionais. Por outro lado, este produto é sujeito a contaminação com metais pesados, podendo ser utilizado como indicador biológico de poluição ambiental. Neste artigo de revisão são apresentados dados nacionais e internacionais sobre atividade biológica e composição do pólen apícola, focalizando o seu valor nutritivo, o alto conteúdo de flavonóides, bem como a presença de contaminantes inorgânicos e suas implicações sobre a segurança do produto e poluição ambiental.

Palavras-chave: pólen apícola, composição físico-química, contaminantes inorgânicos.

SUMMARY. Brazil is an important producer of bee pollen, with great potential for expansion, considering the climate, flora and vast territorial extension that favor apicultural activities. Bee pollen has been used in human diet, recognized for its nutritive composition, rich in proteins, vitamins, minerals and certain types of carbohydrates, and its functional properties. On the other hand, this product is subject to contamination with heavy metals, and can be utilized as indicator of environmental pollution. This review article presents national and international data on the biological activity and composition of bee pollen, highlighting its high nutritive value and high flavonoid content, as well as the presence of inorganic contaminants and implications on the product's safety and on environmental pollution.

Key words: bee collected pollen, physico-chemical composition, inorganic contaminants.

INTRODUÇÃO

A procura por produtos apícolas vem aumentando no Brasil e em várias partes do mundo, devido ao mercado favorável ao consumo de produtos naturais, com propriedades funcionais e/ou nutritivas (1-4). A produção de pólen apícola iniciou-se no Brasil no final da década de 80 (5). Juntamente com a Espanha (6) o Brasil é considerado um importante produtor de pólen apícola (7). Entretanto, ao estudar o perfil da produção brasileira, Barreto et al. (5) concluíram ser esta ainda pouco explorada, frente ao grande potencial de crescimento. Por sua vasta extensão territorial e clima propício para o desenvolvimento de flora melífera abundante e variada, o Brasil apresenta condições favoráveis para a exploração apícola.

O pólen de flores é o elemento masculino da planta cuja função é fecundar o elemento feminino e reproduzir novos seres da mesma espécie (8). Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola (9) o *“pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada por abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colméia”*. Assim, por meio de aparelhos especiais, os chamados coletores ou armadilhas de pólen, instalados na entrada da colméia, o apicultor pode se apoderar de uma parte do pólen coletado pelas abelhas.

Há séculos o pólen apícola faz parte da dieta humana (2,3), havendo registro de seu consumo intencional por indígenas norte-americanos entre 1400 e 200 A.C. (10).

Atualmente, os produtos com pólen são comercializados em lojas de alimentos naturais, drogarias e outros estabelecimentos comerciais, sendo consumidos *in natura* ou desidratado. As recomendações para o consumo diário variam de 5 a 25 g por dia, acompanhado ou não de outros alimentos como iogurte, mel, suco de fruta, etc. (2,11,12). Também pode ser empregado em preparações culinárias, tais como pães, sopas, bolos e arroz (2).

O pólen apícola apresenta uma composição aproximada de 13 a 55% de carboidratos, 7 a 40% de proteínas, 1 a 20% de lipídeos, 3 a 28% de água, 2 a 6% de cinzas e 0,3 – 20% de fibra dietética. Contém diferentes vitaminas (β -caroteno, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido ascórbico, biotina, ácido fólico e tocoferol), resinas, compostos polifenólicos (2-5%) e substâncias antibióticas (6,11,13-19). O pólen também contém aminoácidos livres, enzimas e é particularmente rico nos ácidos graxos linoléico e linolênico que são essenciais à saúde humana (6,7,12). Por apresentar uma alta concentração de açúcares redutores, aminoácidos essenciais e ácidos graxos insaturados/saturados, além da presença de zinco, cobre e ferro e alta proporção de potássio/sódio, é considerado por diversos autores um produto de alto valor nutricional, indicado para a dieta humana (20).

O pólen apícola tem atraído a atenção de pesquisadores devido à presença de substâncias bioativas e às perspectivas do seu emprego medicinal (2). Este produto apresenta atividade antibacteriana variável de acordo com a origem botânica (16,17,21) e considerável teor de compostos fenólicos (tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos) (21-25), que dentre outras propriedades biológicas, possuem ação antioxidante (3).

Pesquisas científicas visando avaliar a qualidade e composição do pólen apícola produzido e comercializado no Brasil e no mundo ainda são escassas e devem ser estimuladas de forma a sensibilizar os governos e a iniciativa privada para o desenvolvimento adequado da tecnologia de processamento. Tal medida evitaria perdas de toneladas de pólen anualmente disponíveis na vasta vegetação, aumentaria a oferta de um produto com expressivo valor nutritivo e funcional e geraria divisas para estados com alto potencial produtivo.

No presente artigo de revisão são apresentados os trabalhos que avaliaram os efeitos biológicos, a composição do pólen apícola em termos de macronutrientes, parâmetros de

qualidade, minerais, flavonóides e seu papel na alimentação humana, além da presença de contaminantes inorgânicos indicadores de poluição ambiental em amostras de pólen apícola produzidas no Brasil e em outros países.

EFEITOS BIOLÓGICOS DO PÓLEN APÍCOLA

A atividade antioxidante do pólen apícola e seus extratos têm sido extensivamente determinada em experimentos *in vitro* (3,24-31), sistemas *in vivo* (28,32,33), culturas de células (34) e animais de laboratório (35-40), com o emprego de variados métodos. A concentração de flavonóides (25,28,29), o conteúdo de polifenóis (30,41) e a origem botânica (30) parecem ser fatores determinantes da capacidade antioxidante do pólen apícola.

Verificou-se que os extratos de pólen atuam como seqüestradores de radicais livres (3,26) e, portanto, inibidores de peroxidação lipídica (40). Os autores associam a propriedade antioxidante com efeitos radioprotetores (36,37), detoxificantes (39,40) e anti-inflamatórios (34), além de ser importante no retardo do envelhecimento (38) e na prevenção de várias doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (26,27,33,34). Recentemente, observou-se também atividade anti-estrogênica em pólen apícola rico em *Cystus icanus* L. (33).

Há relatos do uso de pólen apícola para condicionamento de atletas e em tratamentos médicos alternativos (2). Entretanto, parte das alegações feitas sobre propriedades medicinais do pólen apícola ainda não foi fundamentada por estudos científicos. Na literatura científica podem ser encontrados estudos sobre os efeitos do pólen (floral ou apícola) para amenizar os sintomas de hiperplasia prostática benigna e prostatite crônica (42-44), melhorar a função hepática (45), proteger o fígado dos efeitos de irradiação por raios-X (46) e de algumas substâncias tóxicas (47-51), diminuir os níveis de lipídeos séricos em animais (52,53) e em humanos (54), além de

reduzir a formação da placa aterosclerótica induzida experimentalmente em coelhos (53). Alguns estudos realizados em animais apontam para efeitos benéficos de extratos de pólen sobre a bexiga e o sistema urinário (55-58).

A adição de pólen apícola de origem multifloral à dieta de ratos com anemia ferropriva melhorou a utilização digestiva de ferro, cálcio, fósforo e magnésio e produziu um efeito positivo no ganho de peso (59), levando os autores a indicarem o seu emprego como fortificante no tratamento de anemia nutricional ferropriva acompanhada de perda de peso. Através de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, Yamaguchi et al, 2006 (60) observaram efeitos anabólicos do extrato de pólen apícola monofloral de *Cistus ladaniferus* sobre tecidos ósseos femorais em ratos, sugerindo a possibilidade do seu emprego na prevenção da perda óssea com o aumento da idade. Recentemente, verificou-se num estudo *in vitro* efeito anti-angiogênico do pólen apícola (61), indicando a necessidade da investigação do seu potencial preventivo e terapêutico contra doenças humanas relacionadas com a angiogênese, tais como câncer e retinopatia diabética.

Por outro lado, há na literatura médica relatos de casos de intolerância ao pólen apícola (62,63) e de seus efeitos alergênicos (64-66). Embora a alergia ao pólen apícola seja considerada relativamente rara, pode representar risco à vida (64). Deste modo, é imprescindível a inclusão dos efeitos adversos potenciais na rotulagem do produto destinado ao consumo humano (2,64). Em contrapartida, o pólen apícola tem sido usado na medicina popular por séculos para aliviar reações alérgicas (67,68). Com o objetivo de investigar essa aplicação, estudos recentes observaram o efeito antialérgico do extrato fenólico de pólen apícola e do flavonóide miricetina em ratos sensibilizados com ovoalbumina (67) e revelaram o seu efeito inibitório sobre a degranulação de mastócitos *in vivo* (em ratos) e *in vitro* (68,69).

FATORES QUE INFLUEM NA COMPOSIÇÃO DO PÓLEN APÍCOLA

O estudo da composição do pólen apícola é complexo devido à diversidade de compostos presentes em concentrações que podem ser elevadas até traços. Sua composição química pode variar conforme a espécie vegetal visitada pelas abelhas (4,7,12,13,17,20,70), as condições climáticas, o solo (7), a idade e o estado nutricional da planta quando o pólen está se desenvolvendo (14), as localidades de produção, as estações do ano e entre diferentes anos (16,71). A composição também pode depender dos métodos de extração, processamento e de armazenamento (6,13,14,20). A liofilização reduz o conteúdo de vitamina C e provitamina A, enquanto que a secagem (40°C) reduz os teores de açúcares redutores, proteínas totais, vitamina C e provitamina A (20). Por outro lado, o armazenamento em freezer não causa alterações importantes na composição química do pólen apícola. Assim, alguns autores recomendam essa técnica para a preservação do pólen para fins nutricionais ou terapêuticos (20).

Estudando o pólen brasileiro produzido na região de Botucatu (SP), Funari e col. (72) observaram a variação da sua composição bromatológica (matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, fibra bruta e minerais) ao longo de quatro meses e verificaram que as amostras coletadas em outubro apresentaram as maiores concentrações de proteína bruta em relação aos outros meses. Semelhantemente, Marchini e col. (73) encontraram diferenças significativas nas médias mensais dos parâmetros estudados (proteínas, umidade, resíduo seco, lipídeos, açúcares totais, acidez titulável e pH) em amostras de pólen obtidas mensalmente de cinco colméias ao longo de um ano de produção na cidade de Piracicaba (SP), com exceção da porcentagem de cinzas que não apresentou variação significativa.

Oliveira et al. (74) observaram que a origem botânica e a estação da coleta influenciaram o conteúdo de três vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno) em 10 amostras de pólen fresco coletadas na cidade de Pindamonhangaba (estado de São Paulo) durante os meses de abril e outubro, considerado o melhor período para coleta de pólen apícola.

Modro et al. (75) avaliaram a influência da origem botânica sobre a composição (porcentagem de umidade, matéria seca orgânica e mineral, proteína bruta, extrato etéreo e carboidratos totais) do pólen apícola coletado em dois apiários de Minas Gerais. Os autores observaram que a composição nutricional do pólen apresentou correlação com a predominância de tipos polínicos específicos. Entretanto, essas associações diferiram nos dois apiários estudados, revelando o efeito da diversidade botânica sobre a composição do produto. De acordo com Schimdt & Buchmann (76), a coleta de pólen em várias espécies de plantas garante às abelhas a obtenção de uma dieta equilibrada e diluição da toxicidade de alcalóides e outras toxinas (Schimdt & Buchmann, 1993).

VALOR NUTRITIVO E QUALIDADE DO PÓLEN APÍCOLA

Até o momento, sete estudos avaliaram a composição bromatológica do pólen apícola nacional (Tabela 1). Destes, três focalizaram a variabilidade da sua composição em termos de macronutrientes (73,75) e em termos de minerais e macronutrientes (72), sob condições controladas de produção. Quatro avaliaram a composição bromatológica e a qualidade de amostras produzidas com fins comerciais e obtidas de apicultores (19,77-79). Na maior parte destes trabalhos foram analisadas amostras provenientes das regiões sudeste e sul do país. Apenas um estudo (78) pode ser considerado de abrangência nacional, mas ainda com número restrito de

amostras ($n = 42$). Neste foram analisadas dez amostras provenientes do estado da Bahia, duas do estado de Sergipe e duas do Distrito Federal. As demais amostras ($n = 28$) procediam das regiões sul e sudeste. O nordeste do Brasil, particularmente o estado da Bahia é um importante pólo produtivo de pólen, com alto potencial de crescimento devido ao clima favorável à produção durante todos os meses do ano (5).

TABELA 1

Composição centesimal do pólen apícola apresentada por alguns estudos do Brasil.

Procedência	Ano/Referência	Pólen	N	Umidade (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)
		Origem botânica, Processamento					
Botucatu, SP	2003/72	Multifloral/Fresco, recém coletado	24	24,1	26,2	5,1	2,6
Sul de MG e SP	2003/77	Multifloral/ Desidratado (método de rotina dos apicultores)	21	8,3	19,1	8,2	2,1
Sul de MG e SP	2003/77	Multifloral/Fresco	1	19,3	22,4	5,1	2,0
BA, MG, PR, RS, SC, SE, SP e DF	2005/78.	Multifloral/ Desidratado (método de rotina dos apicultores)	42	4,0	15,8	3,8	2,9
Região sul	2005/19	Multifloral/ Desidratado (método de rotina dos apicultores)	10	7,4	20,0	6,0	2,2
Piracicaba, SP	2006/73	Multifloral/Desidratado (secagem em estufa/sem descrição do método)	13	23,6	21,4	3,6	2,6
MG/apiário Universidade Federal de Viçosa	2007/75	Multifloral/ Desidratado (pré- secagem, 55°C, 72 h., estufa c/ circulação forçada de ar)	8	27,1	28,3	2,6	2,8
MG/apiário Mesmel	2007/75	Multifloral/ Desidratado (pré- secagem, 55°C, 72 h., estufa c/ circulação forçada de ar)	8	27,9	23,7	2,3	3,0
PA, SC, RS	2008/79	Multifloral/ Desidratado (método de rotina dos apicultores)	36	4,2	20,5	4,9	2,9

N: número de amostras analisadas.

Diversos autores avaliaram a composição química do pólen apícola de outros países (Tabela 2), dos quais os autores espanhóis ganham destaque (6,17,70,80), visto ser a Espanha um importante produtor de pólen para o mercado europeu.

TABELA 2

Composição centesimal do pólen apícola apresentada por alguns estudos internacionais.

Procedência	Ano/Referência	Pólen Origem botânica /Processamento	N	Umidade (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)
Estados Unidos	1978/14	Multifloral/Fresco	7	23,8	23,3	5,4	2,8
Austrália	1983/15	<i>Eucalyptus marginata</i> / Desidratado	1	3,2	20,6	0,8	2,2
Austrália	1983/15	<i>Eucalyptus calophylla</i> / Desidratado	1	5,1	27,9	1,0	2,3
Cuba	1992/1	Multifloral/ NI	1	10	22,0	17,5	3,1
Espanha	1997/6	Multifloral/ Desidratado	20	4,9	15,3	5,9	1,9
Espanha	2002/4	Multifloral comercial/ Desidratado	15	7,1	13,9	6,7	1,7
Argentina	2004/81	Multifloral comercial/ Desidratado	37	5,8	24,0	4,5	3,0
África do Sul	2006/82	<i>Aloe greatheadii</i> var. <i>davyana</i> /Fresco	6	18,8	25,5	4,5	2,9
Romenia	2006/83	Multifloral/NI	3	5,0 - 7,7	—	—	—

NI: não informado; N: número de amostras analisadas

Alguns países possuem parâmetros nacionais de qualidade para o pólen apícola destinado ao consumo humano, tais como Bulgária, Polônia e Suíça (20). Na América do Sul o Brasil e a Argentina apresentam tais limites. Algumas exigências da norma brasileira elaborada em 2001

pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (9) são apresentadas na Tabela 3, em comparação com a legislação argentina, elaborada em 1998 (84).

TABELA 3

Limites estabelecidos para pólen apícola desidratado quanto aos parâmetros umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, segundo as legislações brasileira e argentina.

Requisitos	Especificação	Especificação
	Brasileira (9)	Argentina (84)
Umidade	Máximo de 4%	Máximo de 8%
Proteínas	Mínimo de 8%; m/m (base seca)	Entre 15 e 28 % (base seca)
Lipídeos	Mínimo de 1,8%; m/m, (base seca)	-
Cinzas	Máximo de 4%; m/m, (base seca)	Máximo de 4%; m/m,(base seca)
Acidez	Máximo 300 mEq/kg; m/m	-

No pólen fresco os teores de umidade variam entre 17 e 28% (Tabela 1), enquanto que o produto desidratado apresenta teores inferiores, entre 4 e 8% (6), dependendo do processo de desidratação, do modo de conservação, da embalagem e da umidade atmosférica. O pólen apícola desidratado é altamente higroscópico. Seu conteúdo de umidade é de grande importância, pois têm influência em suas características sensoriais e microbiológicas. Entre os riscos de um material nutritivo com altos teores de atividade de água e armazenados à temperatura ambiente, está a contaminação por fungos potencialmente produtores de micotoxinas carcinogênicas (85-87). Por esta razão, o produto fresco deve submeter-se à dessecação para reduzir o seu teor de umidade. O processo de secagem do pólen requer habilidade e prática, exigindo muitas precauções durante a operação para não destruir os constituintes lábeis e para garantir a qualidade do produto final.

Bastos e col. (77) determinaram a composição e alguns parâmetros físico-químicos em amostras de pólen apícola comercializadas na região sul de Minas Gerais e no estado de São

Paulo. Os teores de umidade de todas as amostras encontravam-se acima do limite estabelecido pela legislação brasileira para pólen apícola desidratado (máximo de 4%) (9). Os valores de atividade de água situaram-se entre 0,3 e 0,6. Almeida Muradian e col. (19) também encontraram teores de umidade superiores ao estabelecido pela legislação brasileira em amostras de pólen apícola desidratado obtidas da região sul do Brasil. Os teores de lipídeos ($7 \pm 2\%$; m/m, na base seca) e proteínas ($21 \pm 4\%$; m/m, na base seca) obtidos foram elevados e estavam dentro da faixa estabelecida pela legislação (mínimo de 1,8% e 8%; m/m, na base seca, respectivamente). Barreto e col. (78) estudaram a composição físico-química (umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, açúcares totais e pH, acidez livre, fibra bruta e teor de prolina) e a qualidade (sujidades, análises bacteriológicas, de fungos e leveduras) do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Federal. Os autores destacaram a ampla faixa de variação nos teores de açúcares totais e teor de lipídeos, além da necessidade de controle permanente na cadeia de produção do pólen apícola para garantir a qualidade do produto final. Recentemente, Carpes (79) avaliou amostras procedentes do sul do Brasil e encontrou valores de umidade acima da especificação da legislação brasileira em 47% das amostras. Entretanto, a atividade de água média das amostras foi de $0,38 \pm 0,04$, o que é característico de um alimento desidratado com boa estabilidade de armazenagem.

Amostras de pólen coletadas na Espanha (n=20) apresentaram valores entre 1,6 e 2,2% de cinzas (6). Em 21 amostras brasileiras (7) o teor médio de cinzas variou de 1,5% a 4,8%, sendo que 3 amostras estavam acima da especificação brasileira (máximo 4% m/m na base seca) (9). A grande variação no conteúdo de cinzas em pólen pode ser devido à diversidade da flora apícola nas localidades de produção. Outra possibilidade é a poluição ambiental, que por vezes explica o alto conteúdo de cinzas encontrado em produtos apícolas (88). Procedimentos ineficientes de limpeza (81) e o acúmulo de minerais decorrente do tipo de solo, origem geográfica e botânica

(17) também estão entre os fatores que podem influenciar o conteúdo de cinzas do pólen apícola. A carência de dados a respeito da composição de pólen apícola coletado no Brasil impossibilita uma avaliação precisa se as amostras fogem aos limites impostos pela legislação brasileira por que a mesma é baseada em resultados de pólen produzidos em outros países ou se, o alto teor de cinzas deve-se a outros fatores (77).

O pólen apresenta um conteúdo expressivo de proteínas (geralmente superior a 15%), sendo este o segundo grupo mais abundante, após o grupo dos carboidratos. Entretanto ainda não são conclusivas as informações sobre o aproveitamento dessas proteínas para seres humanos e animais monogástricos. Com base no valor biológico protéico, taxas de eficiência protéica ajustada (PER), utilização protéica líquida aparente (NPU) e digestibilidade aparente comparada com a caseína em ratos, alguns autores questionam a digestibilidade protéica do pólen apícola (15) que seria dificultada pela estrutura protetora da sua parede celular. Para elucidar melhor essa questão seria recomendável a determinação da digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAAS) (89), mais indicada para avaliação de proteínas de origem vegetal.

A presença de lipídeos, juntamente com açúcares contribui para aumentar o suprimento de energia do pólen apícola. O conteúdo de lipídeos pode ser bastante variável (entre 1 e 20%), dependendo das espécies florais visitadas (4). Alguns autores exploraram o perfil de ácidos graxos do pólen apícola, tendo constatado sua riqueza em ácidos graxos essenciais (EFA) e uma relação de ácidos graxos insaturados (UFA)/ácidos graxos saturados (SFA) de 1,96 em pólen espanhol (6,7,17). Szczesna (7) encontrou predominância de ácido α -linolénico (43%), ácido palmítico (28%) e ácido linoléico (14%) e a relação UFA/SFA entre 1,21 e 2,35, em amostras polonesas, sul coreanas e chinesas. Por esta razão, considera-se atrativa a possibilidade do uso de pólen apícola como fonte de EFA, na forma de suplemento alimentar ou adicionado a alimentos processados para melhorar a sua qualidade nutritiva. Bastos e col. (12), no entanto, encontraram

predominância de ácido linoléico (27%), apenas traços de ácido linolênico e a relação UFA/SFA de somente 0,4 em amostras brasileiras.

Os carboidratos totais (incluindo açúcares, amido e fibra dietética) correspondem à maior fração do pólen apícola (cerca de 70%), sendo os açúcares redutores frutose e glicose seus principais constituintes (4,13). Sacarose está presente em menores proporções, seguida por dissacarídeos maltose, isomaltose, trealose e os trissacarídeos melezitose, erlose e rafinose (6). Grande parte dos carboidratos do pólen apícola é proveniente do néctar ou do mel com o qual o pólen floral é misturado pela manipulação das abelhas para formar o fluido que agrega as bolotas de pólen (82). Os açúcares frutose, glicose e sacarose constituem cerca de 90% do total de açúcares de baixo peso molecular (17). Geralmente os níveis de frutose superam os teores de glicose, resultando em índices frutose/glicose (F/G) superiores a 1,0 (6,90,91), típicos de alimentos com moderado a baixo índice glicêmico (92).

Orzáez Villanueva e col. (4) compararam o percentual calórico fornecido por proteínas, lipídeos e carboidratos em 15 amostras de pólen apícola espanhol com as recomendações dietéticas estabelecidas (10-12% do total de calorias deve ser proveniente de proteínas, 30% de gorduras e 60% de carboidratos). Os autores mostraram que o pólen apícola está próximo destas recomendações, embora o percentual de gorduras seja menor (16%) e os percentuais de proteínas e carboidratos sejam maiores (15% e 69%, respectivamente).

Serra Bonvehí & Escolà Jordà (6) determinaram teores de fibras em 20 amostras de pólen apícola espanhol, tendo encontrado valores de fibra dietética entre 10,6 e 15,9%. A maior parte desta fração era constituída por fibra insolúvel (9,0 a 13,1%) e a menor parte por fibra solúvel (1,6 a 3,7%). A presença de fibra dietética no pólen agrega valor nutricional ao produto, especialmente quando se considera a tendência atual de uma dieta rica em alimentos processados, prontamente disponíveis e com alta densidade energética.

Uma grande variedade de elementos minerais foi encontrada em amostras de pólen apícola: potássio, fósforo, magnésio, cálcio, sódio, enxofre, ferro, cobre, manganês, zinco, boro e selênio (6,25,72,81,93,94). Destes estudos, dois (25,72) avaliaram amostras de pólen apícola nacional.

Potássio, fósforo, cálcio e magnésio são os elementos minerais predominantes em pólen apícola, conforme indicado na Tabela 4, enquanto sódio, ferro, manganês, zinco e cobre são encontrados em menores proporções (Tabela 5). A composição mineral do pólen apícola está relacionada com a origem floral, mas também com as condições de crescimento da planta (como composição do solo e origem geográfica) (6). Do ponto de vista nutricional, chamam a atenção: a presença de teores expressivos de cobre e zinco, ambos considerados nutrientes antioxidantes, bem como de ferro, mineral limitante na alimentação humana, além da elevada razão potássio/sódio que torna o produto interessante para dietas com balanço eletrolítico definido.

TABELA 4

Conteúdo de elementos minerais predominantes em pólen apícola.

Elemento Mineral	Faixa (mg kg ⁻¹)	Origem da amostra de pólen	N	Ano/Referência
Potássio	5900-7200	Brasil (SP)	24	2003/72
	3722-6364	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	2485 – 6411	Espanha	20	1997/6
	2200 – 3800	Australia	50	2002/93
	2263-9784	Argentina	37	2004/83
	2843 – 4854	Polônia	13	2007/94
	3455 – 5489	Coréia do Sul	9	2007/94
	4247 – 5976	China	5	2007/94
Fósforo	3900-5000	Brasil (SP)	24	2003/72
	5648-8865	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	1400 – 8000	Australia	50	2002/93
Cálcio	1500-3000	Brasil (SP)	24	2003/72
	292-2149	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	253 – 850	Espanha	20	1997/6
	360 – 3100	Australia	50	2002/93
	160-2490	Argentina	37	2004/83
	542 – 1080	Polônia	13	2007/94
	105 – 694	Coréia do Sul	9	2007/94
	181 – 974	China	5	2007/94
Magnésio	600-1000	Brasil (SP)	24	2003/72
	463-1235	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	273 – 816	Espanha	20	1997/6
	220 – 2700	Australia	50	2002/93
	401-2210	Argentina	37	2004/83
	742 – 1723	Polônia	13	2007/94
	987 – 1762	Coréia do Sul	9	2007/94
	1126 – 1893	China	5	2007/94

N= número de amostras analisadas; Estados brasileiros: Paraná (PR), Rio Grande do Sul

(RS) Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP).

TABELA 5

Conteúdo de elementos minerais (componentes menores) em pólen apícola.

Elemento	Faixa	Origem da amostra	N	Ano/Referência
mineral	(mg kg ⁻¹)	de pólen		
Sódio	12-636	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	614 – 2375	Espanha	20	1997/6
	16 – 480	Australia	50	2002/93
	46-554	Argentina	37	2004/83
	293 – 2191	Polônia	13	2007/94
	454 – 1113	Coréia do Sul	9	2007/94
	1072 – 2447	China	5	2007/94
Ferro	90,7-145,0	Brasil (SP)	24	2003/72
	27,9-203,3	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	11,1 – 80,3	Espanha	20	1997/6
	14 – 520	Australia	50	2002/93
	23-229	Argentina	37	2004/83
	40,4 – 136,1	Polônia	13	2007/94
	74,3 – 365,9	Coréia do Sul	9	2007/94
Manganês	59,0 – 182,3	China	5	2007/94
	19,0-54,8	Brasil (SP)	24	2003/72
	18,7-129,4	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	5 – 110	Australia	50	2002/93
	14-57	Argentina	37	2004/83
	13,3 – 59,7	Polônia	13	2007/94
	25,6 – 99,4	Coréia do Sul	9	2007/94
Zinco	13,2 – 429,8	China	5	2007/94
	48,0-118,0	Brasil (SP)	24	2003/72
	36,1-82,1	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	19 – 81	Espanha	20	1997/6
	16 – 340	Australia	50	2002/93
	23-106	Argentina	37	2004/83
	25,6 – 53,6	Polônia	13	2007/94
Cobre	23,7 – 60,7	Coréia do Sul	9	2007/94
	23,9 – 38,3	China	5	2007/94
	10,0-18,0	Brasil (SP)	24	2003/72
	4,5-17,8	Brasil (PR, SC, RS)	36	2008/25
	4 – 16	Espanha	20	1997/6
	3 – 42	Australia	50	2002/93
	6,0-20,0	Argentina	37	2004/83
	5,6 – 23,9	Polônia	13	2007/94
	5,3 – 14,7	Coréia do Sul	9	2007/94
	3,2 – 10,0	China	5	2007/94

N= número de amostras analisadas; Estados brasileiros: Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS)

Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP).

FLAVONÓIDES EM PÓLEN APÍCOLA

Os flavonóides presentes em pólen apícola ocorrem como glicosídeos ou na forma livre e são em geral altamente hidroxilados, tal como o kaempferol (95). Estes compostos são reconhecidos como marcadores taxonômicos (96,97). Devido ao perfil de flavonóides semelhante ao encontrado no mel, a análise polínica tem sido o método mais usado para identificar a origem botânica do mel (96-98). Assim, diversos estudos relacionam o conteúdo e tipo de flavonóides do pólen com a sua origem floral (96-99,100,101).

No trabalho de Campos e col. (102), o conteúdo de flavonóides alcançou 0,5% no pólen apícola. Através de análise espectrofotométrica Serra Bonvehí e col. (22) verificaram que os polifenóis totais (não taninos) constituíam mais de 0,85% e os flavonóides eram mais de 0,35% da sua composição, com predominância de glicosídeos de flavonóis. Oitenta e dois por cento das amostras continha no mínimo 14 componentes fenólicos, primariamente rutina, miricetina e ácidos cinâmicos.

Trinta e oito flavonóides, incluindo sete agliconas (isoramnetina, kanferol, luteolina, miricetina, quercetina, selagina e tricetina) (Tabela 6) e trinta e um glicosídeos (Tabela 7) já foram identificados no pólen apícola proveniente do Brasil, China, Espanha, França, Nova Zelândia e Portugal (Tabela 6) (22,97,99,100,101,103-106).

TABELA 6

Flavonóides agliconas identificados em pólen apícola.

Nome comum da aglicona	Origem das amostras de pólen	Referência
Isoramnetina	Brasil/Espanha/Portugal	22,97,103,105
Kanferol	China/Espanha	22,103,106
Luteolina	Brasil/Portugal	97,105
Miricetina	Brasil/Espanha/Nova Zelândia/Portugal	22,97,103,105
Quercetina	Brasil/ Espanha	22,103,105
Selagina	Brasil	105
Tricetina	Brasil/Portugal	97,105

Nos primeiros estudos os compostos foram geralmente extraídos com metanol, isolados e purificados por técnicas cromatográficas (p.ex.: cromatografia em camada delgada, cromatografia dimensional em papel, cromatografia de coluna aberta, CLAE semi-preparativa) e identificados por métodos clássicos de espectrofotometria de UV ou por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), com ou sem hidrólise prévia. A identificação também foi feita por comparações com padrões e por reações químicas específicas (97,99,100-103).

Mais recentemente, Serra Bonvehí et al. (22) identificaram e quantificaram agliconas livres presentes em amostras de pólen apícola espanhol por HPLC/DAD. Freire et al. (105) identificaram os flavonóides por CLAE/DAD. Um pico desconhecido foi isolado por cromatografia de coluna e identificado por RMN. No trabalho de Arráez-Román et al., (104) flavonóides de pólen floral foram isolados e identificados por eletroforese capilar acoplada à

espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* e no trabalho de Guo et al, 2009 (106) os compostos foram isolados e identificados por CLAE/DAD.

Três trabalhos foram realizados sobre os flavonóides presentes em amostras de pólen apícola brasileiro (21,25,105). Freire et al. (105) avaliaram a correlação do perfil cromatográfico de flavonóides com a origem polínica de amostras do nordeste brasileiro. Em dois estudos Carpes et al. determinaram os teores totais de compostos fenólicos e de flavonóides, além do potencial antioxidante em amostras produzidas nos estados de Alagoas e Paraná (21) e na região sul (25).

TABELA 7

Flavonóides glicosídeos identificados em pólen apícola.

Nome comum do glicosídeo	Origem das amostras de pólen	Referência
7- <i>O</i> -metilherbacetina 3-diglicosídeo	Nova Zelândia/Portugal	97
8- <i>O</i> -metilherbacetina 3-diglicosídeo	Nova Zelândia/Portugal	97
8- <i>O</i> -metilherbacetina glicosídeo	Nova Zelândia	97
8- <i>O</i> -metilherbacetina 8- <i>O</i> -glicosídeo	Nova Zelândia	100
7- <i>O</i> -metilherbacetina 3- <i>O</i> -soforosídeo	Espanha/Nova Zelândia/Portugal	97,100
8- <i>O</i> -metilherbacetina 3- <i>O</i> -soforosídeo	Nova Zelândia	97,100
7- <i>O</i> -metilherbacetina 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> - <i>E</i> -feruloil- β -D-glicosídeo]	Nova Zelândia	101
Isoramnetina 3-glicosídeo	Espanha	103
Isoramnetina 3- <i>O</i> -neohesperosídeo	Brasil	105
Isoramnetina 3-soforosídeo-diglicosídeo	Nova Zelândia	97
Isoramnetina 3-xilosilglicosídeo	Espanha	103
Kanferol 3-diglicosídeo	China	106
Kanferol 3,4-diglicosídeo	China	106
Kanferol 3-glicosídeo	Espanha	103
Kanferol 3-rutinosídeo	Espanha	103
Kanferol 3-neohesperidosídeo	França/Portugal	97,99
7- <i>O</i> - metilkanferol 3-neohesperidosídeo	Nova Zelândia	97
8-metoxikanferol	França	99
8-metoxikanferol 3-neohesperidosídeo	França	99
8-metoxikanferol 3-glicosídeo	França	99
Kanferol 3-soforosídeo	Nova Zelândia/Portugal	97
Miricetina 3-galactosídeo	Portugal	97
Miricetina 3-glicosídeo	Espanha	103
Miricetina 3-rutinosídeo	Espanha	103
Quercetina 3-galactosídeo 7-ramnosídeo	Espanha	103
Quercetina 3-diglicosídeo	China/Nova Zelândia/ Portugal	96,106
Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo (isoquercetina)	Brasil	105
Quercetina 3-ramnosídeo	Portugal	97
Quercetina 3-soforosídeo	Espanha/Portugal	97,103
Quercetina 3- <i>O</i> -ramnoglicosídeo (rutina)	Espanha	22,103
Quercetina 3-ramnosilgalactosídeo	Espanha	103

PÓLEN APÍCOLA NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

Por suas características nutritivas e bioativas o pólen apícola tem sido consumido em muitas partes do mundo. O produto é apontado por alguns autores como suplemento alimentar (2,7,12,29,72,77,90), como complemento alimentar (4,73,77), como alimento funcional (21) ou ainda como suplemento alimentar funcional (3).

Nos Estados Unidos o pólen apícola é definido como suplemento alimentar pelo Ato sobre Suplementos Dietéticos, Saúde e Educação de 1994 (3). A legislação brasileira carece de uma definição clara quanto a este produto ser considerado alimento, suplemento ou complemento alimentar. O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Pólen Apícola destinado ao comércio nacional ou internacional foi estabelecido em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (9). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também faz menção ao pólen apícola. Na Portaria nº 741 de setembro de 1998 (107) fica estabelecido que o pólen com ou sem própolis deve ser considerado alimento natural, apresentando rotulagem conforme as normas legais dos alimentos embalados. Já a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos da ANVISA faz a seguinte recomendação aprovada pela Diretoria de Alimentos e Toxicologia: “os produtos a base de pólen, com ou sem própolis, inclusive a associação do pólen com nutrientes ou não nutrientes não são considerados alimentos” (108).

Conforme o próprio nome já diz, os complementos nutricionais são produtos indicados para complementar a dieta cotidiana de indivíduos saudáveis que desejem compensar um eventual déficit de nutrientes e alcançar os valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) (109). O órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) que regulamenta o uso de alimentos e

medicamentos define suplemento nutricional como um produto ingerido oralmente que contém um ingrediente dietético com o objetivo de suplementar a dieta. Assim, os suplementos nutricionais são empregados para corrigir deficiências nutricionais e garantir que a ingestão de certos nutrientes atinja os níveis recomendados na alimentação de indivíduos com dieta reconhecidamente deficiente em macro ou micronutrientes. Nesse contexto, seria recomendável um posicionamento na legislação brasileira quanto à classificação do pólen apícola como alimento, suplemento ou complemento nutricional. O pólen apícola também não consta na tabela de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional da legislação brasileira (110), o que dificulta a elaboração das informações nutricionais do produto, uma vez que não há porção estabelecida para o produto. Lengler (11) sugere uma porção de 25 g para o pólen apícola, que corresponde a três colheres de sopa. Seria necessário definir a porção sugerida sob a forma de medida caseira e em gramas do produto, para fins de rotulagem nutricional.

PÓLEN APÍCOLA COMO BIOINDICADOR DE POLUIÇÃO AMBIENTAL

O desenvolvimento industrial e o uso de derivados de petróleo têm proporcionado aumento nos níveis de poluição do ar tanto nas áreas urbanas quanto nas industriais. Este fato gerou um maior interesse por técnicas baseadas em bioindicadores para a detecção e avaliação de contaminação ambiental nos últimos anos (111). A área de atividade das abelhas geralmente se estende sobre uma superfície de aproximadamente 7 quilômetros e devido a isto, muitos autores apontam para os produtos apícolas (mel, pólen, própolis e cera) como bioindicadores de poluição química (112-118).

Alumínio, arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo estão entre os contaminantes inorgânicos que podem estar presentes no meio ambiente. A contaminação por metais no ambiente (como nos

solos, cursos d'água e alimentos produzidos próximos a áreas contaminadas) pode colocar em risco a saúde humana (119). Os contaminantes inorgânicos em sua maioria não têm efeitos benéficos ao homem e seus mecanismos de ação biológica ainda não são totalmente conhecidos (120). A toxicidade destes elementos ao organismo humano é função da sua concentração e da forma química, sendo que a exposição crônica em pequenas doses através da dieta pode causar efeitos adversos (113).

Num estudo japonês (121) observou-se que o pólen de flores proveniente de um centro urbano sofre maior adsorção de matéria particulada e concentração de vários elementos em sua superfície (cálcio, silício, ferro, alumínio, cloro, enxofre, potássio e sódio) quando comparado com amostras provenientes de um local rural. Num estudo controlado de simulação de contaminação ambiental, Kalbande e col. (111) mostraram que amostras de pólen floral expostas ao ar poluído contendo metais (arsênio, chumbo, níquel, cádmio, ferro, alumínio, cálcio e cobre) apresentaram maiores concentrações de alumínio, cálcio e ferro do que amostras de pólen que não foram expostas a esses contaminantes.

O número de trabalhos que investigaram a presença de contaminantes inorgânicos em amostras de pólen apícola é pequeno (117). Estes, em sua maioria avaliaram número limitado de amostras (Tabela 7). Dois estudos avaliaram amostras sul-americanas (118,122). No estudo de Santos (122) observou-se a presença de alumínio em amostras de pólen apícola coletadas das regiões sul, sudeste, centro-oeste, norte e nordeste do Brasil. Chumbo foi encontrado nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. No trabalho de Saavedra e col. (118) foi determinada a concentração de chumbo em pólen apícola fresco coletado na Venezuela. Em três estudos europeus chumbo e cádmio foram determinados em amostras do Reino Unido e Espanha (123), níquel e chumbo foram determinados em amostras coletadas na Eslovênia (124) e chumbo, cádmio e cromo foram determinados em amostras de pólen apícola coletadas em cinco áreas localizadas próximas a

região metropolitana de Roma, Itália, tendo sido apontados como indicadores de contaminação ambiental (114).

TABELA 8

Teores de contaminantes inorgânicos em pólen apícola.

Contaminante Inorgânico	Técnica analítica	Resultado* (mg kg ⁻¹)	Origem da amostra de pólen	N	Ano/Referência
Alumínio	AAS	0,06 – 310,15	Brasil	69	2005/122
Níquel	XRF	2,5±0,5	Eslovênia	3	1996/1124
	TXRF	3,1±2,3	Eslovênia	3	1996/1124
Cádmio	ICP-MS	<0,07 – 0,13	Reino Unido	4	1995/123
	ICP MS	0,07 – 0,1	Espanha	1	1995/123
	AAS	< 0,015 – 0,090	Itália	30	2001/114
Chumbo	AAS	0,05 – 5,69	Brasil	69	2005/122
	ICP MS	0,3 - 1,5	Reino Unido	4	1995/123
	ICP MS	0,1 - 0,14	Espanha	1	1995/123
	XRF	4,7±0,9	Eslovênia	3	1996/1124
	TXRF	3,5±2,3	Eslovênia	3	1996/1124
	AAS	< 0,02 – 0,329	Itália	30	2001/114
	AAS EA	0,2683 ± 0,0008**	Venezuela	1	2007/118
Crômio	AAS	< 0,030 – 0,112	Itália	30	2001/114
Mercurio	AAS	0,0001 - 0,019	Brasil	69	2005/122

*Faixa ou valor médio ± desvio padrão; ** Pólen apícola fresco; AAS: espectrometria de absorção atômica; AAS EA: espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; ICP-MS: espectrometria de massas em plasma com acoplamento indutivo; XRF: espectrometria de fluorescência por Raio-X; TXRF: espectrometria de fluorescência por Raio-X com reflexão total; N: número de amostras analisadas.

Considerando a possibilidade de o pólen ser veículo de contaminantes inorgânicos, é recomendável que os apiários responsáveis pela produção do pólen apícola destinado ao consumo

humano não sejam localizados em áreas densamente industrializadas, próximos a rodovias de tráfego intenso ou de grandes aglomerações urbanas (94).

A presença de contaminantes inorgânicos no pólen apícola pode levar a impactos negativos na comercialização no mercado nacional, limitando também, as possibilidades de exportação devido aos exigentes padrões de qualidade sanitária impostos pelos países importadores (111). Desta forma, há necessidade de estabelecer na legislação brasileira limites de tolerância quanto à presença destes elementos em pólen apícola. O monitoramento da presença de contaminantes inorgânicos no pólen apícola poderia também ser útil para prevenir e controlar a poluição ambiental, além de verificar se o produto é adequado para o consumo humano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A indicação do pólen apícola como complemento ou suplemento alimentar destinado ao consumo humano enfrenta uma situação paradoxal. O produto apresenta composição química com adequado balanço em termos de macronutrientes, atraente perfil de minerais, açúcares e ácidos graxos, além de expressivos teores de flavonóides. Em contrapartida, pode ser veículo de poluentes. Essas observações devem nortear várias condutas: (1) são necessários estudos sobre a composição e qualidade do pólen apícola produzido no território brasileiro para conhecer melhor as perspectivas do seu uso na alimentação humana; (2) seria recomendável definir na legislação brasileira se o pólen apícola deve ser considerado alimento, suplemento ou complemento alimentar; (3) caso o pólen apícola seja considerado alimento, deve ser estabelecida a sua porção sob a forma de medida caseira e em gramas; (4) visto ser o pólen apícola considerado um bioindicador de poluição ambiental, faz-se necessário o estabelecimento de limites de tolerância para contaminantes inorgânicos na legislação brasileira; (5) estudos devem ser realizados para

identificar os locais sujeitos à exposição do pólen apícola a contaminantes inorgânicos para: monitoramento regular de poluição ambiental e verificação da segurança e da qualidade do produto visando consumo humano e (6) devem ser identificados os locais mais apropriados para a produção de pólen apícola destinado ao consumo humano (com menores chances de contaminação, clima apropriado e flora compatível com a obtenção de um produto de alto valor nutritivo) a fim de incentivar a produção regularmente monitorada em tais locais.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, FAPESP e UNASP pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

1. Abreu M. El pólen como alimento em la nutrición humana. Alimentaria. 1992; 235:45-46.
2. Linskens HF, Jorde W. Pollen as food and medicine – a review. Econ Bot. 1997;51:78- 87.
3. Kroyer G, Hegedus N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Inn Food Sci Emerg Technol. 2001;2:171-174.
4. Orzáez Villanueva MT, Díaz Marquina A, Bravo Serrano R, Blazquez Abellán G. The importance of bee collected pollen in the diet: a study of its composition. Int J Food Sci Nut. 2002;53:217-224.
5. Barreto LMRC, Funari SRC, Orsi RO. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. Punta del Este: I Congreso de Apicultura del Mercosur. 2005. [cited 2009 Dec 13].

Available from: <http://www.culturaapicola.com.ar>

6. Serra Bonvehí J, Escolà Jordà R. Nutrient composition and microbiological quality of honey-bee-collected pollen in Spain. *J Agric Food Chem.* 1997;45:725-732.
7. Szczena T. Long-chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *J Apic Sci.* 2006;50(2):65-79.
8. APACAME. Associação Paulista dos Criadores de Abelhas Melíferas. Produtos das abelhas: pólen, São Paulo: APACAME. 2004. [cited 2009 Dec 13] Available from: <http://www.apacame.org.br/index1.htm>
9. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola, Diário Oficial da União, Brasília, DF. 23 jan. 2001, Seção 1, p.18-23 [cited 2009 Dec 13]. Available from: <http://www.agricultura.gov.br>
10. Reinhard KJ, Hamilton DL, Hevly RH. Use of pollen concentration in palaeopharmacology: coprolite evidence in medical plants. *J Ethnobiol.* 1991;11:117-132.
11. Lengler S. Pólen apícola. 2nd ed. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria. 1999 [cited 2009 Dec 13] Available from: http://www.brasilapicola.com.br/files/apostila_polen_apicola.pdf.
12. Bastos DM, Barth MO, Rocha CI, Cunha IBS, Carvalho PO, Torres ES, Michelin M. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) loads in the state of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *J Apic Res.* 2004;43(2):35-39.
13. Stanley RG, Linskens HF. Pollen. *Biology Biochemistry Management.* Berlin,

Heidelberg and New York: Springer-Verlag; 1974.

14. Herbert Jr EW, Shimanuki H. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. *Apidologie*. 1978; 9:33-40.
15. Bell RR, Thornber EJ, Seet JLL, Groves MT, Ho NP, Bell DT. Composition and protein quality of honeybee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. *J Nutr*. 1983;113:2479-2484.
16. Loper GM, Standifer LN, Thompson MJ, Gilliam M. Biochemistry and microbiology of bee collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. I Fatty acids, vitamins and minerals. *Apidologie*. 1980;11(1):63-73.
17. Serra Bonvehí J, Gonell Galindo J, Gomez Pajuelo, A. Estudio de la composición y características físico-químicas del polen de abejas. *Alimentaria*. 1986;176:63-67.
18. Bogdanov S. Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*. 2004;38:334-341.
19. Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J Food Comp Anal*. 2005;18:105-111.
20. Campos MGR, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferreira F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apic Res*. 2008;47:154-161.
21. Carpes ST, Begnini R, Alencar SM, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Cienc Agrotec*. 2007;31(6):1818-1825.
22. Serra Bonvehí J, Soliva Torrentó M, Centeles Lorente E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J Agric*

- Food Chem. 2001;49:1848-1853.
23. Campos MG, Werby RF, Markham KR, Mitchell KA, Cunha AP. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. J Agric Food Chem. 2003;51:742-745.
 24. Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, Klepacz-Baniak J, Czekonska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food Chem. 2007;100:237.
 25. Carpes ST, Prado A, Moreno IAM, Mourão GB, Alencar SM, Masson ML. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. Quím Nova. 2008;31(7):1660-1664.
 26. Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autooxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. Nutr Res. 2002;22:519-526.
 27. Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Myoda T, Nagashima T. Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen *Cistus ladaniferus*. Int J Mol Med. 2005;15:259-263.
 28. Almaraz-Abarca N, Campos MG, Ávila-Reyes JA, Naranjo-Jiménez N, Herrera-Corral JH, González-Valdez LS. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). J Food Comp Anal. 2007;20:119-124.
 29. LeBlanc BW, Davis OK, Boue S, DeLucca A, Deeby T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. Food Chem. 2009;115:1299-1305.
 30. Marghitas LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobis O, Popescu O, Bogdanov S et al. In

- vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chem. 2009;115:878-883.
31. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. BMC Complement Alternat Med. 2009;9:1-9.
 32. Izuta H, Narahara Y, Shimazawa M, Mishima S, Kondo S, Hara H. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. Biol Pharm Bull. 2009;32:1947-1951.
 33. Saric A, Balog T, Sobocanec S, Kusic B, Sverko V, Rusak G et al. Antioxidant effects of flavonoids from Croatian *Cystus incannus* L. rich bee pollen. Food Chem Toxicol. 2009;47:547-554.
 34. Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y et al. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory Bursa for K-562 cell lines. Int Immunopharmacol. 2005;5:1652-1657.
 35. Dudov IA, Starodub NF. Antioxidant system of rat erythrocytes under conditions of prolonged intake of honeybee flower pollen load. Ukr Biokhim Zh. 1994;66:94-96.
 36. Anan'eva TV, Dvoretiskii AI. Effect of beta-carotene oil and bee pollen on ion transpor in rat brain slices following radiation-chemical exposure. Radiats Biol Radioecol. 1999;39:341-344.
 37. El-Missiry MA. Bee-pollen as antioxidant for the control of radiation-induced oxidative stress in male rats. J Egypt Ger Soc Zool. 1999;29(A):121-132.
 38. Uzbekova DG, Makarova VG, Khvoynitskaya LG, Slepnev AA. Evaluation of bee-collected pollen influence on lipid peroxidation, antioxidant system and liver function

- in old animals. Abstract. J Hepatol. 2003;38(suppl. 2):203.
39. Eraslan G, Kanbur M, Silici S, Liman BC, Altinorduli S, Sarica ZS. Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. *Ecotoxicol Environ Safety*. 2009;72:931-937.
 40. Eraslan G, Kanbur M, Silici S. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:86-91.
 41. Almaraz-Abarca N, Campos MG, Ávila-Reyes JA, Naranjo-Jiménez N, Herrera-Corral J, González-Valdez LS. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen from different botanical origin. *Intersciencia*. 2004;10:574-578.
 42. Buck AC, Rees RWM, Ebeling L. Treatment of chronic prostatitis and prostaticodynia with pollen extract. *Br J Urol*. 1989;64:496-499.
 43. Buck AC, Rees RWM, Ebeling L. Treatment of outflow tract obstruction due to benign prostatic hyperplasia with the pollen extract, cernilton. A double-blind, placebo-controlled study. *Br J Urol*. 1990;66:398-404.
 44. Wagenlehner FME, Schneider H, Ludwig M, Schnitker J, Brähler E, Weidner W. A pollen extract (Cernilton) in patients with inflammatory chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome: a multicentre randomised, prospective, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Eur Urol*. 2009;56:544-551.
 45. Uzbekova D, Makarova VG, Chugunova LG, Chernobavskaya NA, Mirgorodskaya LN. Bee-collected pollen and lactulose in treatment of chronic hepatitis B in children [abstract]. *J Hepatol*. 2001;34(Suppl 1):194.
 46. Bevzo VV, Grygor'eva NP Effect of bee pollen extract on glutathione system in mice liver under X-ray irradiation. *Ukr Biokhim Zh*. 1997;69:115-117.

47. Wójcicki J, Samochowiec L. Effect of cernilton on the hepatotoxicity of carbon tetrachloride [CCl₄] in rats. *Herba Polon.* 1984;30:207-212.
48. Wójcicki J, Samochowiec L, Hinek A. The effect of cernitins on galactosamine-induced hepatic injury in rat. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1985;33:361-370.
49. Ceglecka M. Effect of pollen extract (cernitin) on the course of poisoning with organic solvents (biochemical analysis). *Ann Acad Med Stetin.* 1992;38:79-95.
50. Mysliwiec Z. Effect of pollen extracts (cernitin preparation) on selected biochemical parameters of liver in the course of chronic ammonium fluoride poisoning in rats. *Ann Acad Med Stetin.* 1993;39:71-85.
51. Juzwiak S. Experimental evaluation of the effect of pollen extract on the course of paracetamol poisoning. 1993;39:57-69.
52. Wójcicki J, Samochowiec L. Further studies on cernitins: screening of the hypolipidemic activity in rats. *Herba Polon.* 1984;30:115-121.
53. Wójcicki J, Samochowiec L, Bartłomowicz B, Hinek A, Jaworska M, Gawronska-Szklarz B. Effect of pollen extract on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 1986;62:39-45.
54. Wójcicki J, Kósmider L, Samochowiec L, Woyke M. Clinical evaluation of cernilton as lipid-lowering agent. *Herba Polon.* 1983;29:213-216.
55. Kimura M, Kimura I, Nakase K, Sonobe T, Mori N. Micturion activity of pollen extract: contractile effects on bladder and inhibitory effects on uretral smooth muscle of mouse and pig. *Planta Med.* 1986;52:148-151.
56. Nakase K, Takenaga k, Hamanaka T, Kimura M. Inhibitory effect and synergism of cernitin pollen extract on the urethral smooth muscle and diaphragm of the rat.

- Nippon Yakurigaku Zasshi. 1988;91:385-392.
57. Nakase K, Kimura I, Kimura M. Effects of pollen-extract components, diamines and derivatives of feruloylputrescine on isolated bladder and urethral smooth muscle of mice. *Jpn J Pharmacol.* 1990;53:157-164.
 58. Onodera S, Yoshinaga M, Takenaga K, Toyoshima A, Uchiyama T. Effects of cernitin pollen extract (CN-009) on the isolated bladder smooth muscles and the intravesical pressure. 1991;97:267-276.
 59. Haro A, López-Aliaga I, Lisbona F, Barrionuevo M, Alférez MJM, Campos MS. Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *J Agric Food Chem.* 2000;48:5715-5722.
 60. Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral-diaphyseal and –metaphyseal tissues of rats *in vitro* and *in vivo*. *J Health Sci.* 2006;52:43-49.
 61. Izuta H, Shimazawa M, Tsuruma K, Araki Y, Mishima S, Hara H. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 2009;9:45.
 62. Lin FL, Vaughan TR, Vanderwalker ML, Weber RW. Hypereosinophilia, neurologic, and gastrointestinal symptoms after bee-pollen ingestion. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;83:793-796.
 63. Puente S, Iñiguez A, Subirats M, Alonso MJ, Polo F, Moneo I. Eosinophilic gastroenteritis caused by bee pollen sensitization. *Med Clin (Barc).* 1997;108:698-

700.

64. Geyman JP. Anaphylactic reaction after ingestion of bee pollen. J Am Board Fam Pract. 1994;7:250-252.
65. Greenberger PA, Flais MJ. Bee pollen-induced anaphylactic reaction in an unknowingly sensitized subject. Ann Allergy Asthma Immunol. 2001;86:239-242.
66. Pitsios C, Chliva C, Mikos N, Kompoti E, Nowak-Wegrzyn A, Kontou-Fill K. Bee pollen sensitivity in airborne pollen allergic individuals. Ann Allergy Asthma Immunol. 2006;97:703-706.
67. Medeiros KC, Figueiredo CA, Figueiredo TB, Freire KR, Santos FA, Alcantara-Neves NM, Silva TM, Piuevezam MR. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. J Ethnopharmacol. 2008;119:41-46.
68. Ishikawa Y, Tokura T, Nakano N, Hara M, Niyonsaba F, Ushio H, Yamamoto T, Okumura K, Ogawa H. Inhibitory effect of honeybee-collected pollen on mast cell degranulation *in vivo* and *in vitro*. J Med Food. 2008;1:14-20.
69. Ishikawa Y, Tokura T, Ushio H, Niyonsaba F, Yamamoto T, Tadokoro T, Ogawa H., Okumura K. Lipid-soluble components of honeybee-collected pollen exert antiallergic effect by inhibiting IgE-mediated mast cell activation *in vivo*. Phytother Res. 2009;23:1581-1586.
70. Serra Bonvehí J. Plant origin of honeybee-collected pollen produced in Spain. An Asoc Palinol Lengua Espan. 1988;4:73-78.
71. O'rourke MK, Buchmann SL. Standardized pollen analytical techniques used for various bee collected samples. Environ entomol. 1991;20:507-513.

72. Funari SRC, Rocha HC, Sforcin JM, Filho HG, Curi PR, Gomes Dierckx SMA et al. Composições bromatológica e mineral do pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) Botucatu, Estado de São Paulo. Arch Latinoam Prod Anim. 2003;11(2):88–93.
73. Marchini LC, Reis VDA, Moreti ACCC. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. Cienc Rural. 2006;36(3):949-953.
74. Oliveira KCIL, Moryia M, Azedo RAB, Teixeira EW, Alves MLTME, Moreti ACCC, Almeida-Muradian LB. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. Quim Nova. 2009;32(5):1099-1102.
75. Modro AFH, Message D, Da Luz CFP, Meira Neto JAA. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. Pesqui Agropecu Bras. 2007;42(8):1057-1065.
76. Schimidt JO, Buchmann S I. Other products of the hive. In: Grahan JM (Ed.) The hive and the honeybee. Hamilton: Dadant & Sons. 1993. p.927-988.
77. Bastos DHM, Rocha CI, Cunha IBS, Carvalho PO, Torres EAS. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz. 2003;62(3):239-24.
78. Barreto LMRC, Funari SRC, Orsi RO. Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Fedetal. B Indústr Anim. 2005;62(2):167-175.
79. Carpes ST. Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil. [tese]. Curitiba (PR): Universidade Federal

- do Paraná; 2008.
80. Serra Bonvehí J, Martí Casanova T. Analytical study to determine moisture in honeybee-collected pollen. *Anales de Bromatologia*. 1987;39:339-349.
 81. Baldi Coronel B, Grasso D, Pereira SC, Fernández G. Caracterización bromatológica del pólen apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnologia*. 2004;29:145-181.
 82. Human H, Nicolson SW. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Alloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*. 2006;67:486-1492.
 83. Gergen I, Radu F, Bordean D, Isengard H-D. Determination of water content in bee's pollen samples by Karl Fisher titration. *Food Control*. 2006;17:176-179.
 84. Código Alimentario Argentino. Buenos Aires: La Canal y Asociados; 1998.
 85. Jodral M, Fernández C, Bentabol A, Liñán E. El pólen apícola com substrato para la producción de aflatoxinas. *Alimentaria*. 1992;236:67-69.
 86. Medina A, González G, Sáez JM, Mateo R, Jiménez M. Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *System Appl Microbiol*. 2004;27:261-267.
 87. Gonzalez G, Hinojo MJ, Mateo R, Medina A, Jiménez M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int J Food Microbiol*. 2005;105:1-9.
 88. Mendes TMFF. Determinação de espécies metálicas em mel de abelhas por ICP OES. [tese] Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2003.
 89. Schaafsma G. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS)-a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. *J AOAC*. 2005;88:988-994.

90. Qian WL, Khan Z, Watson DG, Fearnley J. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *J Food Comp Anal.* 2008;21:78-83.
91. Szczesna T. Study on the sugar composition of honeybee-collected pollen. *J Apic Sci.* 2007;51(1):15-22.
92. Foster-Powell K, Holt SH, Brand-Miller JC. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:5-56.
93. Somerville DC, Nicol HI. Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales. *Aust J Exp Agric.* 2002;42:1131-1136.
94. Szczesna T. Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen. *J Apic Sci.* 2007;51(1):5-13.
95. Ferreres F, Ortiz A, Silva C, Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – A study of their botanical origin. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1992;194:139-143.
96. Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F, Ferreres F, Garcia-Viguera C. Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. *J Sci Food Agric.* 1989;47:337-340.
97. Campos M, Markham KR, Mitchell KA, Cunha APD. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem Anal.* 1997;8:181-185.
98. Ferreres F, Juan T, Pérez-Arquillué C, Herrera-Martache A, Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA. Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *J Sci Food Agric.* 1998;77(4):506-510.

99. Dauguet JC, Bert M, Dolley J, Bekaert A, Lewin G. 8-Methoxikaempferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochem.* 1993;33(6):1503-1505.
100. Markham KR, Campos M. 7- and 8-*O*-methylherbacetin-3-*O*-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochem.* 1996;43(4):763-767.
101. Markham KR, Mitchell KA, Campos M. An unusually lipophilic flavonol glycoside from *Ranunculus sardous* pollen. *Phytochem.* 1997;45(1):203-204.
102. Campos M, Sabatier S, Amiot MJ, Aubert S. Characterization of flavonoids in three hive products: bee pollen, propolis, and honey. *Planta Medica.* 1990;56:580-581.
103. Tomás-Lorente F, Garcia-Grau MM, Nieto JL, Tomás-Barberán FA. Flavonoids from *Cistus Ladanifer* bee pollen. *Phytochemistry.* 1992;31:2027-2029.
104. Arráez-Román D, Zurek G, Bäßmann C, Almaraz-Abarca N, Quirantes R, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Annal Bioanal Chem.* 2007;389:1909-1917.
105. Freire KRL, Silva TMS, Santos FAR, Dórea MC, Câmara CA. Estudo químico de pólen apícola (*Apis mellifera*) do nordeste brasileiro. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (CD-Rom), Águas de Lindóia, Brazil, 2007.
106. Guo J, Zhang P, Zhang Z. Studies on chemical constituents from bee-collected rape pollen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2009;34:1235-1237.
107. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. (1998), Port. nº 741, de 16/09/1998. Brasília, DF [cited 2009 Dec 13]. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>

108. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. (2004) V. Recomendações da Comissão já aprovadas pela Diretoria de Alimentos e Toxicologia. 20 de julho de 2004. Brasília, DF [cited 2009 Dec 13]. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>
109. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. (2005) Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais, Res. RDC nº 269, de 22/09/2005. Brasília, DF [cited 2009 Dec 13]. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>
110. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. (2003) Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional, Res. RDC nº 359, de 23/12/2003. Brasília, DF [cited 2009 Dec 13]. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>
111. Kalbande DM, Dhadse SN, Chaudhari PR, Wate SR. Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environ Monit Assess.* 2008;138:233-238.
112. Free JB, Williams IH, Pinsent RJFH, Townsend A, Basi MS, Graham CL. Using foraging honeybees to sample an area for trace metals. *Environ Int.* 1983;9:9-12.
113. Leita L, Muhlbachova G, Cesco S, Barbattini R, Mondini C. Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination. *Environ Monit Assess.* 1996;43:1-9.
114. Conti M, Botrè F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contaminations. *Environ Monit Assess.* 2001;69:267-282.
115. Madras-Majewska B, Jasinski Z. Lead contents of bees, brood and bee products from different regions of Poland. *J Apicul Sci.* 2003;47(2):47-54.

116. Atrouse OM, Oran SA, Al-Abbadi SY. Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey-samples. *Int J Food Sci Technol*. 2004;39:413-417.
117. Bogdanov S. Contaminants of bee products. *Apidologie*. 2006;37:1-18.
118. Saavedra AR, Di Bernardo ML, Rondon C, Gutiérrez L, Saavedra O, González I. et al. Determinación de plomo en polen apícola de *Brassica napus* L. del Páramo de Misintá, estado Mérida, Venezuela. *Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel*. 2007;38(1):6-10.
119. Kevan PG. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agric Ecosyst Environ*. 1999;74:373-393.
120. Chang LW. *Toxicology of Metals*. Boca Raton: CRC Lewis Publishers; 1996.
121. Okuyama Y, Matsumoto K, Okochi H, Igawa M. Adsorption of air pollutants on the grain surface of Japanese cedar pollen. *Atmos Environ*. 2007;41:253-260.
122. Santos MLA. Pólen coletado por *Apis mellifera* no diagnóstico da poluição ambiental causada por praguicidas e metais no Brasil. [tese] Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2005.
123. MAFF (1995). Analysis of bee products for heavy metals. *Food Surveillance Information Sheet No 53*. [access in: May, 07 , 2009]. Available from: URL: <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1995/no53/53bee.htm> (cited in May, 05, 2009)
124. Kump P, Necemer M, Snajder J. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim Acta, Part B*. 1996;51:499-507.

CAPÍTULO 2

Pólen apícola brasileiro: Composição química, qualidade e valor nutritivo

MARCIA CRISTINA TEIXEIRA MARTINS
MARCELO A. MORGANO
EDUARDO VICENTE
SUELI R. BAGIO
VERA SÔNIA NUNES DA SILVA
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo a ser submetido à Revista Journal of Food Composition and Analysis

Pólen Apícola Brasileiro: Composição Química, Qualidade e Valor Nutritivo

Marcia C.T. Martins^{a,b}, Marcelo A. Morgano^c, Eduardo Vicente^c, Sueli R. Bagio^c, Vera Sônia Nunes da Silva^c, Delia B. Rodriguez-Amaya^b*

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6121, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

^bCentro Universitário Adventista de São Paulo, Estr. Itapecerica, 5898, 05858-001 São Paulo, SP, Brazil.

^cCentro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Av. Brasil, 2880, 13070-178 Campinas, SP, Brasil.

*Autor para Correspondência. Tel.: +55 11 5822 8000; Fax: +55 11 5821 7770

E-mail: marciactm@yahoo.com.br

RESUMO

Foram analisadas 154 amostras de pólen apícola desidratado, procedentes de 11 diferentes estados do Brasil e do Distrito Federal, coletadas nos anos de 2007 e 2008, quanto à composição centesimal, acidez e açúcares, sendo os aminoácidos livres identificados e quantificados em 22 amostras. O método de Karl Fisher para a determinação de umidade foi otimizado e aplicado. A titulação Karl Fisher usando metanol:n-octanol (1:1 v/v) como solvente, temperatura de 50°C e granulometria das partículas de pólen de 600 µm foi a mais indicada. Os dados obtidos apresentaram grandes variações dentro e entre os estados, sendo: 3,00 a 9,39 % para umidade; 1,33 a 4,13 g/100g para cinzas; 4,01 a 13,32 g/100g para lipídeos; 12,28 a 27,07 g/100g para proteínas; 6,99 a 21,85 g/100g para glicose; 12,59 a 23,62 g/100g para frutose e 105,3 a 609,9 meq/kg para acidez livre. Os resultados foram discutidos em relação aos padrões de qualidade vigentes e ao valor nutritivo do produto na alimentação humana e apontam para a necessidade da revisão de tais padrões e para a necessidade de controle da cadeia de produção deste produto.

Palavras-chave: Pólen apícola, composição centesimal, titulação Karl Fischer, umidade, proteínas, lipídeos, aminoácidos livres, açúcares.

ABSTRACT

Samples (154) of dehydrated bee pollen samples collected from 11 Brazilian states and the Federal District during 2007 and 2008 were analyzed in terms of the proximate composition, acidity and sugars. Free amino acids were also identified and quantified in 22 samples. The Karl Fisher method for the determination of moisture was optimized and used. Karl Fisher titration with methanol:n-octanol (1:1 v/v) as solvent, a temperature of 50⁰C and pollen particle size of 600 µm was the most indicated. The data obtained had wide within-state and between-state variations: 3.00 to 9.39% for moisture; 1.33 to 4.13 g/100 g for ash; 4.01 to 13.32 g/100 g for lipid; 12.28 to 27.07 g/100 g for protein; 6.99 to 21.85 g/100 g for glucose; 12.59 to 23.62 g/100 g for fructose and 105.3 to 609.9 meq/kg for acidity. The results were discussed in relation to regulatory quality standards and the nutritive value for the human diet, pointing to a need of reviewing such standards and of controlling the production of bee pollen.

Keywords: Bee pollen, proximate composition, Karl Fischer titration, free amino acids, sugars.

1. Introdução

O pólen apícola é obtido da aglutinação de diferentes grãos de pólen colhidos pelas abelhas, juntamente com as secreções salivares e pequenas quantidades de néctar (Orzáez Villanueva et al., 2002). Na colônia o pólen tem papel fundamental para a nutrição das abelhas, pois representa a principal fonte de proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas importantes para o desenvolvimento das larvas e nutrição de abelhas jovens (Zerbo et al., 2001). Segundo Pereira et al. (2006), o conhecimento do valor nutricional dos diferentes tipos polínicos pode contribuir para a escolha do local de instalação de apiários e sugerir ingredientes para a produção de substitutos protéicos, em épocas de entressafra de pólen.

A composição química do pólen é variável de acordo com as espécies vegetais visitadas pelas abelhas (Serra Bonvehi, 1988), as condições ambientais, a idade e o estado nutricional das plantas quando o pólen está se desenvolvendo (Herbert e Shimanuki, 1978), as localidades de produção, as estações do ano e entre diferentes anos (O'Rourke e Buchmann, 1991). A coleta de pólen em várias espécies de plantas garante às abelhas a obtenção de uma dieta equilibrada e diluição da potencialidade tóxica de alcalóides e outras toxinas (Schmidt e Buchmann, 1993).

Até o momento, sete trabalhos avaliaram a composição bromatológica do pólen apícola nacional. Destes, três focalizaram a variabilidade da sua composição em termos de macronutrientes (Marchini *et al.*, 2006; Modro et al., 2007) e em termos de minerais e macronutrientes (Funari et al. 2003) sob condições controladas de produção. Quatro avaliaram a composição bromatológica e a qualidade de amostras produzidas com fins comerciais e obtidas de apicultores (Bastos et al., 2003; Almeida-Muradian et al., 2005; Barreto et al., 2005a; Carpes, 2008). Na maior parte destes trabalhos foram analisadas amostras das regiões sudeste e sul do país. Apenas um estudo (Barreto et al., 2005a) pode ser considerado de abrangência nacional,

mas ainda com um número restrito de amostras ($n = 42$). Neste estudo foram analisadas dez amostras provenientes do estado da Bahia, duas do estado de Sergipe e duas do Distrito Federal. As demais amostras ($n = 28$) procediam das regiões sul e sudeste. O nordeste do Brasil, particularmente o estado da Bahia, é um importante pólo produtivo de pólen com alto potencial de crescimento devido ao clima favorável à produção durante todos os meses do ano (Barreto *et al*, 2005b).

O consumo e a comercialização do pólen apícola para alimentação humana são práticas antigas. Formulações contendo pólen apícola são comercializadas ao redor do mundo com finalidade dietética e como suplemento alimentar (Kroyer e Hegedus, 2001). Seu uso popular tem sido acompanhado de várias alegações de benefícios para a saúde humana tais como: desenvolvimento de massa muscular; combate ao *stress*, envelhecimento, depressão, anemia, baixa tolerância do sistema imunológico, fraqueza de memória, alto índice de colesterol, disfunções intestinais (constipação ou diarreia), problemas de próstata, impotência, entre outros (Linskens e Jorde, 1997). Índios e sitiantes da região amazônica têm utilizado o pólen apícola no combate às doenças pulmonares, inapetência, infecções dos olhos e também como fortificante e agente bactericida (Souza et al., 2004). O pólen apícola também é valorizado devido ao seu valor nutritivo, uma vez que contém nutrientes essenciais, tais como: carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais (Linskens e Jorde, 1997). O pólen contém ainda substâncias com atividade antimicrobiana e antioxidante (Tichy e Novak, 2000; Nagai et al., 2005; Almaraz-Abarca et al., 2007; Silva et al., 2006; Leja et al., 2007).

Com base em sua composição química e na adequação da proporção de macronutrientes em relação ao seu valor calórico (10-40% de proteínas, 1-13% de lipídeos e 13-55% de carboidratos, em amostras de pólen espanhol) (Campos et al., 2008), alguns autores reconhecem o pólen apícola como um potencial suplemento ou complemento nutricional na alimentação humana

(Orzáez Villanueva et al., 2002, Funari et al., 2003; Szczesna, 2006a). Outros vão além e ressaltam suas características bioativas, chegando a indicá-lo para indivíduos com várias doenças, tais como: câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (Kroyer e Hegedus, 2001; Nagai et al., 2005). No entanto, até o momento não há um consenso sobre o papel do pólen apícola na alimentação humana. Do ponto de vista legal, nem todos os países assumem o produto como um suplemento alimentar e têm definidos os seus padrões e limites oficiais de qualidade (Almeida-Muradian, 2006).

No Brasil o pólen apícola é comercializado com a autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e tem a fiscalização federal comprovada pelo selo SIF. A legislação brasileira estabelece os seus padrões de identidade e qualidade (MAPA, 2001) e inclui as análises de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas.

Segundo Almeida-Muradian (2006), existe um interesse por parte da *International Honey Commission* em estabelecer um padrão internacional de identidade e qualidade do pólen apícola, assim como descrever métodos mais adequados para o controle de qualidade deste produto. Esse padrão deve ser fixado com base nos padrões nacionais de cada país.

O Brasil apresenta grande potencial produtivo para o pólen apícola, pois o clima e a flora são altamente favoráveis à sua produção. No entanto, faltam dados nacionais sobre a composição química deste produto que seriam úteis para tipificação do mesmo, obtido em diferentes regiões.

O pólen apícola fresco apresenta em sua composição um alto teor de umidade (geralmente acima de 18%), que é variável e depende de diversos fatores. O produto desidratado é altamente higroscópico e, portanto pode reabsorver umidade do ambiente. Valores elevados facilitam o desenvolvimento de microrganismos e a ocorrência de reações químicas e enzimáticas. Entre os riscos de um material nutritivo, com altos teores de atividade de água e armazenados à temperatura ambiente, está a contaminação por fungos potencialmente produtores de micotoxinas

carcinogênicas (Jodral et al., 1992; Medina et al. , 2004; Gonzalez et al., 2005). Por esta razão, o pólen apícola deve ser submetido à desidratação. O processo de secagem do pólen requer experiência e equipamento apropriado. A qualidade e a vida de prateleira do produto dependem das etapas de limpeza, secagem, embalagem e das condições de conservação (Serra Bonvehí e Lopez Alegret, 1986).

O método usual para a determinação de umidade em pólen ainda é o gravimétrico, porém apresenta como desvantagem o fato de ser muito lento. Heinze e Isengard (2001) consideram que o método gravimétrico não é o mais adequado para a determinação de umidade em algumas matrizes de alimentos, pois a água presente pode estar ligada a compostos orgânicos polares e estes compostos podem ser perdidos pelo aquecimento além de poder ocorrer a vaporização de substâncias que dão aroma e sabor ao alimento.

Segundo Isengard (2001), a titulação Karl Fisher para a determinação de umidade em produtos de composição complexa como o pólen apícola pode ser usada como um método de referência, desde que precedido de uma seleção adequada das condições de análise, como a escolha da temperatura de reação, do solvente usado para dissolver a amostra e do tamanho da partícula da amostra (Gergen et al., 2006). A grande vantagem deste método é que as medidas são realizadas em poucos minutos, requer mínima preparação da amostra e compostos voláteis não são perdidos. Alguns trabalhos empregaram a titulação Karl Fisher para a determinação do teor de umidade no pólen apícola (Serra Bonvehí e Martí Casanova, 1987; Bastos et al. 2003; Gergen et al., 2006). Serra Bonvehí e Escolá Jordá (1997) ressaltam que o método de Karl Fisher é preferível para análise de umidade em pólen apícola por sua exatidão inigualável.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar as condições analíticas do método químico para determinação de umidade em pólen apícola usando a titulação Karl Fisher, comparando-o com o método gravimétrico, além de realizar a determinação da composição

centesimal, em relação a umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, acidez, açúcares (glicose e frutose) e aminoácidos em amostras de pólen apícola desidratado e pronto para consumo humano obtido das principais regiões produtoras do Brasil. Os valores obtidos são comparados com os limites estabelecidos pela legislação brasileira com o intuito de verificar se o pólen apícola nacional enquadra-se nas normas vigentes. Além disso, os dados da composição do pólen podem contribuir para a caracterização do pólen apícola nacional.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Foram adquiridas diretamente dos produtores apícolas, 154 amostras nacionais de pólen apícola desidratado prontas para serem comercializadas (produto seco, limpo e embalado), provenientes de 11 estados e do Distrito Federal (Tabela 1), nos anos de 2007 e 2008. As amostras foram enviadas para o laboratório, geralmente no mesmo mês da coleta, em sua maioria em sacos plásticos e algumas em embalagens de vidro, durante o período de produção apícola.

Todas as amostras apresentavam-se granuladas e após o seu recebimento foram seladas a vácuo usando um filme de poliamida e polietileno para evitar absorção de umidade e oxigênio e armazenadas em freezer a -16°C até a realização das análises. No dia da análise, as amostras foram quarteadas em quarteador de inox e, em seguida, trituradas em moinho refrigerado, com hélice de tungstênio (M20, IKA Labortechnik, Staufen, Baden, Ge). Para padronizar o tamanho das partículas as amostras foram passadas por tamiz com malha de 30 mesh (600 μm). Nos experimentos de avaliação do método de Karl Fischer para determinação de umidade foram usadas malhas de 20 mesh (850 μm), 25 mesh (710 μm) e 30 mesh (600 μm). Os estudos sobre a

influência da temperatura e da massa de pólen sobre os teores de umidade obtidos pelo método de titulação Karl Fischer foram realizados respectivamente com 5 e 6 replicatas de uma mesma amostra para cada condição de temperatura/massa.

As determinações da composição centesimal foram realizadas em triplicata para a umidade e acidez, em duplicata para cinzas, lipídeos, proteínas, glicose e frutose.

Tabela 1

Procedência e número de amostras de pólen apícola brasileiro.

Estado/Distrito Federal*	Número de amostras	Cidade de coleta do pólen (número de amostras)
RS	09	Cruz Alta (9)
SC	30	Campos Novos (17) e Porto União (13)
PR	10	Ilha Grande (3) e Lapa (7)
SP	23	São José dos Campos (9), Santa Branca (7) Holambra (3) e Guaratinguetá (4)
MG	10	Marmelópolis (4), Belo Oriente (2) e Entre Rios de Minas (4)
ES	10	Pedra Azul (10)
DF	03	Distrito Federal (3)
BA	37	Canavieiras (24), Ilhéus (10) e Norte Bahia (3)
SE	18	Neópolis (13), Aracaju (1) e Salgado (4)
PI	01	Teresina (1)
CE	01	Trairi (1)
MT	02	Cáceres (2)

*Amostras das regiões **Sul:** Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR); **Sudeste:** São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES); **Centro Oeste:** Distrito Federal (DF), Mato Grosso (MT); **Nordeste:** Bahia (BA), Ceará (CE), Piauí (PI), Sergipe (SE).

Digno de nota e, talvez, uma das limitações do presente trabalho é o pequeno número de amostras provenientes dos estados de PI (n=1), CE (n=1), MT (n=2) e DF (n=3). Entretanto, essas amostras refletem a baixa produção anual de pólen apícola nessas localidades, durante o período do estudo.

2.2. Análises físico-químicas

Para determinação de umidade pelo método de secagem em estufa (Zenebon e Pascuet, 2005) foram pesados cerca de 2 g da amostra de pólen (com precisão de 0,1 mg) em cápsula de alumínio tarada. Esta foi mantida em estufa a vácuo à temperatura de 70 °C durante 8 a 10 h, até peso constante. Para determinação de umidade por titulação Karl Fischer (Gergen et al., 2006) foi usado um titulador automático Titrino, modelo 785 da METROHM (Herisau, Switzerland), como titulante o reagente Titrant 5 (Merck) e como solventes mistura de metanol p.a. (Merck) e álcool n-octílico p.a. (Vetec) 1:1 (v/v). A corrente de polarização para a determinação potenciométrica do ponto final da reação foi de 10 µA e a voltagem do ponto final da titulação de 100 mV. A titulação Karl Fisher foi conduzida usando vaso de reação encamisado com temperatura ajustada e mantida constante pelo auxílio de um banho de água aquecida termostaticamente e controle de temperatura por termômetro calibrado. A precisão intermediária do método foi determinada em dois dias diferentes, realizando 10 repetições analíticas em cada dia, usando temperatura de 50 °C, solvente mistura metanol e n-octanol (1:1, v/v), massa na faixa de 74 mg e 100 mg e granulometria de 30 mesh (600 µm).

Para determinação do teor de cinzas (Zenebon e Pascuet, 2005) foram pesados 2 g (com precisão de 0,1 mg) da amostra em cápsula de porcelana. A amostra foi carbonizada em chapa de aquecimento e em seguida completamente incinerada em mufla a 550 °C.

Os lipídeos totais foram quantificados após hidrólise com ácido clorídrico 12 Mol/L à quente de cerca de 5 g (com precisão de 0,1 mg) da amostra pulverizada. Em seguida, procedeu-se a extração dos lipídeos com éter de petróleo em extrator tipo Butt e determinou-se por diferença de peso o teor de lipídeos na amostra de pólen (Zenebon e Pascuet, 2005).

O conteúdo de nitrogênio foi determinado por hidrólise ácida e destilação Kjeldahl a partir de 0,5 g (com precisão de 0,1 mg) de amostra de pólen pulverizado. A amônia foi destilada e recolhida em solução de ácido bórico, sendo posteriormente titulada com solução padrão de ácido clorídrico (Zenebon e Pascuet, 2005). Para converter o teor de nitrogênio em proteína, foi usado o fator de 5,60 (Serra Bonvehí e Escolá Jordá, 1997).

A acidez livre foi determinada a partir de 1,5 g (com precisão de 0,1 mg) de amostra de pólen pulverizado, por titulação potenciométrica com uma solução padronizada de álcali (NaOH 0,05 Mol/L), empregando o titulador automático Titrino, modelo 785 da METROHM (Herisau, Switzerland), até o ponto final da titulação que ocorre em pH 8.5 (Horwitz, 2006).

Glicose e frutose foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, após a extração dos açúcares. Cerca de 2,5 g (com precisão de 0,1 mg) da amostra pulverizada foram diluídas em 25 mL de água destilada e deionizada, usando um agitador orbital por 2 h e, em seguida, clarificadas com acetato de zinco 1 M e ferrocianeto de potássio 0,25 M e filtradas em papel qualitativo. A solução de açúcares foi filtrada em membrana de 0,45 µm de diâmetro (Millipore, Bellerica, EUA) e injetada num cromatógrafo líquido Varian, modelo Pro Star (Mulgrave Victoria, Austrália), coluna de fase normal LUNA NH₂ 250 x 4,6mm, 5µm (Phenomenex, USA), fase móvel de acetonitrila:água (85:15 v/v), vazão de 1 mL/min, temperatura da coluna de 40 °C, volume de injeção de 20 µL e detector de índice de refração Varian, modelo 350 RI (Mulgrave Victoria, Austrália), a 40 °C (Burgner e Feinberg, 1992). A

quantificação foi feita por padronização externa utilizando padrões de glicose e frutose marca Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

A determinação dos aminoácidos livres foi realizada em 22 amostras de pólen apícola desidratado, coletadas nos estados de São Paulo (n=5), Santa Catarina (n=6), Bahia (n=3), Sergipe (n=3), Espírito Santo (n=3) e Distrito Federal (n=2). As análises foram realizadas por cromatografia líquida de troca iônica (Spackman et al., 1958) em um analisador de aminoácidos, marca Dionex DX-300 (Dionex Corporation, USA). O preparo da amostra consistiu na dissolução de 1,0 g (com precisão de 0,1 mg) da mesma em 50 mL diluente (tampão de citrato de sódio, pH 2,2) (Pickering Laboratories Inc., USA) e filtração em membrana de 0,45 µm (Millipore, USA). Após extração ácida, os aminoácidos protonados foram separados em uma coluna de troca catiônica (Pickering Laboratories Inc., USA), 5 µm, 250 x 4 mm, sendo eluídos os aminoácidos ácidos primeiro, seguido dos neutros e dos básicos, e detectados em detector UV/VIS modelo VDM-2 (Dionex Corporation, USA) a 520 nm, com reação pós coluna com ninidrina. A identificação dos aminoácidos livres foi realizada por comparação com os tempos de retenção de uma mistura de padrões de 18 aminoácidos (Pickering Lab., USA). A quantificação foi feita por padronização externa.

2.3. Análises estatísticas

Para verificar se as diferenças entre as médias obtidas nas diferentes condições de análise de umidade (para temperatura, massa pesada do pólen apícola, tamanho das partículas) e comparação entre os métodos de Karl Fischer e o método convencional gravimétrico, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer (Vieira, 1981).

Para verificar se as médias obtidas nas análises físico-químicas das amostras de pólen apícola procedentes dos diferentes estados poderiam ser consideradas estatisticamente diferentes foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o método de aproximação, com diferentes números de repetições por estado.

Para a aplicação dos testes estatísticos foi usado o programa Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

2.4. Análise hierárquica de agrupamento (HCA) e análise de componentes principais (PCA)

Para verificar as semelhanças entre as amostras dos diferentes estados baseadas na composição físico-química, foi aplicada a HCA. Utilizando individualmente os valores médios de cada replicata, construiu-se uma matriz de dados (154 x 7) na qual as amostras foram dispostas em linhas e as concentrações obtidas para a composição físico-química do pólen em colunas (variáveis). Os dados foram pré-processados e, em seguida, submetidos aos métodos de HCA e PCA, utilizando o programa Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Na HCA as amostras foram agrupadas por similaridade, a partir da distância Euclidiana calculada e os resultados apresentados na forma de um gráfico bi-dimensional (dendograma). A análise de PCA foi usada para verificar quais componentes foram importantes para as separações dos grupos formados.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação do método de titulação Karl Fischer para determinação de umidade

Na Tabela 2 estão descritos os resultados obtidos no estudo da influência da temperatura e da massa de pólen utilizada sobre os resultados da determinação da umidade usando o método da titulação Karl Fisher.

Foi observado neste estudo que o tempo médio de reação é reduzido com o aumento da temperatura. Gergen et al. (2006) verificaram uma influência positiva da temperatura sobre o processo de extração de água do pólen apícola usando o método da titulação Karl Fisher. Estes autores encontraram valores superiores de umidade em amostras analisadas a 50 °C em comparação com as amostras analisadas a 26,5 °C. No presente estudo não foi observada diferença nos teores de umidade obtidos nas temperaturas de 27 °C e 50 °C. No entanto, o tempo médio de reação foi menor a 50 °C, justificando a escolha desta temperatura para a determinação de umidade em pólen apícola.

A variação das massas de amostra na faixa 50 a 150 mg não resultou em diferenças significativas entre os teores de umidade.

Tabela 2

Influência da temperatura (n=5) e da massa (n=6) de pólen sobre os teores de umidade obtidos pelo método da titulação Karl Fisher.

Influência da temperatura			
Temperatura (°C)	Umidade* $\pm$ desvio-padrão (%)	C V (%)	Tempo Médio de Reação (segundos)
27 (Ambiente)	6,34 $\pm$ 0,12 ^a	1,89	457
50	6,35 $\pm$ 0,10 ^a	1,55	169

Influência da massa		
Massa $\pm$ desvio-padrão (mg)	Umidade** $\pm$ desvio-padrão (%)	C V (%)
50 $\pm$ 4	6,33 $\pm$ 0,13 ^a	2,07
74 $\pm$ 2	6,35 $\pm$ 0,10 ^a	1,55
100 $\pm$ 3	6,43 $\pm$ 0,12 ^a	1,91
150 $\pm$ 5	6,52 $\pm$ 0,10 ^a	1,39

* Condição de análise: faixa de massa de pólen 70-80 mg, tamanho das partículas: 600 μ m, solvente metanol e n-octanol 1:1 (v/v). ** Condição de análise: temperatura 50°C, solvente metanol e n-octanol 1:1 (v/v) . CV = Coeficiente de Variação. Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ao nível de 5%.

A Figura 1 mostra a influência do tamanho das partículas de pólen apícola sobre a curva de titulação. Uma mesma amostra de pólen apícola com diferentes granulometrias, obtidas pela passagem do grão original através de peneiras de 20 mesh (850 μ m), 25 mesh (710 μ m) e 30 mesh (600 μ m) apresentou distintos padrões de formato da curva de titulação, indicando que o controle

do tamanho das partículas é importante para a determinação da umidade de pólen apícola desidratado por este método. Partículas com granulometria inferior a 600 μm apresentaram forte atração eletrostática o que dificultaria a análise e por isso não foram testadas.

Nossos resultados corroboram os obtidos por Gergen et al. (2006) que também observaram uma forte influência do tamanho das partículas sobre a extração de água dos grãos de pólen. No entanto, estes autores não padronizaram a granulometria das amostras através de tamização, tendo considerado amostras com partículas de menor tamanho as que foram trituradas em gral. Estas foram comparadas com amostras trituradas em moinho e com amostras não trituradas. No presente estudo, as amostras foram trituradas em moinho e, em seguida tamizadas para tornar o processo mais rápido e padronizado. Com este procedimento foi possível estabelecer a melhor granulometria para determinação de umidade em pólen: 30 mesh (600 μm).

Os resultados obtidos de precisão intermediária para a umidade foram muito próximos: 1º Dia = $6,33 \pm 0,13\%$ e 2º Dia = $6,35 \pm 0,10\%$, não apresentando diferença significativa ao nível de erro de 5%.

Os resultados obtidos pelo método da titulação Karl Fisher com as massas de 74 e 100 mg ($6,35 \pm 0,13\%$, n=10; $6,43 \pm 0,12\%$, n=6, respectivamente) não apresentaram diferença significativa quando comparados com os valores obtidos pelo método gravimétrico convencional em estufa a vácuo e temperatura de 70°C ($6,40 \pm 0,07\%$, n=5).

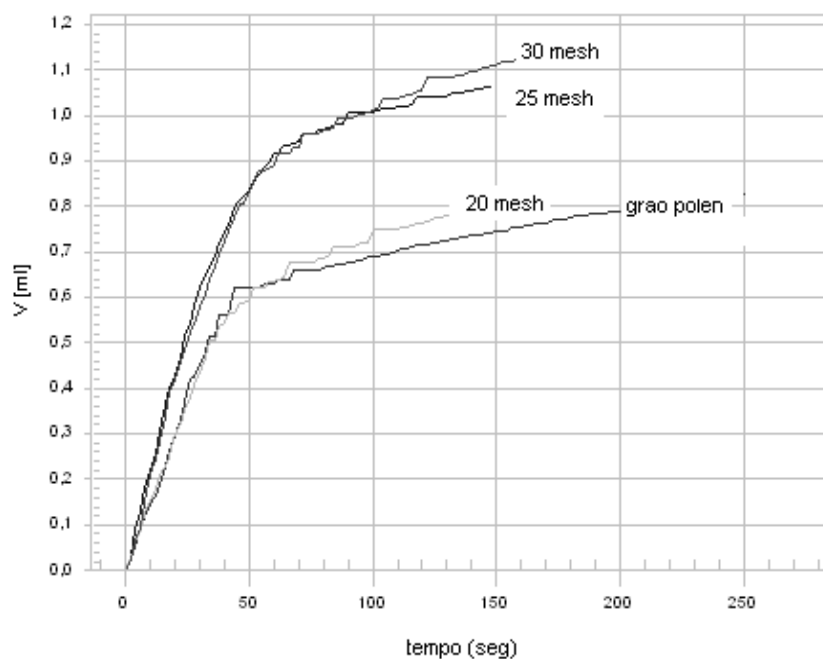


Fig. 1. Influência do tamanho das partículas do grão de pólen na curva de titulação Karl Fisher.

3.2. Determinação da composição físico-química

Os resultados obtidos para a composição físico-química em relação à acidez, umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, glicose e frutose, das 154 amostras de pólen apícola, divididos por estado, e Distrito Federal, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

Resultados obtidos das análises físico-químicas das 154 amostras de pólen apícola coletadas no período de 2007 a 2008.

Estado/ Distrito Federal	N	Estatística	Umidade (%)	Cinzas (g/100g)	Lipídeos (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Glicose (g/100g)	Frutose (g/100g)	Acidez livre (mEq/kg)
Paraná	10	Média ± DP	5,14±0,01 ^b	2,55±0,58 ^b	9,23±1,67 ^a	18,68±2,91 ^b	13,95±3,36 ^a	17,37±3,26 ^a	292,0±97,8 ^b
		Mediana	4,83	2,45	9,21	18,85	13,08	17,93	289,2
		Intervalo	3,30-6,72	1,74-4,00	7,10-11,90	12,28-22,84	10,21-19,54	12,89-20,76	161,2-501,9
Santa Catarina	30	Média ± DP	5,35±0,01 ^b	2,29±0,42 ^{b,c}	8,01±1,56 ^b	19,39±3,23 ^b	16,06±2,93 ^a	19,37±1,76 ^a	264,7±80,5 ^b
		Mediana	5,23	2,39	7,48	19,24	16,49	19,57	247,3
		Intervalo	3,32-6,69	1,45-3,18	5,50-11,14	13,83-26,40	6,99-21,04	14,68-23,62	158,9-603,6
Rio Grande do Sul	9	Média ± DP	4,56±0,01 ^b	2,70±0,24 ^b	8,30±2,39 ^b	21,71±3,20 ^a	15,43±2,06 ^a	18,38±1,57 ^a	263,2±44,0 ^b
		Mediana	4,65	2,79	7,51	22,38	15,28	18,3	249,4
		Intervalo	3,58-5,56	2,23-3,04	6,17-13,32	17,96-26,61	12,56-19,88	16,24-21,09	208,0-352,2
São Paulo	23	Média ± DP	4,67±0,01 ^b	2,36±0,22 ^b	6,14±1,52 ^c	20,03±3,05 ^a	15,20±2,32 ^a	18,81±2,27 ^a	304,6±71,7 ^b
		Mediana	4,48	2,34	5,89	19,78	15,62	19,38	296,7
		Intervalo	3,10-7,51	1,96-2,79	4,01-9,86	16,23-24,93	10,47-20,13	14,65-23,30	189,1-431,4
Minas Gerais	10	Média ± DP	5,18±0,01 ^b	1,89±0,29 ^c	7,09±1,85 ^c	17,58±3,53 ^b	17,24±3,42 ^a	20,23±3,13 ^a	218,2±79,6 ^b
		Mediana	5,37	1,92	7,39	16,86	17,18	21,25	220
		Intervalo	3,00-6,65	1,48-2,37	4,65-11,10	13,38-24,80	10,71-21,85	12,88-23,48	105,3-331,1
Espírito Santo	10	Média ± DP	5,48±0,01 ^b	1,93±0,43 ^c	7,55±0,76 ^c	19,90±2,03 ^b	16,68±3,25 ^a	20,05±2,44 ^c	306,9±119,6 ^b
		Mediana	5,44	1,84	7,36	16,72	17,02	19,99	349,3
		Intervalo	4,61-6,25	1,33-2,60	6,55-8,88	13,75-20,03	11,64-21,82	15,89-22,63	125,6-451,8
Distrito Federal	3	Média ± DP	5,60±0,01 ^{a,b}	2,77±0,16 ^b	6,94±0,27 ^c	21,27±1,34 ^a	19,12±0,35 ^a	20,87±0,23 ^a	142,5±8,6 ^c
		Mediana	5,31	2,71	7,09	21,75	19,09	20,8	146,8
		Intervalo	5,00-6,49	2,65-2,95	6,63-7,11	19,77-22,31	18,80-19,49	20,70-21,13	132,6-148,2
Bahia	37	Média ± DP	6,12±0,01 ^a	3,01±0,40 ^b	7,08±0,75 ^c	19,03±2,13 ^b	14,16±3,04 ^a	19,41±2,07 ^a	411,0±110,7 ^a
		Mediana	6,33	3,09	6,83	18,85	13,15	19,59	409,9
		Intervalo	3,32-7,63	2,03-3,59	6,10-8,86	14,91-27,07	9,93-19,04	15,68-22,77	227,6-609,9
Sergipe	18	Média ± DP	6,28±0,02 ^a	3,61±0,32 ^a	6,89±0,57 ^c	21,91±2,52 ^a	12,02±2,55 ^b	17,81±1,26 ^a	429,0±72,8 ^a
		Mediana	5,74	3,68	6,9	21,99	12,35	17,87	442,2
		Intervalo	4,28-9,39	2,61-4,13	6,04-7,80	18,12-26,86	7,57-15,71	14,92-19,55	273,3-545,5
Piauí	1	Média ± DP	5,69±0,04 ^a	3,37±0,01 ^a	7,78±0,04 ^c	20,61±0,11 ^a	13,94±0,09 ^a	18,57±0,21 ^a	326,7±18,3 ^{a,b}
Ceará	1	Média ± DP	5,48±0,08 ^{a,b}	3,39±0,04 ^a	6,44±0,05 ^c	21,59±0,11 ^a	14,84±0,35 ^a	20,12±0,16 ^a	382,3±1,1 ^{a,b}
Mato Grosso	2	Média ± DP	8,35±0,004 ^a	2,91±0,06 ^b	7,13±0,25 ^c	20,09±0,48 ^a	8,77±1,59 ^c	14,45±2,63 ^b	444,8±16,5 ^a
		Mediana	8,35	2,91	7,13	20,09	8,77	14,45	444,8
		Intervalo	8,07-8,62	2,86-2,95	6,95-7,31	19,75-20,43	7,65-9,90	12,59-16,31	433,2-456,5
Total	154	Média Geral	5,53±0,01	2,65±0,62	7,34±1,52	19,57±3,00	14,89±3,22	18,99±2,28	327,6±114,4
		Mediana	5,41	2,56	7,08	19,12	15,11	19,38	301,5
		Intervalo	3,00-9,39	1,33-4,13	4,01-13,32	12,28-27,07	6,99-21,85	12,59-23,62	105,3-609,9

DP = Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna identificam amostras com diferença com nível de 95% de significância.

Alguns países possuem parâmetros nacionais de qualidade para o pólen apícola, tais como Bulgária, Polônia e Suíça (Campos et al., 2008). Na América do Sul, o Brasil (MAPA, 2001) e a Argentina (Codigo Alimentario Argentino, 1998) apresentam tais limites. Recentemente Campos et al. (2008) revisaram os fatores necessários garantir a qualidade do pólen apícola e propuseram critérios gerais de qualidade para este produto com base na experiência e nos estudos realizados por pesquisadores de diferentes países. Estes requerimentos, juntamente com as exigências das normas brasileira e argentina estão apresentados na Tabela 4 e serão utilizados para a discussão dos resultados obtidos no presente estudo.

Tabela 4

Limites propostos por Campos et al., (2008) e estabelecidos pelas legislações brasileira e argentina para pólen apícola desidratado quanto os parâmetros umidade, proteínas, lipídeos e cinzas.

Requisitos	Critérios gerais de qualidade* (Campos et al., 2008)	Especificação Brasileira (MAPA, 2001)	Especificação Argentina (Codigo Alimentário Argentino, 1998)
Umidade	Máximo de 6-8%	Máximo de 4%	Máximo de 8%
Proteínas	Mínimo de 15%; m/m	Mínimo de 8%; m/m (base seca)	Entre 15 e 28 % m/m (base seca)
Lipídeos	Mínimo de 1,5%; m/m	Mínimo de 1,8%; m/m (base seca)	-----
Cinzas	Não mais do 6%; m/m	Máximo de 4%; m/m (base seca)	Máximo de 4% m/m(base seca)
Acidez	-----	Máximo 300 mEq/kg; m/m	-----

*para pólen desidratado.

Os valores de umidade encontrados (3,00 – 9,39%) mostraram que a maior parte das amostras (92%) está em desacordo com a legislação brasileira vigente que estabelece um limite máximo de 4% de umidade para o pólen apícola desidratado (MAPA, 2001) (Tabela 4).

Valores de umidade superiores a 4% têm sido observados em amostras brasileiras de pólen apícola desidratado e de outros países. No estudo de Bastos et al. (2003), todas as amostras de pólen apícola comercial desidratado analisadas (n=21) apresentaram teores de umidade acima dos limites legais (6,1–12,2%). Os autores destacaram o fato de que a maior parte dos apicultores não dispõe de recursos para realização do procedimento adequado de secagem que estabelece o uso de secadores providos de bandejas sobrepostas e perfuradas com controle de temperatura e sistema de circulação de ar, além de sala de processamento onde alguns equipamentos são necessários para manter a umidade relativa do ar em 40%. Barreto et al. (2005a) estudaram 42 amostras de pólen procedentes de sete estados brasileiros mais o Distrito Federal e obtiveram teores de umidade entre 1,99 e 6,75%. Nos estados de PR, RS, SP e Distrito Federal nenhuma das 45 amostras analisadas apresentou nível de umidade superior a 4%. Almeida-Muradian et al. (2005) encontraram valores médios de umidade de 7,40% para 10 amostras de pólen apícola desidratado coletadas na região Sul do Brasil, sendo que todas as amostras estavam acima dos limites legais. No estudo de Carpes (2008), foram analisadas 36 amostras dos estados de PR, SC e RS, sendo que 47% destas apresentaram teores de umidade acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Entretanto, a atividade de água média das amostras foi de $0,38 \pm 0,04$, o que é característico de um alimento desidratado com boa estabilidade de armazenagem.

Em dois estudos com pólen apícola desidratado procedente da Espanha, Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997) encontraram valores de umidade variando entre 4,68 a 5,87%, em 20 amostras colhidas durante duas épocas de produção nos anos de 1993 e 1994, enquanto Orzáez Villanueva et al. (2002) obtiveram teores entre 4,59 e 9,96% em 15 amostras, aproximando-se

mais dos resultados obtidos no presente estudo. Os resultados de Baldi Coronel et al. (2004), obtidos com 37 amostras de pólen argentino apresentaram ainda maior semelhança com os valores encontrados no presente trabalho, com teores de umidade entre 3,23 e 9,29%.

Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997) consideram que os valores de umidade obtidos (4,68 a 5,87%) estão dentro de uma faixa aceitável para garantir uma boa estabilidade durante o armazenamento do pólen apícola. Estes autores recomendam que o processo de desidratação realizado corretamente resulte em um conteúdo final de umidade entre 4 e 8%. Orzáez Villanueva et al. (2002) ressaltam que teores de umidade entre 4,59 e 9,96% refletem um processamento adequado, enquanto Baldi Coronel et al. (2004) consideram teores de umidade entre 6-7% seguros para evitar o crescimento de bactérias e fungos. Vale lembrar que a legislação argentina é mais tolerante com respeito ao teor de umidade, permitindo valores máximos de 8% para o pólen apícola desidratado (Tabela 4) (Codigo Alimentario Argentino, 1998), em concordância com as recomendações de Serra Bonvehi et al. (1986) e de Jodral et al. (1992). Outros países também apresentam limites mais tolerantes para o teor de umidade: Suíça e Polônia: máximo de 6%, Uruguai: máximo de 8%, Bulgária: máximo de 10% (Campos et al., 2008).

A desidratação deve ser realizada imediatamente após a coleta diária (Medina et al., 2004) e a conservação do produto final em temperatura inferior a 11°C (Jodral et al., 1992). No presente trabalho, 6 amostras (4%) apresentaram teores de umidade superiores a 8%.

O alto percentual de inadequação dos teores de umidade aos limites legais nacionais vigentes, observado no presente estudo evidencia a existência de dificuldades dos produtores de pólen apícola nacional para obter um produto adequado à mesma. Os resultados obtidos, também, indicam que, pela diversidade de valores encontrados em cada região, pode existir uma

heterogeneidade entre os produtores de pólen com respeito às tecnologias de processamento para a desidratação do pólen. Os estados que apresentaram maiores teores de umidade nas amostras de pólen foram os das regiões centro oeste e nordeste, em ordem decrescente: MT, SE, BA e PI.

Se, por um lado, a desidratação do pólen apícola é favorável à sua vida de prateleira e à segurança sanitária do produto, a secagem excessiva pode prejudicar as suas características sensoriais, comercialmente importantes (Baldi Coronel et al., 2004; Campos et al., 2008). Os grãos devem manter a forma quando pressionados ao dedo, fragmentam-se sem ceder, são maleáveis e apresentam textura dura, de grão de cereal. Além disso, secagem excessiva favorece as reações de escurecimento químico (reações de Maillard e desidratação da frutose) e a perda de componentes voláteis (Serra Bonvehi e Lopez Alegret, 1986; Collin et al., 1995). Baldi Coronel et al. (2004) concluíram que a faixa de umidade ideal para manter adequadas características sensoriais do pólen apícola seria entre 6 e 6,5%, superior ao teor máximo permitido pela legislação brasileira (Tabela 4).

Alguns autores sugerem que a secagem excessiva também pode afetar negativamente a composição química do pólen apícola. Amostras de pólen brasileiro, quando comparadas com amostras de outros países, apresentam baixa relação média de ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados (UFA/SFA) (Bastos et al., 2004), proposta por Szczesna (2006a) como um índice de qualidade do produto. Os autores sugerem que tanto o processo de desidratação, como o armazenamento sob variadas condições (temperatura, exposição à luz) podem favorecer a decomposição de ácidos graxos insaturados, diminuindo assim a relação UFA/SFA nas amostras de pólen examinadas.

Estudos futuros são necessários para se conhecer melhor a cinética das mudanças da composição química e características sensoriais do pólen em função do processamento e

conservação do produto, sob diferentes condições, para determinar as condições ótimas destes processos e garantir a obtenção de um produto de alta qualidade.

A acidez livre variou de 105,3 a 609,9 meq/kg para todas as amostras analisadas, sendo que as amostras com os maiores níveis de acidez livre foram as de BA (609,9 meq/kg) e SC (603,6 meq/kg) e as com menores níveis de acidez foram de MG (105,3 meq/kg) e do Distrito Federal (132,6 meq/kg). O pólen é naturalmente ácido, com valores de pH entre 4 e 6 (Herbert Jr. e Shimanuki, 1978; Código Alimentario Argentino, 1998; MAPA, 2001; Bastos et al., 2003; Barreto et al., 2005a; Marchini et al., 2006), devido à presença de ácidos orgânicos. A legislação brasileira estabelece o limite máximo de valor de 300 mEq/kg (Tabela 4) (MAPA, 2001). A porcentagem de amostras que ultrapassou esse limite foi 50% no presente estudo, enquanto no trabalho de Barreto et al. (2005a), teores de acidez livre acima do permitido foram encontrados somente em duas amostras, sendo uma do estado da BA (430 mEq/kg) e outra de SC (380 mEq/kg). O valor médio encontrado foi de $164,75 \pm 36,75$ mEq/kg para as 42 amostras estudadas, aproximadamente a metade do encontrado no presente estudo, de $327,6 \pm 114,4$ mEq/kg. A legislação argentina não exige a determinação de acidez livre em pólen apícola (Código Alimentario Argentino, 1998), tampouco Campos et al. (2008) recomendam a determinação de acidez livre como parâmetro de qualidade do pólen apícola (Tabela 4).

O teor médio de cinzas variou, nas amostras analisadas, de 1,33 a 4,13%, aproximando-se dos valores encontrados por Bastos et al. (2003) que estudaram pólen dos estados de SP e MG, e encontraram valores na faixa de 1,5 a 4,8%. No trabalho de Barreto et al. (2005a) amostras de pólen de sete estados do Brasil apresentaram valores de cinzas entre 1,62 a 3,97%, aproximando-se dos resultados de Carpes (2008) obtidos em amostras do PR, SC e RS: 1,90 a 3,91%. Tanto a legislação brasileira, quanto a argentina estabelecem que o teor de cinzas em amostras de pólen apícola deve ser no máximo de 4% m/m, na base seca (Tabela 4) (Código Alimentario Argentino,

1998; MAPA, 2001). Entretanto, recentemente Campos et al. (2008) sugeriram um valor máximo de 6% m/m de cinzas para pólen apícola. Considerando este limite todas as amostras avaliadas no presente estudo estariam adequadas.

A presença de impurezas de origem mineral, devido a procedimentos ineficientes de limpeza pode aumentar o conteúdo de cinzas (Baldi Coronel et al., 2004), sendo esta análise considerada um importante parâmetro de qualidade do pólen (Orzáez Villanueva et al., 2002). Do total das amostras analisadas, somente uma amostra (0,6%) do estado de Sergipe ultrapassou ligeiramente o valor da legislação brasileira. É possível também que o conteúdo de cinzas seja influenciado pelo tipo de solo, origem geográfica, pelas espécies florais e pela capacidade da planta de acumular sais minerais no pólen (Serra Bonvehí et al. 1986). Baldi Coronel et al., (2004) encontraram maiores variações nos teores de cinzas de 37 amostras de pólen argentino, entre 0,96 a 6,70%, sendo que 17% destas superavam os limites da legislação. Os autores alegaram, porém, que as amostras se encontravam livres de impurezas de origem mineral que pudesse aumentar o conteúdo de cinzas.

Amostras espanholas apresentaram menores variações nos teores de cinzas, entre 1,63 e 2,20% e entre 1,54 e 1,95%, nos trabalhos de Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997) e Orzáez Villanueva et al., (2002), respectivamente.

Com relação ao teor de lipídeos, as 154 amostras ficaram dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira que estabelece o teor mínimo de 1,8 g/100g de lipídeos (MAPA, 2001). A legislação argentina não estabelece valores mínimos de lipídeos para o pólen apícola, enquanto Campos et al. (2008) sugeriram teores mínimos de 1,5 g/100g de lipídeos (Tabela 4). No presente estudo foram obtidos resultados variando de 4,01 a 13,32 g/100g, sendo que os estados que apresentaram amostras com maiores teores de lipídeos foram: PR, RS e SC, em ordem decrescente.

Os resultados deste estudo se aproximaram dos valores encontrados por Bastos et al. (2003), entre 6,1 a 14,0 g/100g para pólen dos estados de SP e MG. Já Barreto et al. (2005a) encontraram valores de 2,56 a 6,17 g/100g em amostras de pólen de sete estados do Brasil, enquanto Carpes (2008) obtiveram resultados entre 3,72 e 6,47 g/100g em amostras os estados de PR, SC e RS.

Baldi Coronel et al. (2004) encontraram teores de lipídeos entre 1,76 e 6,76 g/100g em amostras de pólen argentino. Em pólen procedente da Espanha, (Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997) encontraram valores na faixa de 4,8 a 7,2 g/100g, enquanto Orzáez Villanueva et al. (2002), obtiveram entre 3,60 e 8,96 g/100g de lipídeos. Teores mais próximos dos obtidos no presente estudo foram encontrados por Szczesna (2006a) em amostras provenientes da Polônia (13 amostras), Coréia do Sul (9 amostras) e China (5 amostras) com resultados entre 6,74 e 10,99 g/100g de lipídeos.

Parece que durante a coleta de pólen floral as abelhas selecionam aqueles com altos níveis de ácidos graxos insaturados, mais adequados para o seu metabolismo. De fato, Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997) encontraram uma relação UFA/SFA de 1,96 em pólen espanhol. Esses autores também constataram riqueza do pólen em ácidos graxos essenciais, com ácido linolêico (30%) e ácido linolênico (20%) em amostras de pólen multifloral e de *Cistus ladaniferus* (Serra Bonvehí et al., 1986; Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997). Num estudo realizado com amostras brasileiras Bastos et al., (2004) encontraram predominância de ácido linolêico (27%), traços de ácido linolênico e a relação UFA/SFA de 0,4. Posteriormente, Szczesna (2006a) encontrou predominância de ácido α -linolênico (43%), ácido palmítico (28%) e ácido linolêico (14%) e a relação UFA/SFA entre 1,21 e 2,35, em amostras polonesas, sul coreanas e chinesas.

A variabilidade encontrada na composição da fração lipídica de amostras de pólen de diferentes procedências resulta primariamente da origem botânica das amostras, acrescida da influência dos diferentes métodos empregados. Ainda assim observa-se uma tendência para o

fornecimento de ácidos graxos essenciais (EFA), uma vez que a soma de ácido linolêico e linolênico está entre 27% (Bastos et al., 2004) e 60% (Szczesna, 2006a) do total de ácidos graxos de cadeia longa na fração lipídica do pólen. Por esta razão, considera-se atrativa a possibilidade do seu uso como fonte de EFA, na forma de suplemento alimentar ou adicionado a alimentos processados para melhorar a sua qualidade nutritiva. A presença de lipídeos, juntamente com açúcares também contribui para aumentar o suprimento de energia deste produto. Em função da possível influência do processamento sobre o teor de EFA, ainda não são conclusivos os estudos realizados até o momento sobre os seus teores em pólen apícola brasileiro.

Proteínas constituem o segundo grupo dos compostos mais abundantes em pólen apícola, após o grupo dos carboidratos. Por esta razão alguns autores destacam o valor do pólen como fonte deste nutriente na alimentação humana (Orzáez Villanueva et al., 2002; Szczesna, 2006a; Szczesna, 2006b). Os valores encontrados neste trabalho estão entre 12,28 a 27,07 g/100g e de acordo com a legislação brasileira que estabelece um teor mínimo de 8 g/100g, na base seca (MAPA, 2001). Entretanto, 11 amostras (7%) apresentaram teores de proteínas inferiores ao limite inferior estabelecido pela legislação argentina: entre 15 e 28 g/100g, na base seca (Codigo Alimentario Argentino, 1998) e ao recomendado por Campos et al. (2008): superior a 15 g/100g (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Barreto et al. (2005a) que encontraram teores de proteínas entre 8,40 a 19,60 g/100g em 42 amostras de sete estados brasileiros. Bastos et al. (2003) encontraram teores entre 15,8 e 27,8 g/100g e Carpes (2008) obtiveram valores próximos, entre 15,04 e 27,69 g/100g em amostras do sudeste e do sul do Brasil, respectivamente. Almeida-Muradian et al. (2005) obtiveram o valor médio de proteína de 21 g/100g em 10 amostras da região sul do Brasil. Em estudos realizados com amostras de outros países foram encontrados os valores de proteínas de 20,6 e 27,9 g/100g em duas amostras de pólen desidratado de diferentes espécies de eucalipto (Bell et al., 1983), entre 12,6 e 18,2g/100g

(Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997) e entre 9,89 e 16,56 g/100g (Orzáez Villanueva et al., 2002) em amostras de pólen espanhol desidratado. Em amostras de pólen argentino foram obtidos teores de proteína entre 17,26 e 30,86 /100g (Baldi Coronel et al., 2004), enquanto Szczesna (2006b), encontrou em pólen apícola proveniente da Polônia (13 amostras), Coréia do Sul (9 amostras) e China (5 amostras) valores entre 15,80 e 24,14 g/100g, 17,63 e 24,51 g/100g e 17,83 e 26,13 g/100g, respectivamente.

A grande variabilidade dos valores de proteínas encontrados no pólen apícola pode ser explicada em parte pela multiplicidade de opções com respeito à sua origem floral, fatores biológicos, ecológicos e geográficos relacionados com a sua colheita e também fatores relacionados com a sua manipulação e armazenamento (Orzáez Villanueva et al., 2002). Entretanto, outro aspecto também deve ser levado em consideração. Apesar de não haver no regulamento técnico brasileiro para fixação de identidade e qualidade do pólen apícola (MAPA, 2001) uma indicação sobre o fator de conversão nitrogênio-proteína a ser usado, é recomendável o uso do fator de $N \times 5,6$, estimado por Rabie et al. (1983) como sendo mais adequado para o pólen apícola. O uso do fator $N \times 6,25$ poderia superestimar o teor de proteínas (Serra Bonvehí et al., 1986). De fato, valores elevados de proteínas em amostras de pólen apícola foram encontrados no trabalho de Youssef et al. (1987), variando de 23,3 a 37,7 g/100g para amostras do Egito, porém estes autores usaram o fator de conversão de $N \times 6,25$. Carpes (2008) e Almeida-Muradian et al. (2006) também usaram o fator de conversão de $N \times 6,25$.

Embora o pólen apícola apresente teores elevados de proteína, alguns autores questionam a sua digestibilidade para seres humanos e animais monogástricos (Bell et al., 1983), enquanto outros as consideram facilmente digeríveis (Szczesna, 2006c).

Até o momento, um estudo foi realizado para verificar a qualidade protéica de pólen apícola monofloral de duas espécies de *Eucalyptus* coletado na Austrália: *Jarra* e *Marri* (Bell et al.,

1983). Os ensaios de qualidade protéica foram realizados em ratos e o valor biológico obtido foi de 61,7 e 66,9, respectivamente, para as espécies citadas, considerando o controle de caseína como 71,4. As taxas de eficiência protéica ajustada (PER) foram 2,5; 1,2 e 1,1 para caseína e os pólenes *Jarra* e *Marri*, respectivamente. A utilização protéica líquida aparente (NPU) foi significativamente reduzida para ambos os polens: 32,8 para *Jarra* e 39,5 para *Marri*, comparada com a caseína (63,6). A digestibilidade aparente foi significativamente reduzida em ambos os polens (52 e 59% para os polens *Jarra* e *Marri*, respectivamente), comparada com o valor de caseína (89%). É provável que a estrutura protetora da parede celular do pólen represente uma barreira às enzimas digestivas, dificultando a digestão dos constituintes do pólen.

Embora os autores supracitados considerem que a baixa digestibilidade possa ser um fator limitante no emprego de pólen apícola na alimentação humana, alguns aspectos devem ser levados em consideração. O estudo não é conclusivo, uma vez que a qualidade protéica foi avaliada em apenas duas amostras de polens monoflorais, distintas do pólen polifloral empregado na alimentação humana. O método de avaliação da qualidade protéica, ainda que em uso na época do estudo (1983), tem sido atualmente substituído pela digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAAS) (Schaafsma, 2005), mais indicado para avaliação das proteínas de origem vegetal. Ademais, à luz dos novos conceitos de nutrição, a baixa disponibilidade de certos alimentos, associada à digestibilidade intermediária pode ser considerada atributo e não necessariamente uma característica negativa, diante da tendência atual de uma dieta rica em alimentos processados, prontamente disponíveis e com alta densidade energética.

Os resultados obtidos para os açúcares confirmam a predominância de açúcares redutores no pólen apícola, sendo que a frutose (12,59 a 23,62 g/100g) foi encontrada em níveis mais elevados que a glicose (6,99 a 21,85 g/100g) em todas as amostras. Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997)

encontraram valores de frutose variando de 15,20 a 22,40 g/100g e glicose entre 10,86 e 17,90 g/100g para amostras de pólen apícola da Espanha, que estão próximos aos obtidos neste estudo. Num estudo de pólen apícola com amostras da Polônia, Coréia do Sul e China (Szczesna, 2007), os valores variaram entre 15,51 a 19,22 g/100g, 12,09 a 22,06 g/100g e 9,74 a 17,90 g/100g, respectivamente para frutose. Para glicose, os valores foram 9,85 a 14,29 g/100g, 9,94 a 20,06 g/100g e 8,45 a 15,10 g/100g. Em outro estudo, Qian et al., (2008) determinaram os níveis de açúcares presentes em cinco amostras de pólen apícola provenientes de Israel (n=1), China (n=1), Romênia (n=1) e Espanha (n=2), tendo encontrado os seguintes valores médios para frutose: 15,9; 17,5; 16,0; 18,6 e 19,6 g/100g e para glicose: 8,2; 13,1; 11,0; 12,1 e 12,2 g/100g, respectivamente.

O grupo dos carboidratos, que inclui açúcares, amido e fibra dietética, representa o principal constituinte das amostras de pólen apícola. Segundo Human e Nicholson (2006), grande parte dos carboidratos do pólen apícola é proveniente do néctar ou do mel com o qual o pólen floral é misturado pela manipulação das abelhas para formar o fluido que agrega as bolotas de pólen. Por consequência, o pólen apícola sempre contém grandes quantidades de açúcares redutores, o que foi confirmado pelos resultados observados no presente estudo, sendo a soma de glicose e frutose em média 34 g/100g.

Frutose, glicose e sacarose são os açúcares livres presentes em maiores concentrações no pólen apícola. Existem ainda menores proporções dos dissacarídeos maltose, isomaltose, trealose e os trissacarídeos melezitose, erlose e rafinose (Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997). Um estudo recente sugere também a presença do tetrassacarídeo estaquiose em amostras de pólen de Israel, China, Romênia e Espanha (Qian et al., 2008). Observa-se predominância da frutose em relação à glicose. Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997 encontraram um índice frutose/glicose (F/G) variando de 1,13 a 1,53 em amostras de pólen espanhol, enquanto Qian et al. (2008) obtiveram

valores de 1,53 e 1,66 para duas amostras de pólen espanhol e de 1,94; 1,33 e 1,45 para amostras colhidas em Israel, China e Romênia, respectivamente. No presente trabalho este índice variou de 1,01 a 2,24, com um valor médio de $1,31 \pm 0,21$.

A razão F/G no mel de abelhas geralmente varia entre 1,03 a 1,54 (Perez-Arquillué et al., 1995; Ishayek e Kern, 2006). Esta razão tem sido relacionada com o índice glicêmico (Ishayek e Kern, 2006), descrito como a medida do efeito que os alimentos exercem sobre os níveis sanguíneos de glicose. O índice glicêmico foi desenvolvido com a finalidade de classificar os alimentos para aplicações práticas, como o tratamento do diabetes mellitus (Jenkins et al., 1981). Acredita-se que a elevada razão F/G seja uma das razões para o baixo a moderado índice glicêmico das variedades de mel (Foster-Powell et al., 2002). São necessários estudos futuros para se conhecer os valores de índice glicêmico do pólen brasileiro, especialmente aqueles com os maiores valores de razão F/G, como encontrados, no presente trabalho, em duas amostras, sendo uma de SE (2,24) e outra de SC (2,10).

Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos para os teores dos aminoácidos livres em 22 amostras de pólen apícola de 5 regiões brasileiras estudadas. As faixas foram: prolina, 481 a 2557mg/100g, serina, 52 a 307 mg/100g, fenilalanina, 7 a 270 mg/100g, arginina 9 a 241 mg/100g, leucina, 1 a 181 mg/100g, histidina, 7 a 157 mg/100g, alanina, 31 a 153 mg/100g, tirosina, 2 a 148 mg/100g, ácido glutâmico, 0 a 144 mg/100g, lisina, 8 a 100 mg/100g, ácido aspártico, 11 a 80mg/100g, triptofano, 0 a 61 mg/100g, metionina, 0 a 51 mg/100g, isoleucina, 2 a 45 mg/100g, valina, 6 a 38 mg/100g e glicina, 4 a 31 mg/100g. Treonina e cistina não foram detectados em nenhuma das amostras. Digna de nota é a grande amplitude de resultados encontrada nas amostras analisadas e também observada por Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997.

O aminoácido livre que ocorreu em maior concentração média nas amostras estudadas foi a prolina (1071 mg/100g, 57 % do total), seguido por serina (162 mg/100g, 8 % do total). Serra

Bonvehí e Escolà Jordà (1997) encontraram teores de prolina entre 1631 e 2360 mg/100g (média de 1967 mg/100g), correspondendo em média a 63,1% do total de aminoácidos livres de pólen espanhol, concordantes com os valores obtidos neste estudo (57%). Num outro estudo realizado com amostras de pólen espanhol, Paramás et al. (2006) encontraram valores médios de 2027 mg/100g de prolina, correspondente a 66% do total de aminoácidos livres. Baldi Coronel (2004) obtiveram teores de prolina numa faixa de 230 a 2430 mg/100g (média de 1264 mg/100g) em amostras de pólen argentino.

Tabela 5.

Composição em aminoácidos livres em amostras pólen apícola (n=22) coletadas no período de 2007 a 2008.

Aminoácidos Livres (mg/100g)						
Aminoácido	São Paulo (n=5) (mín.-máx.)	Santa Catarina (n=6) (mín.-máx.)	Bahia (n=3) (mín.-máx.)	Sergipe (n=3) (mín.-máx.)	Espírito Santo (n=3) (mín.-máx.)	Distrito Federal (n=2) (mín.-máx.)
Ácido aspártico	25,5±16,7 (10,7-51,6)	27,8±16,5 (14,7-55,9)	30,9±3,0 (27,5-33,3)	43,9±19,2 (24,3-62,7)	41,8±14,4 (27,3-56,1)	61,0±27,2 (41,8-80,2)
Treonina	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd
Serina	130,4±62,0 (51,7-212,6)	98,2±25,7 (69,3-141,8)	230,6±44,8 (199,8-281,9)	251,3±77,9 (161,7-302,4)	128,5±26,1 (106,5-157,4)	243,9±88,8 (181,1-306,7)
Ácido glutâmico	25,0±23,5 (32,5-44,0)	50,3±49,4 (0-119,9)	73,1±33,8 (47,3-111,3)	41,6±16,9 (0-53,5)	20,7±17,4 (0-51,8)	142,7±2,4 (141,0-144,3)
Prolina	1272,1±778,3 (577,5-2557,4)	1139,1±651,6 (481,2-2305,6)	522,7±48,1 (486,8-577,3)	811,9±323,6 (512,9-1155,4)	1262,4±313,6 (1054,6-1109,6)	1285,0±60,9 (1242,0-1328,0)
Glicina	10,6±3,2 (7,3-15,7)	3,5±2,9 (0-6,9)	19,3±3,0 (15,9-21,4)	26,4±5,5 (20,5-31,4)	11,7±4,8 (7,5-17,0)	7,7±0,3 (7,4-7,9)
Alanina	88,3±42,9 (31,1-140,7)	56,0±13,3 (41,8-72,6)	87,7±18,8 (71,9-108,5)	131,5±21,9 (108,9-132,8)	79,3±42,0 (53,4-127,8)	59,4±17,9 (46,7-72,0)
Cisteína	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd
Valina	23,7±10,5 (5,9-30,7)	11,1±4,5 (6,0-18,4)	23,2±6,3 (18,8-30,4)	32,0±7,6 (23,6-38,4)	15,5±12,4 (6,7-29,8)	24,3±2,9 (22,2-26,3)
Metionina	13,1±14,6 (8,7-31,4)	3,3±4,7 (0-9,8)	5,9±3,6 (3,1-10,0)	25,2±25,4 (0-50,9)	5,9±10,2 (0-17,7)	Nd
Isoleucina	10,3±5,1 (3,0-16,2)	8,5±5,9 (0-17,2)	11,4±9,8 (5,4-22,5)	31,4±18,9 (9,9-45,4)	12,1±14,6 (2,0-28,8)	7,8±1,5 (6,8-8,8)
Leucina	81,4±50,9 (5,5-125,8)	62,9±53,3 (16,2-149,0)	14,2±6,5 (6,8-18,8)	108,9±64,9 (92,2-180,6)	47,7±74,1 (1,3-133,1)	3,9±0,4 (3,6-4,2)
Tirosina	34,5±24,3 (4,6-62,9)	36,8±25,8 (10,0-83,0)	27,2±7,7 (18,4-32,0)	94,1±50,1 (48,9-148,0)	29,2±44,2 (2,2-80,2)	11,2±9,6 (4,3-18,0)
Fenilalanina	52,8±36,1 (19,0-107,8)	58,2±29,3 (13,0-84,4)	49,3±26,7 (18,7-67,6)	165,5±96,6 (79,2-269,9)	38,3±43,9 (11,6-88,9)	15,6±12,1 (7,1-24,2)
Lisina	66,2±23,7 (39,7-100,1)	60,3±12,9 (43,4-83,0)	34,3±22,8 (17,6-60,2)	57,5±16,2 (44,4-75,6)	41,3±43,0 (8,7-90,0)	26,7±26,3 (8,1-45,3)
Histidina	27,7±10,3 (17,3-40,1)	42,3±22,7 (7,5-68,9)	95,6±12,5 (81,6-105,5)	139,2±20,4 (117,2-157,4)	22,8±5,0 (17,2-26,7)	43,2±7,0 (38,2-48,1)
Triptofano	12,9±27,1 (3,2-61,4)	0,3±0,8 (0-2)	0,5±0,9 (0-1,5)	0,5±0,9 (0-1,5)	14,0±24,2 (0-41,9)	9,6±13,6 (0-19,2)
Arginina	136,6±92,6 (46,1-241,4)	42,7±20,2 (9,4-63,9)	27,2±15,7 (9,2-38,0)	30,6±1,8 (29,2-32,6)	48,9±3,8 (44,5-51,5)	77,6±66,1 (30,8-124,3)
Total	2038,2±1224,3 (1415,3-3418,4)	1719,5±715,3 (928,7-2931,4)	1271,6±26,5 (1250,0-1301,1)	2003,3±408,3 (1765,0-2474,7)	1834,6±334,6 (1448,1-2035,0)	2039,2±136,1 (1942,9-2135,5)

Considera-se que o perfil de aminoácidos livres presentes no pólen apícola seja dependente de fatores internos e externos. O principal fator interno é a composição das espécies vegetais das quais o pólen é obtido (Collin et al., 1995). Entre os fatores externos estão: as condições de aquecimento empregadas no processo de desidratação e as condições de armazenamento (Collin et al., 1995; Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997). Quando a temperatura de desidratação é excessivamente alta e o processo é muito longo, ocorre uma redução no conteúdo de aminoácidos livres (Collin et al., 1995) levando a um aumento no teor médio de prolina (>80%). Por outro lado, quando o processo de secagem é realizado corretamente o conteúdo de aminoácidos livres permanece alto e o teor médio de prolina em relação aos aminoácidos livres totais é menor que 65% (Gilliam et al., 1980; Serra Bonvehí et al., 1986; Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997). Durante o armazenamento do pólen ocorre a perda de um pequeno conteúdo de aminoácidos livres (0,15 g/100g/mês) à temperatura ambiente (18-22°C), no escuro (Serra Bonvehí et al., 1986). Simultaneamente ocorre o processo de biossíntese de prolina à partir do ácido glutâmico, influenciado pela presença e a atividade da enzima glutamato desidrogenase que converte ácido glutâmico em prolina (Gilliam et al., 1980; Serra Bonvehí et al., 1986; Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997). Assim, o processo de biossíntese de prolina a partir do ácido glutâmico aliado à perda de aminoácidos livres durante o armazenamento determina um aumento progressivo da taxa de prolina no conteúdo total de aminoácidos livres durante o armazenamento do pólen apícola. Serra Bonvehí e Escolà Jordà (1997) propuseram a relação entre o conteúdo de prolina e o teor de aminoácidos livres totais como indicadora da idade do pólen e do seu estado de conservação. No presente estudo, este índice médio foi de $57 \pm 14,2$ % em 22 amostras, oscilando entre 29 e 80%, valores indicativos de pólen apícola corretamente processado.

Os teores de aminoácidos livres, assim como o conteúdo de açúcares também estão relacionados com as características sensoriais do pólen apícola (Collin et al., 1995). Collin et al. (1995) observaram que produtos da reação de Maillard e derivados sulfurados são produzidos durante aquecimento do pólen apícola a 40 e 60°C. Essa produção é diretamente proporcional ao conteúdo inicial de aminoácidos livres e de aminoácidos sulfurados.

3.3. Agrupamentos hierárquicos e componentes principais

A HCA possibilitou o agrupamento das amostras por similaridade, representado no dendograma da Figura 2. Observa-se que as amostras procedentes do DF, MG, PI e CE apresentam baixa similaridade, enquanto que as amostras de SC e RS apresentam alta similaridade em relação aos parâmetros físico-químicos analisados. Já as amostras do PR, SP e ES e as amostras procedentes de SE, MT e BA formam outros grupos de similaridade.

A análise estatística mostrou que o resultado da acidez foi o que apresentou a maior variação entre amostras da mesma região, enquanto que as outras propriedades do pólen apícola (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, glicose e frutose) apresentaram uma baixa dispersão de dados entre amostras de uma mesma região.

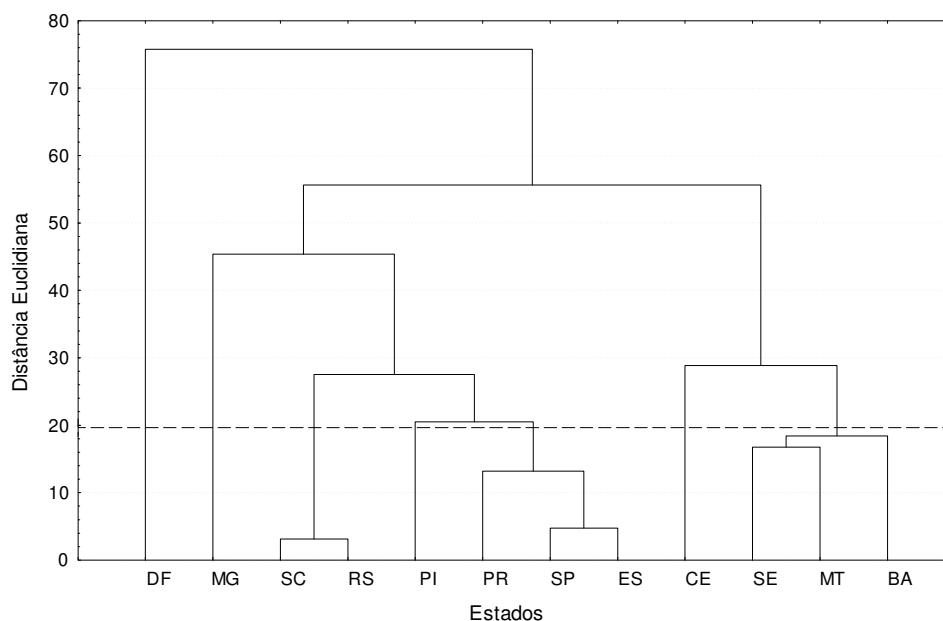


Fig. 2. Dendrograma obtido a partir da composição físico-química de 154 amostras de pólen apícola desidratado procedente de 11 estados brasileiros e o Distrito Federal.

A ACP, representada na Figura 3 permite visualizar quais parâmetros da composição centesimal foram importantes para obter os agrupamentos das regiões em função da composição química das amostras de pólen apícola. As amostras das regiões de SP e DF foram agrupadas pela composição dos açúcares glicose e frutose. As amostras de CE, SE, BA e PI pela composição em proteínas e cinzas. As amostras de pólen da região de MT foram caracterizadas pela umidade e acidez. O teor de lipídeos foi importante principalmente para a separação das amostras do estado de PR.

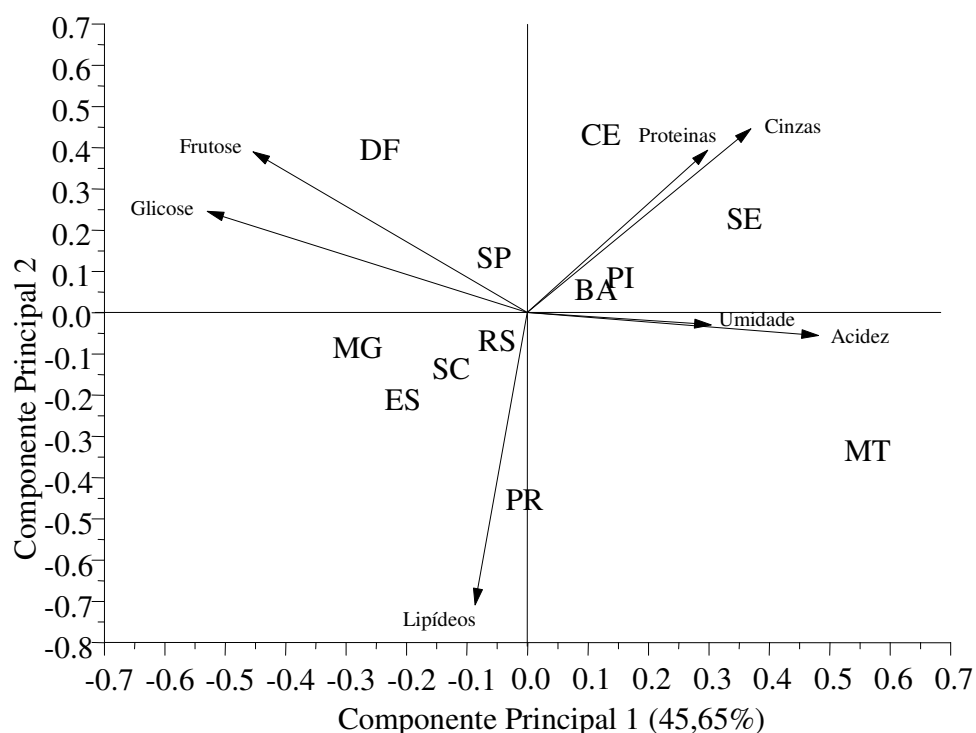


Fig. 3. Componente principal 1 versus componente principal 2 obtidos a partir da composição físico-química de 154 amostras de pólen apícola desidratado procedente de 11 estados brasileiros e o Distrito Federal.

4. Conclusões

O método de determinação de umidade usando a titulação Karl Fisher pode ser aplicado a amostras de pólen apícola desidratado com boa precisão e exatidão, desde que sejam estabelecidas as condições analíticas adequadas, como a granulometria das amostras de pólen. Além disso, os resultados obtidos pela titulação Karl Fisher são comparáveis aos obtidos pelo método gravimétrico tradicional, utilizando estufa à vácuo a 70°C. Apesar de exigir investimento

no equipamento e reagentes, a titulação Karl Fisher pode ser uma alternativa rápida e prática ao método convencional.

A composição química obtida para as amostras do pólen apícola desidratado mostrou uma grande variação entre os diferentes estados estudados, compatível com o grande número de fatores que interferem na composição deste produto.

As amostras de pólen apícola desidratado analisadas apresentaram teores de umidade superiores aos exigidos pela legislação brasileira o que aponta para a dificuldade dos apicultores em obter um produto que satisfaça às suas exigências, especialmente entre os produtores dos estados de MT, PI, SE e BA. Os dados obtidos neste trabalho poderão ser úteis para uma revisão da legislação brasileira, especialmente com respeito aos valores exigidos de umidade e acidez livre em pólen apícola com o objetivo de atualizar o padrão de identidade e qualidade de pólen apícola desidratado nacional.

Os teores expressivos de proteínas, lipídeos e aminoácidos essenciais encontrados nas amostras de pólen apícola podem justificar seu uso na alimentação humana desde que um controle efetivo de sua qualidade seja assegurado.

Visto que o pólen apícola nacional apresentou razão frutose/glicose igual ou superior à do mel e compatível com produtos de moderado a baixo índice glicêmico, seria recomendável a investigação do seu índice glicêmico em estudos futuros.

O perfil de aminoácidos livres avaliado em 22 amostras apresentou predominância em prolina, conforme esperado para pólen apícola. A relação entre o conteúdo de prolina e o teor de aminoácidos livres totais, obtida nestas amostras foi indicativa de pólen apícola corretamente processado.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP, ao CNPq e ao UNASP pelo financiamento concedido.

Referências

- Almarz-Abarca, N., Campos, M.G., Ávila-Reyes, J.A., Naranjo-Jiménez, N., Corral, J.H., González-Valdez, L.S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 119-124.
- Almeida-Muradian, L.B. (2006). Controle de qualidade do pólen apícola desidratado. In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura. II Congresso Brasileiro de Melinoponicultura Aracaju: SEBRAE.
- Almeida-Muradian, L.B., Panplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 105-111.
- Baldi Coronel, B., Grasso, D., Pereira, S.C., Fernández, G. (2004). Caracterización bromatológica del pólen apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnologia* 29, 145-181.
- Barreto, L.M.R.C., Funari, S.R.C., Orsi, R.O. (2005a). Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do distrito federal. *Boletim de Indústria Animal* 62, 167-175.
- Barreto, L.M.R.C., Funari, S.R.C., Orsi, R.O. (2005b). Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. In *I Congreso de Apicultura del Mercosur*. Punta del Este: Uruguay. Retrieved dec 01, 2009 from <http://www.culturaapicola.com.ar>

- Bastos, D.H.M., Barth, O.M., Rocha, C.I., Cunha, I.B.S., Carvalho, P.O., Torres, E.A.S., Michelin, M. (2004). Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) loads in the state of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil. *Journal of Apicultural Research* 43, 35 – 39.
- Bastos, D.H.M., Rocha, C.I., Cunha, I.B.S., Carvalho, P.O., Torres, E.A.S. (2003). Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 62, 239-244.
- Bell, R.R., Thornber, E.J., Seet, J.L.L., Groves, M.T., Ho, N.P., Bell, D.T. (1983). Composition and protein quality of honeybee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. *Journal of Nutrition* 113, 2479-2484.
- Burgner, E., Feinberg, M. (1992). Determination of mono and disaccharides in foods by interlaboratory study: Quantitation of Bias components for liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 75, 443-464.
- Campos, M.G.R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L.B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Christian, F., Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research* 47, 154-161.
- Carpes, S.T. (2008). *Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de Apis mellifera L. da região sul do Brasil*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Parana, Brasil.
- Codigo Alimentario Argentino. (1998). Buenos Aires, Argentina: La Canal y Asociados.
- Collin, S., Vanhavre, T., Bodart, E., Bouseta, A. (1995). Heat treatment of pollens: Impact on their volatile flavor constituents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43, 444-448.
- Foster-Powell, K., Holt, S.H., Brand-Miller, J.C. (2002). International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *American Journal of Clinical Nutrition* 76, 5-56.

- Funari, S.R.C., Rocha, H.C., Sforcin, J.M., Filho, H.G., Curi, P.R., Gomes Dierckx, S.M.S., Funari, A.R.M., Orsi, R.O. (2003). Composições bromatológica e mineral de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 11, 88-93.
- Gergen, I., Radu, F., Bordean, D., Isengard, H-D. (2006). Determination of water content in bee's pollen samples by Karl Fisher titration. *Food Control*, 17, 176-179.
- Gilliam, M., Mccaughey, W.F., Wintermute, B. (1980). Amino acids in pollens and nectars of citrus cultivars and in stored pollen and honey from noneybee colonies in citrus give. *Journal of Apicultural Research*, 19, 64-72.
- Gonzalez, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Jiménez, M. (2005). Occurence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology* 105, 1-9.
- Heinze, P., Isengard, H.D. (2001). Determination of water content in different sugar syrups by halogen drying. *Food Control* 12, 483-486.
- Herbert Jr, E.W., Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. *Apidologie* 9, 33-40.
- Horwitz, W. (Ed.) (2006). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th Ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, cap. 44, met. 962.19, p. 37.
- Human, H., Nicholson, S.W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Alloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67, 486-1492.
- Isengard, H.D. (2001). Water content, one of the most important properties of food. *Food Control* 12, 395-400.
- Ishayek, J.I., Kern, M. (2006). US honey varying in glucose and fructose content elicit similar glycemic indexes. *Journal of the American Dietetic Association* 106, 1260-1262.

- Jenkins, D.J.A., Wolever, T.M.S., Taylor, R.H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J.M., Bowling, A.C., Newman, H.C., Jenkins, A.L., Goff, D.V. (1981). Glycemic index of foods: A Physiological basis for carbohydrate exchange. *American Journal of Clinical Nutrition* 34, 362-366.
- Jodral, M., Fernández, C., Bentabol, A., Liñán, E. (1992). El pólen apícola com substrato para la producción de aflatoxinas. *Alimentaria* 236, 67-69.
- Kroyer, G., Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emergengy Technologie* 2, 171-174.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekonska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry* 100, 237-240.
- Linskens, H.F., Jorde, W. (1997). Pollen as food and medicine – a review. *Economic Botany* 51, 78-87.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2001). *Regulamento técnico para fixação de qualidade e identidade do pólen apícola*. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Publicado no DOU de 23/01/01, Seção 1, p. 18-23.
- Marchini, L.C., Reis, V.D.A., Moreti, A.C.C.C. (2006). Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Ciência Rural* 36, 949-953.
- Medina, Á., González, G., Sáez, J.M., Mateo, R., Jiménez, M. (2004). Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 261-267.

- Modro, A.F.H., Message, D., da Luz, C.F.P., Meira Neto, J.A.A. (2007). Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42, 1057-1065.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Myoda, T., Nagashima, T. (2005). Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen *Cistus ladaniferus*. *International Journal of Molecular Medicine* 15, 259-263.
- O'Rourke, M.K., Buchmann, S.L. (1991). Standardized pollen analytical techniques used for various bee collected samples. *Environmental entomology* 20, 507-513.
- Orzáez Villanueva, M.T., Díaz Marquina, A., Bravo Serrano, R., Blazquez Abellán, G. (2002). The importance of bee collected pollen in the diet: a study of its composition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 53, 217-224.
- Paramás, A.M.G., Bárez, J.A.G., Marcos, C.C., Garcia-Villanova, R.J., Sánchez, J.S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry* 95, 148-156.
- Pereira, F.M., Freitas, B.M., Vieira-Neto, J.M., Lopes, M.T.R., Barbosa, A.L., Camargo, R.C.R. (2006). Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 1-7.
- Perez-Arquillué, C., Conchello, P., Ariño, A., Juan, T., Herrera, A. (1995). Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chemistry* 54, 167-172.
- Qian, W.L., Khan, Z., Watson, D.G., Fearnley, J. (2008). Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 78-83.

- Rabie, A. L., Wells, J. D., Dent, L. K. (1983). The nitrogen content of pollen protein. *Journal of Apicultural Research* 22, 119-123.
- Schaafsma, G. (2005). The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)-a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 88, 988-994.
- Schimdt, J.O., Buchmann, S.L. (1993). Other products of hive. In: Grahan, J.M. (Ed.). *The hive and the honeybee*. Hamilton: Dadant & Sons, 927-988.
- Serra Bonvehí, J. (1988). Plant origin of honeybee-collected pollen produced in Spain. *Anales Asociación Palinologia Lengua Espanhola* 4, 73-78.
- Serra Bonvehí, J., Lopez Alegret, P. (1986) Études microbiologiques du pollen d'abeilles. *Revue Française d'Apiculture* 79, 259-266.
- Serra Bonvehí, J., Escolà Jordà, R. (1997). Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 45, 725-732.
- Serra Bonvehí, J., Gonell Galindo, J., Gomez Pajuelo, A. (1986) Estudio de la composición y características físico-químicas del pólen de abejas. *Alimentaria* 176, 63-67.
- Serra Bonvehí, J., Marti Casanova, T. (1987). Estudio analítico para determinar la humedad del pólen. *Anales de Bromatologia* 39, 339-349.
- Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Barbosa-Filho, J.M., Silva, E.M.S., Freitas, B.M., Santos, F.A.R. dos.(2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 507-511.
- Souza, R.C.S., Yuyama, L.K.O., Aguiar, J.P.L., Oliveira, F.P.M. (2004). Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazônica* 34, 333-336.

- Spackman D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Biochemistry* 30, 1190-1206.
- Szczesna, T. (2006a). Long-chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science* 50, 65-78.
- Szczesna, T. (2006b). Protein content and amino acids composition of bee-collected pollen originating from Poland, South Korea and China. *Journal of Apicultural Science* 50, 91-98.
- Szczesna, T. (2006c). Protein content and amino acids composition of bee-collected pollen originating from selected botanical origins. *Journal of Apicultural Science* 50, 81-90.
- Szczesna, T. (2007). Study on the sugar composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science* 51, 15-22.
- Tichy, J., Novak, J. (2000). Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridans streptococci. *Journal of Alternative Complement Medicine* 6, 383-389.
- Vieira, S. (1981). Teste t. Análise de variância. In: S. Vieira. *Introdução à bioestatística*; Rio de Janeiro: Campus, 125-137, 141-155.
- Youssef, A.M., Farag, R.S., Ewies, M.A., El-Shakaa, S.M.A. (1987). Chemical studies on pollen collected by honey bees in Giza region, Egypt. *Journal of Apicultural Research* 17, 110-113.
- Zenebon, O., Pascuet, N.S. (coord) (2005). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde/ANVISA; São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- Zerbo, A.C., Moraes, R.L.M.S., Brochetto-Braga, M.R. (2001). Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Molecular Biology* 129, 139-147.

CAPÍTULO 3

Mineral composition of bee pollen collected from eleven Brazilian states

MARCELO A. MORGANO
MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA MARTINS
LUANA C. RABONATO
RAQUEL F. MILANI
KATUMI YOTSUYANAGI
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo submetido à Revista Journal of Food Composition and Analysis

Mineral composition of bee pollen collected from eleven Brazilian states

Marcelo A. Morgano^{a*}, Márcia C. Teixeira Martins^{b,c}, Luana C. Rabonato^a, Raquel F. Milani^a,
Katumi Yotsuyanagi^a, Delia B. Rodriguez-Amaya^c

^aFood Science and Quality Center-CCQA, Food Technology Institute- ITAL, Av. Brasil, 2880, 13070-178 Campinas, SP, Brasil.

^bAdventist University Center of São Paulo-UNASP, Estrada de Itapecerica, 5859, 05858-001 São Paulo, SP, Brasil.

^cDepartment of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6121, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

Running title: Minerals in Brazilian bee pollen.

*Corresponding author. Tel.: 55 19 37431778; fax: 55 19 32424585

E-mail address: morgano@ital.sp.gov.br

ABSTRACT

In this paper the mineral composition in 154 samples of dehydrated bee pollen from 11 Brazilian states and the Federal District, collected during a year was determined. Ten mineral elements were analyzed using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Mean levels were 828 to 4670 mg kg⁻¹ for calcium, 3 to 25 mg kg⁻¹ for copper, 11 to 552 mg kg⁻¹ for iron, 1431 to 9910 mg kg⁻¹ for potassium, 348 to 3621 mg kg⁻¹ for magnesium, 12 to 211 mg kg⁻¹ for manganese, <0.004 to 1466 mg kg⁻¹ for sodium, 2177 to 8165 mg kg⁻¹ for phosphorus, <0.01 to 4.4 mg kg⁻¹ for selenium and 5 to 76 mg kg⁻¹ for zinc. Manganese, selenium, copper, zinc and iron were the elements that showed the greatest contributions to the brazilian recommended daily intake values (RDI), assuming pollen consumption of 25 g day⁻¹, achieving 70%, 37%, 27%, 17% and 15% of RDI, respectively.

Keywords: Bee pollen, minerals, ICP OES, selenium, zinc, iron, dietary reference intakes.

1. Introduction

Increased demand for natural products has drawn apiarists' interest to bee pollen production. A climate favorable to apiculture and a highly diversified flora in Brazil facilitate this kind of activity, which has been stimulated by apiarists' associations (Bastos et al., 2003). Bee pollen is considered a product with high nutritional value, having an approximate composition of 13% to 55% carbohydrates, 10 to 40% proteins, 1 to 20% lipids, 3 to 8% water, minerals (500–3000 mg 100 g⁻¹), resins, vitamins (20–100 mg 100 g⁻¹) and other compounds such as flavonoids (40–3000 mg 100 g⁻¹) and antibiotic substances (Loper et al., 1980; Serra Bonvehí et al., 1986; Jeanne, 1993; Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997; Lengler, 2002; Bogdanov, 2004). Brazilian studies on the macronutrient and micronutrient composition of bee pollen, however, are still limited (Funari et al., 2003; Carpes, 2008).

Pollen collected from a variety of floral sources is required by honeybees to achieve their dietary requirements. Therefore, the final bee pollen composition may vary according to the region or season. Knowledge of the nutritional value and quality of bee pollen produced in different regions may contribute to the choice of the place to install apiaries (Almeida-Muradian et al., 2005; Pereira et al., 2006).

Some mineral elements have already been quantified in bee pollen samples from several countries: potassium (K), phosphorus (P), magnesium (Mg), calcium (Ca), sodium (Na), sulfur (S), iron (Fe), copper (Cu), manganese (Mn), zinc (Zn), chromium (Cr), nickel (Ni), and selenium (Se) (Day et al., 1990; Abreu, 1992; Kump et al., 1996; Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997; Somerville and Nicol, 2002; Baldi Coronel, 2004; Saavedra et al., 2007; Szczesna, 2007; Kalbande et al., 2008).

The main analytical techniques used to determine mineral elements in bee pollen samples are atomic absorption spectrometry (AAS) (Conti and Botrè, 2001; Baldi Coronel, 2004; Szczesna, 2007), electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ET-AAS) (Saavedra et al., 2007), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) (Somerville and Nicol, 2002) and X-ray fluorescence spectrometry (XRF) (Kump et al., 1996).

Baldi Coronel et al., (2004) determined K, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn and Cu by AAS in bee pollen ashes obtained by calcination of samples at 550°C. Szczesna (2007) found in decreasing order the minerals K>Mg>Na>Ca>Fe>Mn>Zn>Cu in bee pollen samples collected in Poland, South Korea and China, after sample mineralization in acid medium using an open microwave-assisted system and quantification by AAS. Somerville and Nicol (2002) used ICP OES to quantify K, P, S, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn and Cu in bee pollen from New South Wales after sample digestion in closed microwave-assisted system. Serra Bonvehí and Escolà Jordà (1997) determined Fe, Ca, Zn, K, Na, Cu, Mg, P and Mn in Spanish bee pollen, also using ICP OES after calcination. Comparing dry and wet digestion, Kump et al. (1996) obtained the best results by ashing the sample in the presence of diluted H₂SO₄ (1:4). These authors used XRF to determine K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb and Pb in bee pollen samples.

Data on mineral elements in Brazilian bee pollen are still insufficient. Therefore, the purpose of this paper was to validate a method using sample digestion in closed microwave-assisted system and quantification by ICP OES, and, using the validated method, analyze bee pollen samples from Brazilian producing regions for the mineral elements Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se and Zn.

2. Materials and methods

2.1. Samples

In this study 154 Brazilian dehydrated bee pollen samples ready for commercialization (dry, clean and packaged products) were directly purchased from apiarian producers of 11 States and the Federal District (Figure 1) during a year. Samples (with weights ranging from 200 and 300 g) were transported to Campinas (usually on the same month of collection) mostly in plastic bags, some in glass vials, during the apiarian production season.

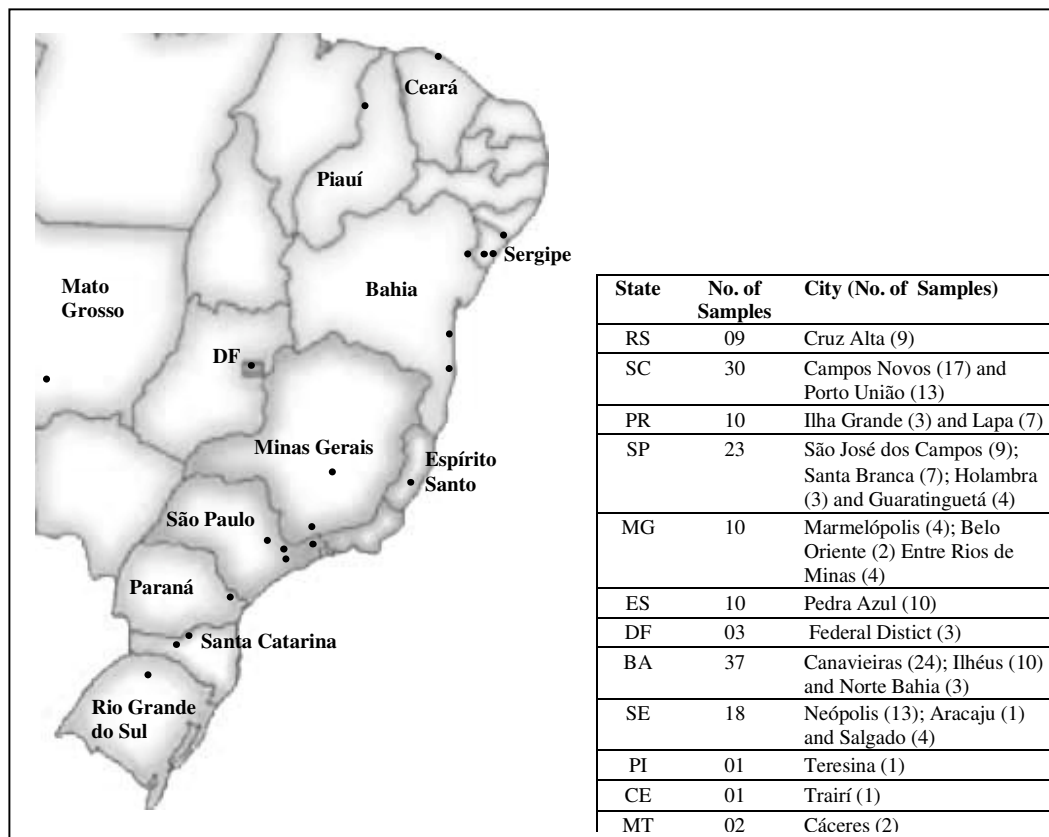


Fig. 1. Localization of bee pollen sample collection areas. Southern states: Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), and Paraná (PR). Southeastern states: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES). Midwestern state: Mato Grosso (MT). Northeastern states: Bahia (BA), Ceará (CE), Piauí (PI), Sergipe (SE). Central region: DF = Federal District.

The samples were all granulated. Immediately after reception, the samples were vacuum sealed using polyamide and polyethylene film to avoid humidity and oxygen absorption, and stored in freezer at -16°C until analyses were undertaken. On the day of analysis, samples were quartered in a stainless steel quartering equipment and ground in a refrigerated mill with tungsten helix (M20, IKA Labortechnik, Staufen, Baden, Ge). Then, samples were sieved using a 30-mesh (600 μm) sieve to standardize pollen particles size.

2.2. Digestion of sample

Digestion was performed in a closed microwave-assisted system with 41 bottles of digestion, using nitric acid and hydrogen peroxide as oxidant medium, with temperature control under pressure in a Milestone equipment, Start D model (Sorisole, Italy), with temperature control sensor. A low pressure rotor with 41 digestion vessels was used.

Between 0.65 and 0.70 g of sample was weighed in the digestion bottle and 10 mL of concentrated nitric acid were added followed by 3 mL of 30% hydrogen peroxide. Table 1 presents the digestion conditions in the microwave system. Once digestion was completed, the bottle's content was transferred to a 25 mL volumetric flask, the volume being completed with a 5% HCl solution (v/v).

Table 1

Operating conditions of the microwave digester for bee pollen sample mineralization.

Parameter	Phase 1 ^a			Phase 2 ^a	
	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 1	Stage 2
Time (min)	20	20	30	20	30
Power (W)	1000	1000	1000	1000	1000
T1 (°C)	140	160	180	180	200
T2 (°C)	110	110	110	110	110

T1 = internal temperature of reaction vessel; T2 = external temperature of reaction vessel.

^aCooling time was 30 min after conclusion of digestion.

2.3. Instrumentation

Quantification of mineral elements was performed by ICP OES, using a Varian Vista MPX model (Mulgrave Victoria, Australia), with axial vision, equipped with a radio frequency (RF) source of 40 MHz, a Charge Coupled Device (CCD-type) simultaneous multi-element solid state detector, a peristaltic pump, a spraying chamber and a sea spray nebulizer. The system was totally controlled by ICP Expert software using 99.996% liquid argon as plasma gas (Air Liquid, SP, Brazil). Operating conditions of the ICP OES equipment are shown in Table 2.

Table 2

Operating conditions of the ICP OES equipment for determining mineral elements in bee pollen.

Parameters	Operating conditions	
RF Power (W)	1000	
Spray flow (L min ⁻¹)	0.9	
Auxiliary argon flow (L min ⁻¹)	1.5	
Main argon flow (L min ⁻¹)	15	
Background correction	2 points	
Integration (s) and reading time (s)	10	
Replicate number	3	
Torch configuration	Axial	
Wavelength (nm)	Ca (317.933)	Mn (257.610)
	Cu (324.754)	Na (589.592)
	Fe (259.940)	P (213.618)
	K (766.491)	Se (196.026)
	Mg (280.270)	Zn (206.200)

2.4. Analytical curves

Stock solutions at 10,000 mg L⁻¹ for Ca, K, Mg, Na (Titrisol – Merck) and P (Qhemis High Purity, Brazil), and at 1,000 mg L⁻¹ for Cu, Fe, Mn, Zn (Merck, Germany) and Se (Qhemis High Purity, Brazil) were used for preparing the standard solutions in 5% HCl v/v. The concentration

ranges of the standard solutions were: 0.005 to 0.5 mg Kg⁻¹ of Cu and Se, 0.05 to 2.5 mg Kg⁻¹ of Fe, Mn and Zn, 0.5 to 15.0 mg Kg⁻¹ of Na, 5.0 to 75.0 mg Kg⁻¹ of Ca, P and Mg, and 25.0 to 150.0 mg Kg⁻¹ of K.

2.5. Evaluation of method performance

Because of the unavailability of a certified reference material for bee pollen, method accuracy was evaluated by recovery tests conducted at two levels, covering the concentration ranges in the samples. LOD and LOQ values were calculated as suggested by Mermet and Poussel (1995). Method precision was evaluated by the coefficient of variation of 8 analytical repetitions.

A certified reference material, NIST 1566a (oyster tissue), was used only to validate analytical control of the laboratory under existing working conditions. Results were assessed by the relative error.

2.6. Statistical analysis

In order to verify if the means obtained for mineral elements of dehydrated bee pollen samples from different states could be considered statistically different at significance level $p < 0.05$, Tukey's multiple comparison test was applied (employing the approach method with different repetition numbers per state) using the software Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

2.7. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA)

Using mean values of each replicate separately, a data matrix (154 x 10) was built, in which samples were put in lines and contents obtained for pollen elements Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, and Zn were put in columns (variables). Data were pre-processed and then submitted to HCA (or Cluster) and PCA methods, using Statistica program version 5.0. The HCA statistical analysis was performed with the purpose of verifying similarities between samples from different states, clustering samples by similarity from the Euclidean distance calculated. HCA results were presented as a bi-dimensional graph called dendrogram. PCA analysis was used to verify which mineral elements were important for the separation of the groups formed.

2.8. Estimation of microelement daily intake

Contribution of mineral elements in bee pollen to dietary intake was estimated according to the recommended daily intake (RDI) values established by Brazilian regulation (Brazilian Ministry of Health, 2005). Potassium and sodium dietary reference intake (DRI) levels were adopted from Institute of Medicine (2004), since the Brazilian regulation does not establish a recommendation for this mineral. To estimate the microelement daily intake, the portion size for bee pollen recommended by Lengler (1999) was used, which is 25 g (approximately three tablespoons) for adults.

3. Results and discussion

3.1. Method performance

Sample digestion using a microwave-assisted closed system allowed quantification of the mineral elements Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se and Zn in a single sample preparation. The residual carbon content was $3.70 \pm 0.60 \text{ mg kg}^{-1}$, indicating low level of organic matter after sample digestion. The time spent to digest the samples was approximately 120 min.

Table 3 shows the characteristics of the analytical method. The method exhibited good performance, confirmed by r values close to 1, LOD and LOQ with appropriate sensitivity to determine the minerals, and satisfactory CV at the detection levels achieved.

Table 3

Performance characteristics of the method for determining bee pollen mineral elements.

Element	λ (nm)	r	Sensitivity (L mg ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	CV (%)
Ca	317.933	0.9999	6154	0.001	0.003	5.6
Cu	324.754	1.0000	10038	0.003	0.01	1.7
Fe	259.94	0.9998	3553	0.001	0.03	1.7
K	766.491	0.9952	36867	0.006	0.03	2.7
Mg	280.27	0.9954	19559	0.0001	0.001	1.5
Mn	257.61	0.9998	54038	0.0001	0.0004	7.0
Na	589.592	0.9992	194263	0.004	0.02	3.5
P	213.618	0.9998	135	0.009	0.04	2.5
Se	196.026	0.9995	47	0.01	0.07	13.5
Zn	206.2	0.9999	344	0.004	0.02	2.3

λ = wavelength values, r = coefficient of correlation, LOD = limit of detection, LOQ = limit of quantification, CV = coefficient of variation.

Results obtained for recovery are shown in Table 4, which were within the range of 70 to 106%, mostly close to 100%, indicating adequacy of the analytical method.

Table 4

Mean recovery percentages obtained for the elements studied.

Element	Fortification level (mg L ⁻¹)	Level found ^a (mg L ⁻¹)	Recovery (%)
Ca	20.05	21.22 ± 0.21	106
	31.00	29.63 ± 1.17	96
Cu	0.10	0.085 ± 0.006	85
	0.15	0.130 ± 0.001	87
Fe	0.10	0.093 ± 0.015	94
	1.00	0.977 ± 0.192	98
K	20.05	17.60 ± 0.00	86
	36.00	35.06 ± 4.47	97
Na	2.00	1.808 ± 0.000	90
	4.00	3.400 ± 0.623	85
Mg	30.00	21.16 ± 0.00	71
	50.00	40.18 ± 0.00	80
P	25.00	25.20 ± 5.27	94
	40.00	37.58 ± 0.85	94
Mn	0.80	0.642 ± 0.000	80
	1.00	0.730 ± 0.000	73
Se	0.01	0.007 ± 0.000	70
	0.10	0.102 ± 0.002	102
Zn	0.80	0.822 ± 0.025	103
	1.00	0.920 ± 0.127	92

^aMean values obtained from 3 replicates.

The results obtained in the laboratory analytical control evaluation, using the oyster tissue NIST 1566a certified reference material, under the same preparation conditions for bee pollen

samples, are shown on Table 5. Except for calcium and copper, every z-score value was below 2, indicating adequacy of the method. Percent recovery for calcium and copper were between 85 and 106%, indicating that the method was also adequate for these elements. For all elements, relative error was below 8.7%.

Table 5

Comparison of the mineral contents obtained by ICP OES using microwave-assisted digestion and the certified values for the NIST 1566a certified reference material (oyster tissue).

Elements	Results obtained (mg kg ⁻¹)	Certified values (mg kg ⁻¹)	Relative error (%)	Z-score
Calcium	793 ± 15	838 ± 20	5.4	2.25
Copper	67.7 ± 1.2	71.6 ± 1.6	5.4	2.44
Manganese	18.7 ± 0.1	18.5 ± 0.2	1.1	1.00
Selenium	1.88 ± 0.32	2.06 ± 0.15	8.7	1.20
Iron	212.9 ± 1.3	205.8 ± 6.8	3.4	1.04
Magnesium	1100 ± 30	1085 ± 23	1.4	0.65
Sodium	3482 ± 140	3297 ± 530	5.6	0.35
Potassium	6531 ± 156	6520 ± 90	0.2	0.12
Zinc	1420 ± 17	1424 ± 46	0.3	0.09

3.2. Composition of mineral elements in Brazilian bee pollen samples

Mean contents, standard deviations and concentration ranges obtained for the minerals in the 154 dehydrated bee pollen samples from 11 states and the Federal District are shown in Table 6. In general, wide within-state and between-state concentration ranges were obtained, especially for Se, Na and Cu, which had standard deviations higher than the means.

A perusal of the between-state variation shows higher Ca levels in PI, CE, SE, BA and MT samples, while those of SE, CE e PI had higher amounts of P. There was no significant variation of Cu and Mn among the states. Samples from MG and DF had higher levels of Fe, while other states had lower levels but the differences did not reach significant levels. Samples from SE, DF, PI, CE, BA e MT had greater amounts of K e Mg, but for the latter, PR also had higher levels. Samples from BA, SE, CE, RS e MT had higher amounts of Na. The CE samples presented the highest level of Se (4.45 mg/kg), comparable to a single sample from Santa Branca, SP (4.28 mg/kg). Higher levels of Zn were found in samples from PI, CE, SP, SE, BA, RS, DF and MT.

Overall, the states that presented greater amounts of minerals in the bee pollen samples analysed were CE, MT, SE, PI, BA and DF, indicating superior quantities of minerals in bee pollens collected in the Northeastern, Midwestern and Central Brazil. One state from Southeastern Brazil (MG) presented the highest average level of Fe. Nevertheless, it should be emphasized that the interpretation of these data is limited by the small number of samples collected in PI, CE, MT and DF, where bee pollen production was low during the period of the present study.

Table 6

Mineral contents of 154 dehydrated bee pollen samples collected from 11 Brazilian states and the Federal District.

State/Federal District	N		Mineral elements (mg kg ⁻¹)									
			Calcium	Copper	Iron	Potassium	Magnesium	Manganese	Sodium	Phosphorus	Selenium	Zinc
Paraná	10	Mean ± SD	1511±280 ^b	7.75±9.95 ^a	76.6±33.8 ^b	4205±2272 ^{b,c}	1315±827 ^a	46.5±16.8 ^a	17.7±12.0 ^b	4760±909 ^b	0.61±0.92 ^b	38.7±8.8 ^b
		Median	1510	7.13	67.3	3315	1113	45.7	15.8	4456	0.158	39.7
		Interval	1059-2061	3.19-12.12	38.3-131.4	2237-9910	780-3621	22.0-81.5	1.7-33.2	3826-6903	<0.01-2.73	24.0-51.4
Santa Catarina	30	Mean ± SD	1691±376 ^b	10.04±3.34 ^a	72.8±34.5 ^b	4683±1818 ^b	966±337 ^b	74.2±51.8 ^a	15.7±12.6 ^b	4458±1144 ^{b,c}	0.52±0.56 ^b	37.9±7.5 ^b
		Median	1652	9.98	64.8	4235	1011	55.4	12.7	4669	0.28	37.3
		Interval	1039-2569	4.76-18.33	28.7-181.7	1431-8297	348-1633	15.8-210.7	3.1-62.0	2177-6650	<0.01-1.75	23.6-57.6
Rio Grande do Sul	9	Mean ± SD	1838±334 ^b	10.87±2.33 ^a	164±117 ^b	3869±1167 ^b	994±245 ^b	47.0±15.7 ^a	43.7±19.6 ^a	4658±1078 ^b	0.56±0.79 ^b	47.0±6.0 ^a
		Median	1843	10.67	179.0	3831	1037	48.0	46.0	4303	0.33	46.5
		Interval	1417-2527	8.86-16.22	11.1-373.3	1627-6047	614-1299	23.0-75.5	9.8-77.2	3303-6266	<0.01-2.35	39.4-56.3
São Paulo	23	Mean ± SD	1346±336 ^b	9.67±3.85 ^a	94.4±59.4 ^b	4434±1840 ^b	884±215 ^b	71.2±33.9 ^a	29.3±16.5 ^b	4397±909 ^{b,c}	0.53±0.94 ^b	53.6±11.2 ^a
		Median	1334	8.57	75.1	4080	865	55.1	24.3	4444	0.17	52.8
		Interval	828-2001	4.71-20.15	23.8-261.4	2385-7972	466-1456	39.5-155.2	8.7-63.8	2820-5934	<0.01-4.28	36.7-75.8
Minas Gerais	10	Mean ± SD	1401±295 ^b	11.31±6.00 ^a	202±135 ^a	3182±811 ^b	789±303 ^c	40.9±14.6 ^a	15.8±13.9 ^b	3399±747 ^{b,c}	0.31±0.52 ^b	41.1±15.3 ^b
		Median	1396	9.45	182.8	3223	711	40.3	14.2	3319	0.01	37.1
		Interval	1008-2030	4.20-25.40	81.7-551.6	2153-4308	413-1260	20.1-72.0	<0.004-40	2323-4736	<0.01-1.61	26.7-72.9
Espírito Santo	10	Mean ± SD	1814±527 ^b	10.09±1.74 ^a	71.5±16.8 ^b	3509±1235 ^b	915±446 ^b	59.9±34.1 ^a	76.5±84.6 ^a	3257±707 ^{b,c}	0.19±0.40 ^b	40.1±8.8 ^b
		Median	1695	10.37	72.9	3421	932	55.5	50.2	3315	0.01	39.6
		Interval	971-2749	6.88-12.30	39.3-96.0	1980-6014	432-1772	11.9-126.0	10.8-288.0	2312-4083	<0.01-1.31	28.5-51.4
Federal District	3	Mean ± SD	1723±29 ^b	10.19±2.72 ^a	151.9±57.4 ^a	7044±1693 ^a	1384±77 ^a	39.2±16.4 ^a	1.06±1.05 ^c	5078±425 ^b	1.65±1.38 ^b	42.7±0.8 ^a
		Median	1863	10.83	156.4	6428	1388	36.3	1.07	5170	1.22	42.4
		Interval	1389-1917	7.21-12.53	92.4-207.0	5745-8958	1305-1458	24.4-56.9	<0.004-2.11	4615-5459	0.54-3.19	42.1-43.6
Bahia	37	Mean ± SD	3135±746 ^a	9.20±1.80 ^a	47.2±18.9 ^b	5960±1588 ^a	1444±341 ^a	76.4±30.3 ^a	233±301 ^a	5239±744 ^b	0.44±0.70 ^b	51.5±7.8 ^a
		Median	3105	9.01	44.0	5767	1510	72.0	126	5303	0.01	53.2
		Interval	1810-4670	6.31-13.50	20.4-177.0	2908-9602	792-2129	29.1-147.0	29-1466	3808-6353	<0.01-2.56	32.6-73.4
Sergipe	18	Mean ± SD	3479±829 ^a	8.62±2.82 ^a	43.0±11.9 ^b	7376±1123 ^a	1597±222 ^a	48.4±7.8 ^a	89.1±131.2 ^a	6886±980 ^a	0.50±0.50 ^b	52.6±13.2 ^a
		Median	3409	7.75	38.6	7554	1606	48.5	58.3	7229	0.038	54.1
		Interval	2118-4653	6.54-18.24	31.2-80.0	5154-8929	951-1992	28.4-61.2	6.7-597.0	4269-8165	<0.01-1.4	5.1-65.3
Piauí	1	Mean	3724 ^a	10.13 ^a	66.9 ^b	6542 ^a	1627 ^a	140 ^a	3.21 ^c	5778 ^a	0.87 ^b	76.1 ^a
Ceará	1	Mean	3511 ^a	8.85 ^a	38.3 ^b	6413 ^a	1668 ^a	61.8 ^a	84.1 ^a	6439 ^a	4.45 ^a	56.3 ^a
Mato Grosso	2	Mean ± SD	2310±138 ^a	13.0±0.9 ^a	87.5±4.9 ^b	4993±123 ^a	1744±124 ^a	49±3 ^a	42±0 ^a	3691±687 ^b	<0.01	42.6±4.6 ^a
		Interval	2212-2407	12.4-13.6	84.0-91.0	4906-5080	1656-1832	47-51	42-42	3205-4177	<0.01	39.3-45.9
Total	154	General Mean ± SD	2215±984	9.6±3.2	82±69	5089±1981	1179±455	64±35	85±177	4828±1309	0.51±0.78	46.7±11.6
		Median	1878	9.0	60.0	4919	1114	53	34	4773	0.13	46.4
		Interval	828-4670	3.2-25.4	11.1-551.6	1431-9910	348-3621	12-211	<0.004-1466	2177-8165	<0.01-4.45	5.1-76.1

Values with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

Figure 2 illustrates the proportion in percentages of the mean composition of Brazilian bee pollen. K (37%), P (36%), Ca (16%), and Mg (9%) were predominant. Present in lower proportions were Na (0.63%), Fe (0.60%), Mn (0.47%), Zn (0.34%), Cu (0.07%) and Se (0.004 %).

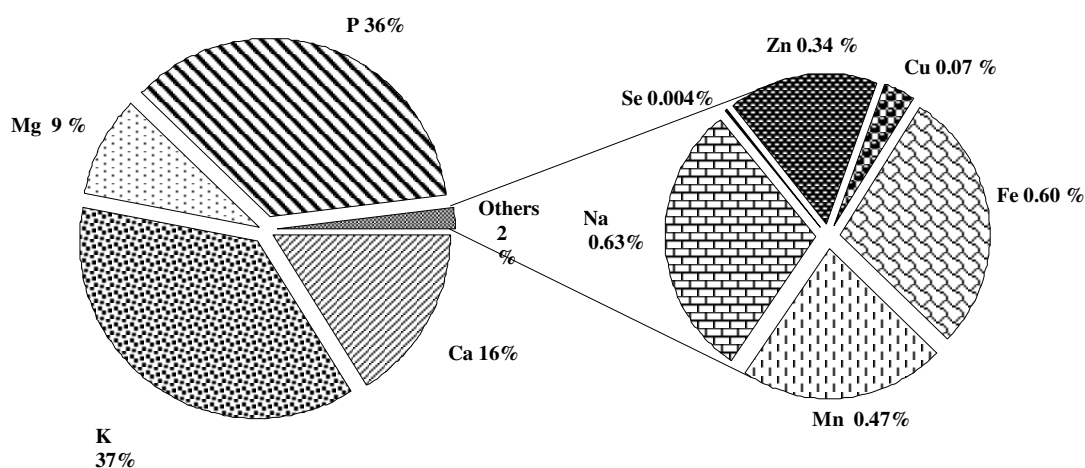


Fig. 2. Graph showing the proportion in percentage of the mean composition of bee pollen samples from 11 Brazilian states and the Federal District.

Variations in bee pollen mineral composition are to be expected since the samples came from several Brazilian regions with different climates and wide diversity of plant species. The chemical composition of pollen is known to vary with the floral origin, including age and nutritional status of the plant and environmental conditions. According to Funari et al. (2003), variations in pollen composition may occur between seasons and years.

Monthly variations of Zn, Cu and Se levels from the same sites in SP (São José dos Campos), SC (Campos Novos), BA (Canavieiras) and SE (Neópolis) are shown in Figure 3. SP is an important trading center for apiculture products. SC and BA are two important producing states in Brazil (Barreto et al., 2005), presenting distinct climatic conditions. SE is a promising producing state because of its environmental conditions which, as in BA, favor bee pollen production during the whole year. Zn, Cu and Se were selected because they are considered antioxidant nutrients.

The SP site, which did not have production from April to July, presented Zn levels between 30 and 40 mg kg⁻¹ from August to November, increasing progressively from December to March, reaching more than 60 mg kg⁻¹. Except for the sample collected in January, which was anomalously low, Zn levels in the SE site remained high throughout the year (above 50 mg kg⁻¹), surpassing 60 mg kg⁻¹ in February to May. In the BA site, which did not have production in June, Zn levels oscillated somewhat with levels above 30 mg kg⁻¹ in July, August and October, and above 50 mg kg⁻¹ in November to May (except for one level above 40 mg kg⁻¹ in March). The lowest Zn levels were found in the SC samples, with all samples except one (in September) below 40 mg kg⁻¹. This site did not have production in January and February, and from May to July.

In the SP site, Cu levels were lower from November to January and above 7 mg kg⁻¹ in February, March, and from August to October. Cu levels in the SE site surpassed 8 mg kg⁻¹ in November and December, but were less than this level in the other producing months. For the BA site, the Cu levels were above 10 mg kg⁻¹ in November and in December, oscillating between 6.5 and 10 mg kg⁻¹ in the other producing months. The SC site reached

the highest (above 15 mg kg⁻¹ in October) and the second highest (above 12 mg kg⁻¹ in December) levels, fluctuating between 4 to 10 mg kg⁻¹ in the other producing months.

Highly variable levels were shown by all sites in relation to Se. The levels in the SP site were insignificant in March and August, very low in December and January, higher (above 0.8 mg kg⁻¹) from September to November, surpassing 1 mg kg⁻¹ in October. The SE site showed greater oscillation, the levels being negligible in May to July and in October and December. Higher variable (above 0.6 mg kg⁻¹) levels were obtained in January to April and August, September and November. Almost all samples collected in the BA site had insignificant levels of Se, except for the ones collected in August and October, the sample from this later month presenting the highest level (above 2 mg kg⁻¹). In the SC site, one sample collected in March presented a higher Se level (1.75 mg kg⁻¹), while other samples had contents below 0.6 mg kg⁻¹.

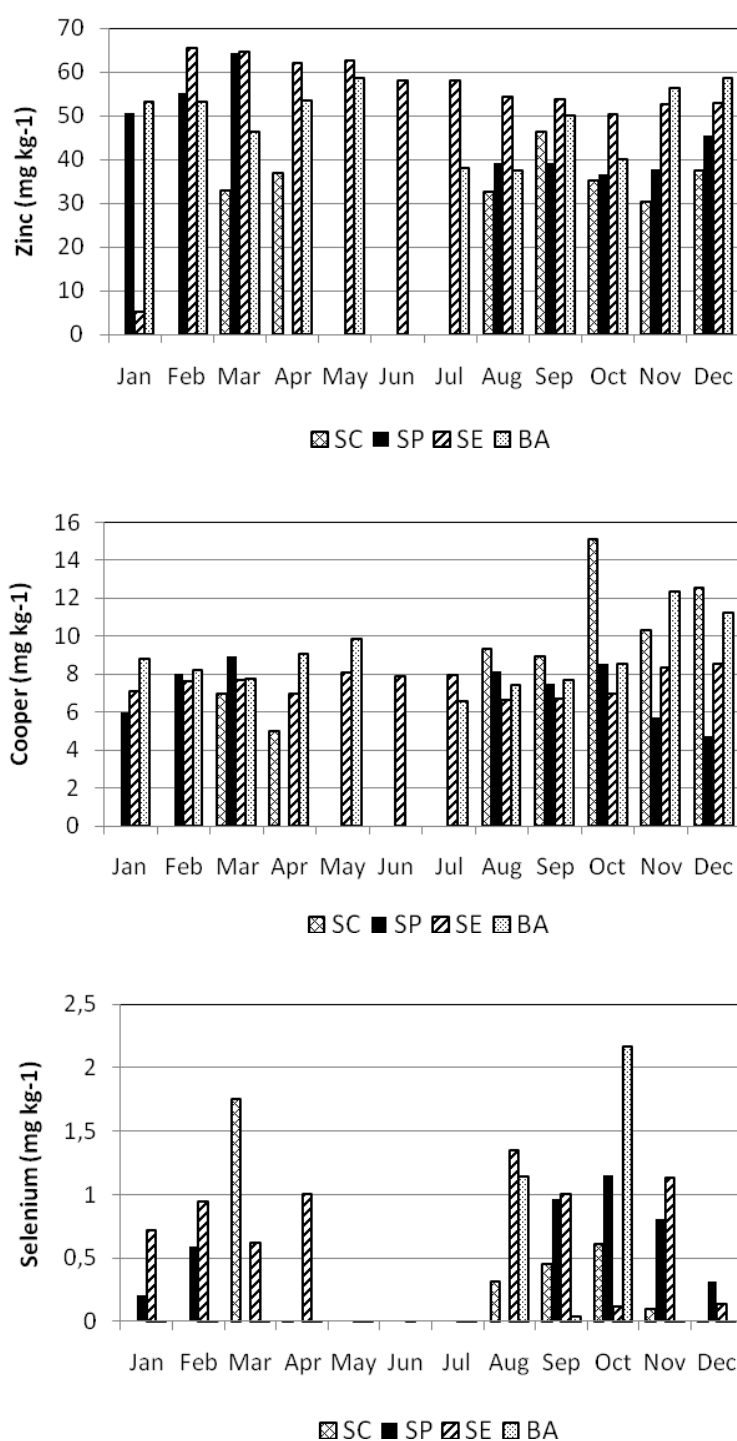


Fig. 3. Monthly variation of zinc, cooper and selenium levels of bee pollen during one year of production from the same sites of the following states: Santa Catarina (SC), São Paulo (SP), Sergipe (SE) and Bahia (BA).

A wide range of K levels was found in the present study (1431–9910 mg kg⁻¹), covering the ranges obtained in Brazilian studies and those of other countries. Funari et al. (2003) and Carpes (2008) found 5900–7200 mg kg⁻¹ and 3722–6364 mg kg⁻¹ K in samples from SP and from PR, SC and RS, respectively. Samples from Spain (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997), Australia (Somerville and Nicol, 2002), Poland, South Korea, China (Szczesna, 2007) and Argentina (Baldi Coronel et al., 2004) presented the following K ranges: 2485–6411 mg kg⁻¹, 2200–3800 mg kg⁻¹, 2843–4854 mg kg⁻¹, 3455–5489 mg kg⁻¹, 4247–5976 mg kg⁻¹, 2263–9784 mg kg⁻¹, respectively.

Phosphorus pollen levels were studied by Serra Bonvehí and Escolà Jordà (1997) who found in Spanish samples values ten times lower (295–854 mg kg⁻¹) than in the present study (2177–8165 mg kg⁻¹). Nevertheless, our results corroborated the ranges found by Somerville and Nicol (2002) for Australian samples (1400–8000 mg kg⁻¹) and Brazilian studies which found ranges of 3900–5000 mg kg⁻¹ and 5648–8865 mg kg⁻¹ in samples from SP (Funari et al., 2003) and from PR, SC and RS (Carpes, 2008).

In the present study, Brazilian pollen samples presented higher Ca levels (828–4670 mg kg⁻¹) than those found in Spanish (253–850 mg kg⁻¹) (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997), South Korean (105–694 mg kg⁻¹) and in some Chinese (181–974 mg kg⁻¹) and Polish (542–1080 mg kg⁻¹) (Szczesna, 2007) samples. Our levels were closer to the ones found in Australian (360–3100 mg kg⁻¹) (Somerville and Nicol, 2002), Argentinian (160–2490 mg kg⁻¹) (Baldi Coronel et al., 2004) and Brazilian (1500–3000 mg kg⁻¹, 292–2149 mg kg⁻¹) (Funari et al., 2003; Carpes, 2008) samples.

Magnesium levels found in present study (348–3621 mg kg⁻¹) covered the levels found in most of the other studies with ranges of 742–1723 mg kg⁻¹ for Polish, 987–1762 mg kg⁻¹ for South Korean, 1126–1893 mg kg⁻¹ for Chinese (Szczesna, 2007), 401–2210 mg kg⁻¹ for Argentinian (Baldi Coronel, 2004), 600–1000 mg kg⁻¹ and 463–1235 mg kg⁻¹ for Brazilian (Funari et al., 2003; Carpes, 2008) samples. Spanish and Australian samples showed some lower Mg levels than found in present study, with ranges between: 273 – 816 mg kg⁻¹ (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997) and 220 – 2700 mg kg⁻¹ (Somerville and Nicol, 2002).

Sodium levels found in the present study (<0.004 – 1466 mg kg⁻¹) tend to be lower than those of Spanish (614–2375 mg kg⁻¹) (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997), Polish (293–2191 mg kg⁻¹) and Chinese pollen (1072–2447 mg kg⁻¹) (Szczesna, 2007), but in agreement with those found in Brazilian (12–636 mg kg⁻¹) (Carpes, 2008), Argentinian (46–554 mg kg⁻¹) (Baldi Coronel et al., 2004), Australian (16–480 mg kg⁻¹) (Somerville and Nicol, 2002) and South Korean (454–1113 mg kg⁻¹) (Szczesna, 2007) samples.

Our Fe and Cu levels have wider ranges (11–552 and 3.2–25.4 mg kg⁻¹), that mostly cover the results obtained in other studies. Fe ranged from 11.1 to 80.3 mg kg⁻¹ (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997), 14 to 520 mg kg⁻¹ (Somerville and Nicol, 2002), 40.4 to 136.1 mg kg⁻¹, 74.3 to 365.9 mg kg⁻¹, 59.0 to 182.3 mg kg⁻¹ (Szczesna, 2007) and 23 to 229 mg kg⁻¹ (Baldi Coronel et al., 2004) in samples from Spain, Australia, Poland, South Korea, China and Argentina, respectively. In Brazilian bee pollen samples from SP (Funari et al., 2003) and PR, SC and RS (Carpes, 2008), Fe levels ranged from 90.7 to 145.0 and 27.9 to 203.3 mg kg⁻¹, respectively.

Cooper ranges of 4–16 mg kg⁻¹ (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997), 5.6–23.9 mg kg⁻¹, 5.3–14.7 mg kg⁻¹, 3.2–10.0 mg kg⁻¹ (Szczesna, 2007) and 6.0–20.0 mg kg⁻¹ (Baldi Coronel et al., 2004) were obtained in samples from Spain, Poland, South Korea, China and Argentina, respectively. Somerville and Nicol (2002) found higher Cu levels (3–42 mg kg⁻¹) in Australian bee pollen. In Brazilian bee pollen samples from SP (Funari et al., 2003) and PR, SC and RS (Carpes, 2008), Cu ranges were 10.0 –18.0 and 4.5–17.8 mg kg⁻¹, respectively.

For Mn, our results (12–211 mg kg⁻¹) tend to be lower than some levels found in some Chinese pollen samples (13.2–429.9 mg kg⁻¹) (Szczesna, 2007), but are mostly in accordance with other work that obtained the following results: 7.4–18.3 mg kg⁻¹ for Spanish samples (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997), 5–110 mg kg⁻¹ for Australian samples (Somerville and Nicol, 2002), 13.3–59.7 mg kg⁻¹ and 25.6–99.4 mg kg⁻¹ (Szczesna, 2007) for Polish and South Korean samples, respectively and 14–57 mg kg⁻¹ (Baldi Coronel et al., 2004) for Argentinian samples. Brazilian samples from SP (Funari *et al.*, 2003) and PR, SC and RS (Carpes, 2008) presented ranges of 19.0–54.8 mg kg⁻¹ and 18.7–129.4 mg kg⁻¹, respectively.

In the present work Zn levels ranged from 41.4–65.3 mg kg⁻¹, with only one sample with a lower level (5.1 mg kg⁻¹). With the exception of this last sample, our results are within the ranges of most studies: 19–81 mg kg⁻¹ for Spanish samples (Serra Bonvehí and Escolà Jordà, 1997), 16–340 mg kg⁻¹ for Australian samples (Somerville and Nicol, 2002), 25.6–53.6 mg kg⁻¹, 23.7–60.7 mg kg⁻¹, 23.9–38.3 mg kg⁻¹ (Szczesna, 2007) for Polish, South Korean and Chinese samples, respectively and 23–106 mg kg⁻¹ (Baldi Coronel et al., 2004)

for Argentinian samples. Brazilian samples from SP (Funari et al., 2003) and PR, SC and RS (Carpes, 2008) had ranges of 48.0–118.0 mg kg⁻¹ and 36.1–82.1 mg kg⁻¹, respectively.

3.3. Hierarchical Cluster and Principal Components

The dendrogram obtained by HCA is shown in Figure 4. Cluster formed among bee pollen samples from the Southern and Southeastern states of SC, RS, PR and SP indicates that these samples are similar in mineral composition. Samples from DF and MT exhibit low similarity. Bee pollen samples from MG and ES also show similarity and samples from the Northeastern region make up another group with similar composition (SE, PI, CE and BA).

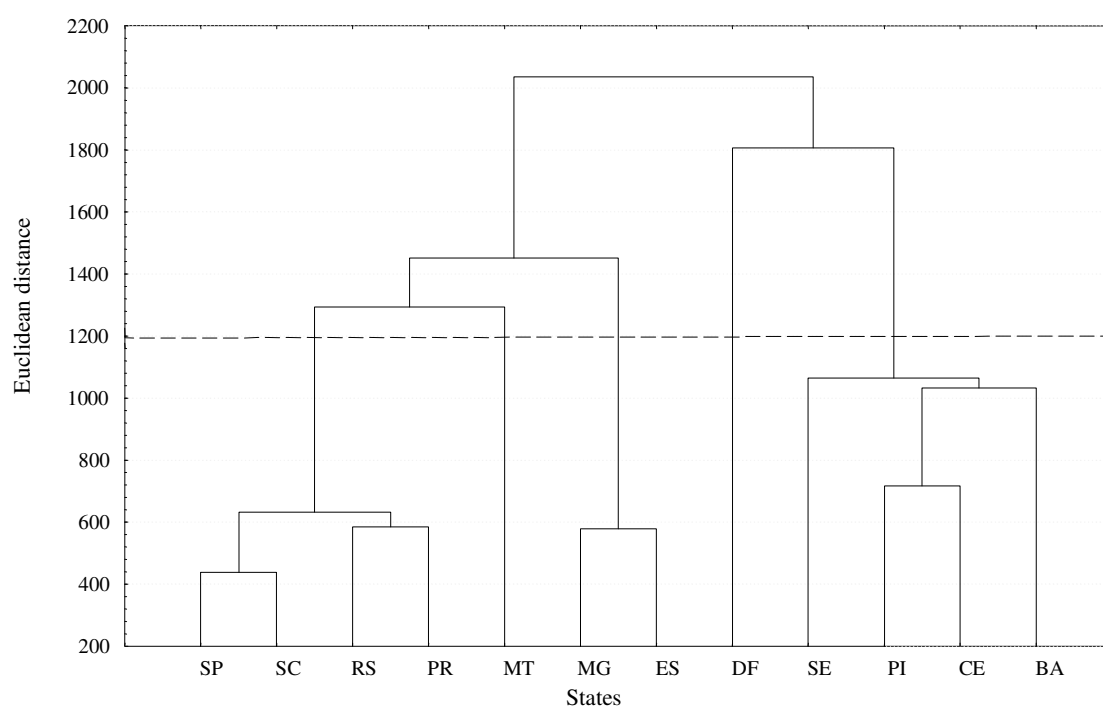


Fig. 4. Dendrogram obtained from mean composition of mineral elements in 154 dehydrated bee pollen samples from 11 Brazilian states and the Federal District.

The grouping of the samples through their similarities can be better explained by the PCA (Figure 5) that indicates which mineral elements are responsible for the clusters. The samples of BA and SE can be characterized by the Na, Ca and Mg contents. Those from PI and CE can be mainly defined by Zn, K, Mn and P. Cu influenced the samples from the Federal District while those of MG, RS, SP and MT are characterized by the Fe level.

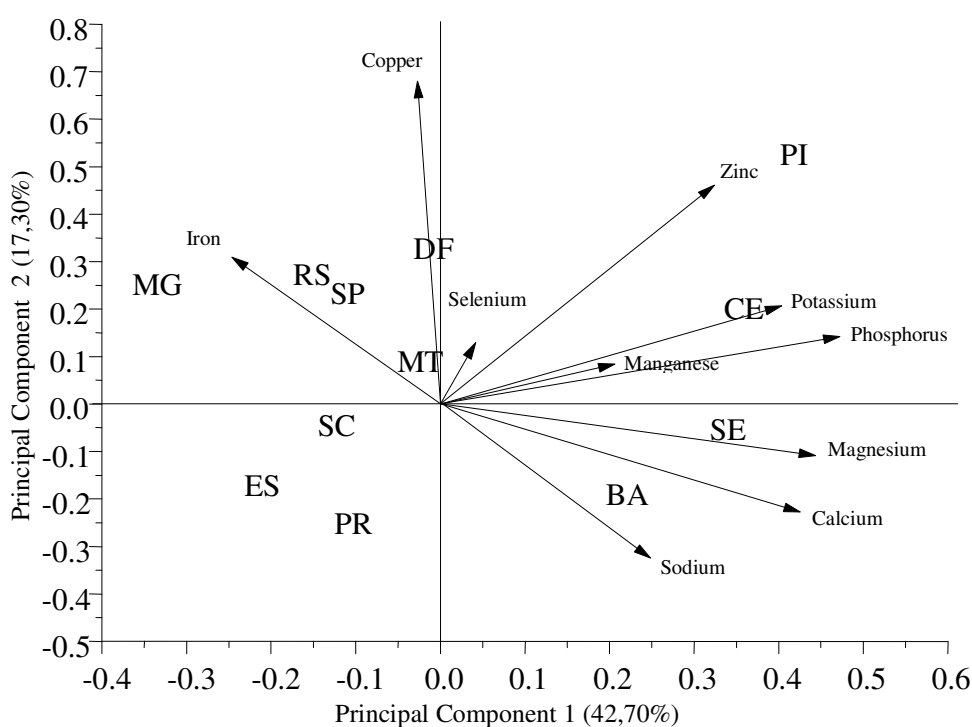


Fig. 5. Principal components 1 and 2 obtained from mean composition of mineral elements present in 154 dehydrated bee pollen samples from 12 Brazilian states.

3.4. Estimated micronutrient contribution of pollen to the diet

Contribution of the mineral elements in bee pollen to recommended daily intakes (RDI) established by Brazilian regulation (Brazilian Ministry of Health, 2005) per portion is shown in Table 7. In terms of the mean values, high contribution could come from Mn (69.6% of RDI) and Se (37.5% of RDI). According to Brazilian regulation (Brazilian Ministry of Health, 1998), a contribution of more than 30% classifies the food as a rich source and above 15% as a source. In addition, Brazilian bee pollen may be a source of Cu (26.7% of RDI), P (17.2% of RDI), and Zn (16.7% of RDI). It is noteworthy that Cu content did not vary among the studied localities. The high K/Na ratio makes bee pollen potentially valuable for diets with defined electrolytic balance.

Selenium, Cu and Zn are considered antioxidant nutrients, since they are structural components of the antioxidant enzymes: Cu and Zn in superoxide dismutase (SOD) and Se in plasmatic glutathione peroxidase (GSHPx), respectively. Zn can also inactivate superoxide radicals in cytosol and mitochondria (Rauma and Mykkanen, 2000). The presence of these three elements in Brazilian bee pollen, together with considerable amounts of flavonoids (discused in a separete paper) points to this product as a potential source of antioxidants in the human diet.

Table 7

Percentage contribution of the mineral elements to Brazilian Recommended Daily Intakes (RDI) for adults in relation to the mean levels found in the 154 Brazilian bee pollen samples.

Element	Mean content (mg kg ⁻¹)	RDI ^a (mg)	% RDI Contribution ^b
Sodium	85	1500*	0.1
Calcium	2215	1000	5.5
Iron	82	14	14.6
Magnesium	1179	260	11.3
Zinc	46.7	7	16.7
Phosphorus	4828	700	17.2
Copper	9.6	0.9	26.7
Selenium	0.51	0.034	37.5
Potassium	5089	4700*	2.7
Manganese	64	2.3	69.6

^a Brazilian Ministry of Health (2005).

^b Considering a 25 g portion (Lengler, 1999).

* Dietary Reference Intakes (DRI), according to Institute of Medicine (2004), not established by Brazilian regulation.

4. Conclusions

A method for mineral elements consisting of microwave-assisted digestion in closed system and quantification by inductively coupled plasma optical emission spectrometry

(ICP OES) showed good precision and accuracy, additionally allowing simultaneous determination of micro and macroelements in bee pollen samples.

Wide within-state and between-state variations exist in the mineral composition of dehydrated bee pollen. K, P, Ca and Mg are the major mineral elements.

In terms of mean values, Brazilian bee pollen may be considered a rich source of Mn and Se and a source of Cu, P and Zn. The high K/Na ratio can make it a valuable product for diets with defined electrolytic balance and the presence of Se, Cu and Zn makes it a potential source of antioxidant minerals to the human diet.

Acknowledgements

The authors acknowledge FAPESP, CNPq and UNASP for providing financial support.

References

- Abreu, M., 1992. El pollen como alimento en la nutrición humana. *Alimentaria*, 235, 45 – 46.
- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M., 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 105-111.

- Baldi Coronel, B., Grasso, D., Pereira, S.C., Fernández, G., 2004. Caracterización bromatológica del pólen apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnologia* 29, 145-181.
- Barreto L.M.R.C., Funari S.R.C, Orsi R.O., 2005. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. *I Congreso de Apicultura del Mercosur. June, 2005. Punta del Este, Uruguay*. Retrieved October 10, 2009 from: <http://www.culturaapicola.com.ar>.
- Bastos, D.H.M., Rocha, C.L., Cunha, I.B.S., Carvalho, P.O., Torres, E.A.S., 2003. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 62, 239-244.
- Bogdanov. S., 2004. Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38, 334-341.
- Brazilian Ministry of Health. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 1998. *Informação nutricional complementar*, Port. nº 27, de 01/13/1998. Brasília, DF.
- Brazilian Ministry of Health. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2005. *Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais*, Res. RDC nº 269, de 09/22/2005. Brasília, DF.
- Carpes, S.T., 2008. Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil. Curitiba. Doctoral Thesis, Federal University of Paraná.
- Conti, M.H., Botrè, F., 2001. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 69, 267-282.

- Day, S., Beyer, R., Mercer, A., Ogden, S., 1990. The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago, New Zealand. *Journal of Apiculture Research*, 29, 138 – 146.
- Funari, S.R.C., Rocha, H.C, Sforcin, J.M., Filho, H.G., Curi, P.R., Gomes Dierckx, S.M.A., Funari, A.R.M., Oliveira Orsi, R.de., 2003. Composições bromatológica e mineral do pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, 11, 88-93.
- Institute of Medicine – IOM, 2004. *Dietary Reference Intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate*. Washington, D.C.: National Academy Press. Retrieved Nov 29, 2009 from: <http://www.nap.edu>.
- Jeanne, F., 1993. Le pollen: composition chimique. *Bulletin Technical*, 20, 23-28.
- Kalbande, D. M., Dhadse, S. N., Chaudhari, P. R., Wate, S. R., 2008. Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental Monitoring Assessment*, 138, 233-238.
- Kump, P., Necemer, M., Snajder, J., 1996. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 51, 499-507.
- Lengler, S., 2002. Pólen apícola. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. 2ª edição. Retrieved March 03, 2009 from: http://www.brasilapicola.com.br/files/apostila_polen_apicola.pdf.

- Loper, G.M., Standifer, L.N., Thompson, M.J., Gilliam, M., 1980. Biochemistry and microbiology of bee collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bea bread. I Fatty acids, vitamins and minerals. *Apidologie*, 11, 63-73.
- Mermet, J.M., Poussel, E., 1995. ICP Emission spectrometers: analytical figures of merit. *Applied Spectroscopy*, 49, 12-18.
- Pereira, F.M., Freitas, B.M., Vieira-Neto, J.M., Lopes, M.T.R., Barbosa, A.L., Camargo, R.C.R., 2006. Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1-7.
- Rauma, A.L., Mykkanen, H., 2000. Antioxidant status in vegetarians versus omnivores. *Nutrition*, 16, 111-9.
- Saavedra, A.R., Di Bernardo, M.L, Rondon, C., Gutiérrez, L., Saavedra, O., González, I, Vit, P., 2007. Determinación de plomo en polen apícola de Brassica napus L. del Páramo de Misintá, estado Mérida, Venezuela. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*, 38, 6-10.
- Serra Bonvehí, J., Escolà Jordà, R., 1997. Nutrient composition and microbiological quality of honey-bee-collected pollen in Spain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 725-732.
- Serra Bonvehí, J., Gonell Galindo, J., Gomez Pajuelo, A., 1986. Estudio de la composición y características físico-químicas del pólen de abejas. *Alimentaria*, 176, 63-67.
- Somerville, D.C., Nicol, H.I., 2002. Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42, 1131-1136.
- Szczesna, T., 2007. Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, 51, 5-13.

CAPÍTULO 4

Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta

MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA MARTINS

DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

MARCELO ANTONIO MORGANO

MARIA ISABEL RODRIGUES

Artigo a ser submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz

Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta

Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones
in bee pollen by surface methodology

Marcia C. TEIXEIRA MARTINS^{1,2}, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA^{1*}, Marcelo A. MORGANO³, Maria I. RODRIGUES⁴

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, 13083-862, Campinas, SP. Telefone: (19) 3521-4013. E-mail: delia@fea.unicamp.br

²Centro Universitário Adventista de São Paulo, Estr. Itapecerica, 5898, 05858-001, São Paulo, SP.

³Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, 13070-178.

⁴Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

RESUMO

Foi otimizada a metodologia analítica para determinar quatro flavonóis: miricetina (M), quercetina (Q), kanferol (K) e isoramnetina (I) e duas flavonas: luteolina (L), apigenina (A) em amostras de pólen apícola desidratado produzidas em três estados brasileiros: Bahia (BA), São Paulo (SP), e Santa Catarina (SC). Foi utilizado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para investigar os efeitos da concentração de HCl e do tempo de hidrólise sobre a concentração de cada flavonóide. A condição ótima encontrada para extração/hidrólise dos flavonóides estudados foi: 1,0M HCl/30 minutos. A melhor separação (CLAE) dos flavonóides foi conseguida com a coluna de fase reversa Symmetry C18 e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17), acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática. As curvas padrão apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os limites de detecção foram de 1,04, 0,88, 0,89, 1,64, 0,82 e 1,19 µg/mL respectivamente para M, L, Q, A, I e K.

Palavras-chave. flavonóides, pólen apícola, análise por CLAE, delineamento estatístico de experimentos

ABSTRACT

The analytical methodology for the determination of four flavonols: myricetin (M), quercetin (Q), kanferol (K), isorhamnetin (I) and two flavones: luteolin (L), apigenin (A) in samples of dehydrated bee pollen produced in three Brazilian states: Bahia (BA), São Paulo (SP) and Santa Catarina (SC) was optimized. Central Composite Rotational Design was used to investigate the effects of HCl concentration and hydrolysis time on the concentration of each flavonoid. The optimum condition found for extraction/hydrolysis of the flavonoids studied was 1.0M HCl/30 minutes. The best separation (HPLC) of the flavonoids was achieved with a reverse phase Symmetry C18 column with methanol:tetrahydrofuran:water (26:57:17) acidified with 0.3% formic acid as mobile phase in isocratic elution. The standard curves presented coefficients of correlation superior to 0.99. The limits of detection were 1.04, 0.88, 0.89, 1.64, 0.82 and 1.19 µg/mL for L, Q, A, I and K, respectively.

Key words. Flavonoids, bee pollen, HPLC analysis, statistical experimental design

INTRODUÇÃO

O pólen apícola tem atraído a atenção de pesquisadores devido às suas propriedades bioativas e as possibilidades do seu emprego medicinal na prevenção e tratamento de algumas patologias¹. Estudos têm apontado para as propriedades bioativas do pólen apícola, bem como de seus extratos, devido ao considerável conteúdo de compostos fenólicos (tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos)²⁻⁴, que dentre outras propriedades biológicas, possuem ação antioxidante investigada em experimentos realizados *in vitro*³⁻⁵, em culturas de células⁶ e em animais de laboratório⁷.

Flavonóides estão presentes em pólen apícola na forma livre ou como glicosídeos e são em geral altamente hidroxilados, tal como o kanferol⁸. Estes compostos são reconhecidos como potenciais marcadores taxonômicos^{9,10}. Assim, diversos estudos relacionam o conteúdo de flavonóides do pólen com a sua origem floral⁹⁻¹⁵.

Sete agliconas (isoramnetina, kanferol, luteolina, miricetina, quercetina, selagina e tricetina) e quarenta glicosídeos já foram identificados no pólen apícola^{2,10,11,13-18}.

Poucos trabalhos investigaram o teor de flavonóides no pólen apícola. Campos et al.¹⁹, observaram que o conteúdo de flavonóides alcançou 5.000 µg/g, enquanto que Serra-Bonvehi et al.² relataram que os fenóis totais quantificados por análise espectrofotométrica constituíam mais de 8.500 µg/g e flavonóides eram mais de 3.500 µg/g da sua composição, com predominância de glicosídeos de flavonóis. Oitenta e dois por cento das amostras de pólen apícola analisadas por Serra-Bonvehi et al.² continham no mínimo 14 componentes fenólicos, primariamente rutina, miricetina e ácidos cinâmicos.

Três trabalhos estudaram os flavonóides presentes em amostras de pólen apícola brasileiras^{4,17,20}. Freire et al.¹⁷ avaliaram o perfil cromatográfico de flavonóides e sua correlação com a origem botânica de amostras do nordeste brasileiro. Carpes et al.²⁰ determinaram o teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos de pólen apícola por método espectrofotométrico, tendo encontrado níveis superiores a 10.000 µg/g em extratos a 60, 70 e 80%. Em outro estudo, Carpes et al.⁴ encontraram teores de compostos fenólicos variando entre 19.280 e 48.900 µg/g (expressos em equivalente de ácido gálico) e flavonóides totais em amostras de pólen da região sul do Brasil. O teor de rutina foi determinado em duas amostras (841 e 991 µg/g) e o teor de miricetina em uma amostra (695 µg/g).

Nos primeiros estudos realizados com o objetivo de identificar os flavonóides presentes em pólen os compostos geralmente extraídos com metanol foram isolados e purificados por técnicas cromatográficas, tais como: cromatografia em camada delgada, cromatografia dimensional em papel, cromatografia de coluna aberta e CLAE semi-preparativa. A identificação foi realizada por métodos clássicos de espectrofotometria de UV ou por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), com ou sem hidrólise prévia. A identificação também foi feita por comparações com padrões e por reações químicas específicas^{10,11,14,15,19}.

Mais recentemente, Serra Bonvehí et al.² identificaram agliconas livres presentes em amostras de pólen apícola espanhol por HPLC/DAD. Freire et al.¹⁷ identificaram os flavonóides por CLAE/DAD. Um pico desconhecido foi isolado por cromatografia de coluna e identificado por RMN. No trabalho de Arráez-Román et al.¹⁶ os compostos foram

isolados e identificados por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* e nos trabalhos de Carpes et al.^{4,20} e Guo et al.¹⁸ os compostos foram isolados e identificados por CLAE/DAD.

A determinação quantitativa de glicosídeos de flavonóides individuais em materiais vegetais é difícil devido ao seu grande número. Foram descritos mais de cinquenta diferentes glicosídeos dos flavonóides mais comuns²¹. Por este motivo, na maior parte dos procedimentos analíticos desenvolvidos para quantificar os flavonóides, os glicosídeos são hidrolisados e as agliconas resultantes são identificadas e quantificadas. A hidrólise dos glicosídeos oferece um método prático empregado principalmente quando se requer dados para um grande número de flavonóides²² ou quando se deseja quantificar um grande número de amostras. Esta estratégia já foi empregada no nosso laboratório para alguns alimentos, como frutas e hortaliças *in natura* e processadas, chás, erva-mate e bebidas²³⁻²⁶.

Os glicosídeos são hidrolisados por concentrações relativamente altas de ácidos (geralmente HCl) numa mistura de metanol aquoso (50:50, V/V)^{27,28}. Esforços têm sido realizados para desenvolver ou otimizar procedimentos de hidrólise e extração que garantam uma extração eficiente sem resultar na degradação de agliconas, a fim de obter uma recuperação quantitativa destes compostos²⁹.

Embora seja possível otimizar processos por métodos empíricos que avaliam um fator de cada vez, estes demandam muito tempo e podem ignorar as interações entre os fatores. Por outro lado, os métodos estatísticos de otimização consideram as interações entre os fatores estudadas³⁰. Um dos métodos que permite avaliar os efeitos dos muitos

fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta é a Análise de Superfície de Resposta (ASR), originalmente descrita por Box et al.³¹.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido utilizada maciçamente para quantificação das agliconas dos flavonóides. A eletroforese capilar apresenta resultados promissores, mas o número de trabalhos é muito menor em relação à CLAE. A separação dos flavonóides por CLAE emprega na maior parte das análises colunas de fase reversa e detector de arranjo de diodos²².

Diante desse contexto e considerando a necessidade de maior informação sobre os flavonóides do pólen apícola nacional, o objetivo do presente estudo foi otimizar através de delineamento estatístico as condições para extração e hidrólise, bem como estabelecer as melhores condições cromatográficas para separação de quatro flavonóis (miricetina, quercetina, kanferol e isoramnetina) e duas flavonas (luteolina e apigenina) usando CLAE e detector de arranjo de diodos (DAD) em amostras de pólen apícola brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram realizados três estudos de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para amostras de pólen apícola adquiridas diretamente dos produtores e provenientes de três estados brasileiros (Bahia, Santa Catarina e São Paulo). Foram selecionadas três amostras, sendo uma de cada estado. As amostras estavam prontas para

serem comercializadas (produto desidratado, limpo e embalado). O estado de São Paulo é um dos principais estados consumidores de pólen no Brasil no qual o preço de venda do produto é mais elevado. Os estados de Santa Catarina e Bahia, representam dois importantes pólos produtores de pólen no Brasil além de distintas condições climáticas, a saber clima mesotérmico (subtropical úmido) em Santa Catarina e tropical ou tropical semi-árido na Bahia³². A região do município de Canavieiras (BA) produz mensalmente até uma tonelada de pólen desidratado para consumo no mercado nacional¹⁷.

As amostras (com peso variando entre 200 e 300g) foram enviadas no mesmo mês da coleta em sacos plásticos, sendo que todas se apresentavam granuladas. Imediatamente ao receber as amostras, estas foram seladas a vácuo usando um filme de poliamida e polietileno para evitar absorção de umidade e oxigênio e armazenadas em freezer a -16°C até o momento das análises, quando foram quarteadas em quarteador de inox e, em seguida, trituradas em moinho refrigerado, com hélice de tungstênio (M20, IKA Labortechnik, Staufen, Baden, Ge). Em seguida, as amostras foram tamizadas usando-se malhas de 30 mesh (600 μm) para padronizar o tamanho das partículas de pólen.

Reagentes e Padrões

As fases móveis e as amostras foram preparadas utilizando-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bellerica, EUA). Os solventes metanol e tetrahidrofurano (THF) grau cromatográfico foram adquiridos da Mallinckrodt (Philipsburg, EUA). Ácido ascórbico, ácido fórmico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth

Ltda (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore (Bellerica, EUA), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina (M), quercetina (Q), luteolina (L), kanferol (K), apigenina (A) e isoramnetina (I) foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonóide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 500 µg/mL e conservadas a -18°C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nessas condições.

Equipamento e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi conduzida em um módulo de separação a líquido Waters (modelo 2690), (Milford, EUA), equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), DAD da Waters (modelo 996), controlado pelo Software Millenium 32 (Scientific Equipment Source, Pickering, Canada). A vazão da fase móvel foi de 0,2 mL/min e o volume de injeção de 5 µL. A quantificação foi fixada em 370 nm.

Para separação dos flavonóides agliconas foi empregada uma coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) da Waters. As condições cromatográficas foram definidas após a realização de testes com uma mistura de padrões dos seis compostos em estudo, M, Q, L, K, A e I, dissolvidos em metanol, adicionado de ácido clorídrico e ácido ascórbico, conforme o procedimento empregado para as amostras. Neste estudo duas combinações de fases móveis foram testadas em várias proporções, em gradientes diversos e em corridas

isocráticas: 1) água e metanol e 2) água, metanol e THF, ambas acidificadas com 0,3% de ácido fórmico. Posteriormente, extratos hidrolisados das amostras de pólen, com ou sem co-cromatografia com padrões, foram injetados no cromatógrafo sob as melhores condições conseguidas para os padrões, fazendo os ajustes necessários para a melhor resolução dos picos.

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia e pelos espectros obtidos através do detector de arranjo de diodos, utilizando-se padrões.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras e simulando as condições de hidrólise. Alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5 mL de água purificada em Mili-Q com ácido ascórbico (0,04% na solução de injeção). A esta solução foi adicionado 1 mL de HCl 5M (equivalente a 1,0 M na solução de injeção) e o volume foi completado a 5 mL com metanol.

Extração e hidrólise dos flavonóides

Amostras homogêneas de pólen foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (em proporções de 1:3,5) e ácido ascórbico e homogeneizadas durante 2 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5 g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5 mL de

metanol e 5 mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais. As soluções de extração assim obtidas consistiram-se diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante (ácido ascórbico). Estes extratos foram levados a refluxo a 90°C durante diferentes períodos. Em seguida, foram resfriados e filtrados em funil de Buchner com placa porosa de vidro sinterizado, número 2. O volume foi completado a 50 mL com metanol e as soluções foram homogeneizadas manualmente. Alíquotas médias de 2 mL foram filtradas em filtro de PTFE (Millipore, Bellerica, EUA) de 0,45 µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

Planejamento experimental e análise de superfície de resposta

A otimização da extração e da hidrólise dos flavonóis e flavonas de três amostras de pólen (uma amostra de cada estado – Bahia, São Paulo e Santa Catarina) foi realizada por meio da Análise de Superfície de Resposta, com o objetivo de obter eficiência máxima de extração e hidrólise sem promover degradação dos flavonóides. A avaliação dos efeitos da concentração do ácido (0 a 2 M) e do tempo de hidrólise (0 a 60 minutos) sobre a eficiência da extração e hidrólise dos flavonóides foi realizada através de três DCCRs³³, ou seja, planejamentos 2², incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 12 experimentos conduzidos aleatoriamente.

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento com as distintas condições de hidrólise para determinação das concentrações de flavonóides nas amostras de pólen estudadas. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o pacote

Statistica for Windows, versão 6.0 da (Statsoft South America, São Caetano de Sul, Brasil). Verificou-se a possibilidade de ajuste de modelos codificados de segunda ordem através da Equação 1.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada flavonóide extraído das amostras de pólen, verificando-se a adequação dos modelos para obtenção e análise das superfícies de resposta:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} e b_{12} representam os coeficientes de regressão, x_1 a concentração molar de HCl e x_2 o tempo de hidrólise nos valores codificados.

Validação da extração e método cromatográfico

A faixa linear foi verificada para flavonóis e flavonas estudados. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados como a mínima concentração correspondente a $3,3 \times (SD/S)$ e $10 \times (SD/S)$, respectivamente, sendo SD o desvio padrão do branco e S a inclinação da curva analítica³⁴. Para comprovação prática dos valores calculados, estes foram injetados nas condições estabelecidas para a análise por CLAE.

Para verificar precisão do método, valores de sete repetições foram obtidos para uma amostra de pólen apícola contendo cinco dos seis flavonóides estudados. Esse experimento foi realizado na condição ótima de hidrólise: 1,0 M de HCl, durante 30 minutos.

Para verificar a exatidão do método, foram realizados testes de recuperação (em triplicata) com adição de padrão em níveis de concentração de 250, 350, 470, 280, 360, 260

µg/g de pólen para os flavonóides M, L, Q, I, K, A, respectivamente. Esses níveis correspondem a respectivamente 14%, 34%, 46%, 46% e 30% dos valores médios dos flavonóides M, L, Q, I e K, obtidos nas amostras de pólen estudadas. Para as amostras fortificadas o padrão foi adicionado à amostra homogeneizada, que foi misturada e deixada por 20 minutos para acomodação do padrão na matriz. As amostras sem ou com adição de padrões foram então submetidas à extração/hidrólise otimizadas neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições cromatográficas

Com a fase móvel água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, não foi possível uma boa separação entre os picos de isoramnetina e apigenina. Conseguiu-se uma boa separação dos compostos em estudo, adicionando-se o solvente THF à fase móvel. Para facilitar e sistematizar a otimização da separação cromatográfica, inicialmente a força cromatográfica ótima para a separação dos compostos foi selecionada empiricamente, por tentativa e erro até a obtenção de uma fase móvel de força cromatográfica elevada, de modo que todos os componentes eluíram com tempo de retenção semelhante ao de um composto não retido (Figura 1-A). A composição dessa fase móvel foi 50:33:17 (v/v) de metanol:THF:água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico. A seguir, sucessivamente, a composição da fase móvel foi modificada de modo a diminuir a força cromatográfica até conseguir a separação dos compostos no intervalo de tempo desejado, sempre com corrida

isocrática (Figura 1-B, C e D). O fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL/min e o volume de injeção foi de 5 µL. O cromatograma típico dos flavonóides agliconas obtidos (fase móvel: Metanol:THF:H₂O 26:17:57) (Figura 1-D) mostra que os flavonóides M, L, Q, A, I e K eluíram nesta sequência nos tempos de retenção de 10,9 minutos, 14,3 minutos, 18,5 minutos, 20,1 minutos, 24,3 minutos e 29,8 minutos, respectivamente.

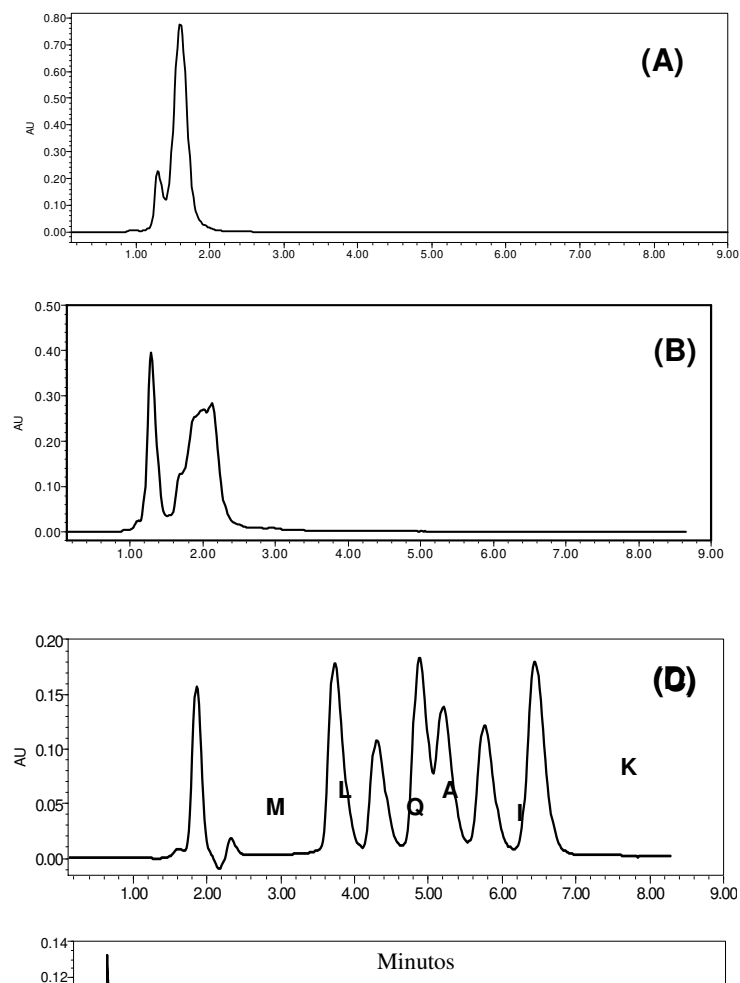


Figura 1. Método empírico para obtenção de fase móvel com a força cromatográfica ótima para separação de flavonóides agliconas (M: miricetina, L: luteolina, Q: quercetina, A: apigenina, I: isoramnetina e K: kanferol): (A) Fase móvel (FM): Metanol:THF:H₂O 50:33:17, (B) FM: Metanol:THF:H₂O 42:28:30, (C): FM: Metanol:THF:H₂O 35:23:42; (D) FM: Metanol:THF:H₂O 26:17:57. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m). FMs acidificadas com 0,3% de ácido fórmico), Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 μ L, detecção: UV, 370 nm.

Análise dos resultados dos DCCRs utilizados na otimização da extração/hidrólise das agliconas

Observa-se na Tabela 1 que as três amostras revelaram diferenças qualitativas e quantitativas nos flavonóides estudados. A amostra do estado da Bahia apresentou os flavonóis quercetina, isoramnetina e miricetina. A amostra do estado de São Paulo teve os flavonóis quercetina, isoramnetina e kanferol, enquanto que a amostra do estado de Santa Catarina continha os flavonóis quercetina, miricetina e kanferol, além da flavona luteolina. Apigenina não foi encontrada em nenhuma das amostras investigadas. Analisando as respostas de cada flavonóide, há uma grande amplitude de concentrações nas amostras estudadas, o que dificulta o estabelecimento de uma condição única (de concentração de ácido e de tempo de hidrólise) que otimize a extração e hidrólise simultânea de todos os flavonóides e garanta respostas máximas. A concentração de quercetina, por exemplo, variou de zero a $60,6 \pm 3,9 \mu\text{g/g}$, de 422 a $2640 \pm 50 \mu\text{g/g}$ e de 36 a $2715 \pm 30 \mu\text{g/g}$, respectivamente, nas amostras dos estados da BA, SP e SC.

Tabela 1. Condições experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as respostas para os flavonóides analisados nas amostras de pólen apícola.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Concentração de flavonóides (µg/g)									
	x ₁	x ₂	X ₁ (M)	X ₂ (min.)	Pólen BA			Pólen SP			Pólen SC			
					Q	I	M	Q	I	K	M	L	Q	K
1	-1	-1	0,3	9	nd	45,50	3796,17	996,42	nd	nd	602,82	392,18	235,75	nd
2	-1	+1	0,3	51	54,40	1408,13	2983,41	2468,98	88,51	159,39	546,39	408,48	575,71	81,36
3	+1	-1	1,7	9	27,02	608,66	3733,97	2442,32	55,77	91,17	1025,19	577,37	2297,28	910,13
4	+1	+1	1,7	51	22,34	921,99	1891,86	1610,50	103,26	124,13	447,21	560,88	1627,68	737,91
5	-1,41	0	0	30	nd	<LD	3332,08	481,20	nd	Nd	734,05	504,25	36,03	nd
6	+1,41	0	2,0	30	48,48	1157,13	871,28	758,81	57,67	84,12	493,24	551,02	1558,80	693,07
7	0	-1,41	1,0	0	nd	nd	2952,10	422,16	nd	nd	675,32	527,97	185,49	nd
8	0	+1,41	1,0	60	62,11	1567,88	3074,06	2483,47	156,33	216,49	876,61	639,92	2431,68	1112,81
9	0	0	1,0	30	65,16	1378,13	3366,07	2697,17	128,91	245,42	971,60	612,85	2695,66	1210,95
10	0	0	1,0	30	59,69	1404,21	3373,10	2661,01	136,86	232,12	943,06	627,94	2689,27	1245,52
11	0	0	1,0	30	61,73	1405,53	3434,53	2622,65	128,41	248,57	977,83	622,38	2721,35	1234,82
12	0	0	1,0	30	55,66	1325,22	2972,44	2580,94	141,28	218,63	1012,56	605,24	2754,21	1208,98
Média ± Desvio Padrão das condições dos					60,56	1378,27	3286,54	2640,44	133,87	236,19	976,26 ±	617,10	2715,12	1225,07
pontos centrais					± 3,97	± 37,55	± 211,64	± 49,99	± 6,28	± 13,70	28,54	± 10,07	± 29,52	± 18,00

BA: Bahia; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo

X₁=concentração molar de HCl, X₂=tempo de hidrólise (minutos), M=miricetina, L=luteolina, Q=quercetina, I=isoramnetina, K=kanferol, nd=não detectado(>LD); LD=Limite de Detecção: miricetina=1,04; luteolina=0,88; quercetina=0,89; isoramnetina=0,82; kanferol=1,19 µg/mL
LQ=Limite de Quantificação: miricetina=3.70; luteolina=3.16; quercetina=3.19; isoramnetina=2.95; kanferol=4.25 µg/mL

Na etapa de hidrólise e extração, os açúcares devem ser liberados para identificação e quantificação das agliconas. Para tanto, as condições de hidrólise devem proporcionar a ruptura completa das ligações glicosídicas, mas ao mesmo tempo suficientemente branda de modo a evitar a degradação das agliconas. Altas concentrações de ácido durante um longo período podem promover uma hidrólise completa, porém podem acelerar degradação. Baixas concentrações de ácido por curto período de tempo, por outro lado, podem resultar na hidrólise incompleta. Deste modo, as melhores condições devem ser alcançadas quando se utiliza uma baixa concentração de ácido durante maior período de tempo ou um tempo de hidrólise mais curto com concentração mais elevada de ácido. Estas condições dependem dos tipos de glicosídeos presentes na amostra e do tipo de matriz analisada^{25,26}.

Tais considerações foram confirmadas no presente trabalho, como se observa na Figura 2 contendo os cromatogramas obtidos da amostra de pólen do estado da Bahia submetida a diferentes condições de extração/hidrólise: (A) sem HCl por 30 minutos, onde pode-se observar a presença de glicosídeos, indicando a ausência de hidrólise dos mesmos a agliconas; (B) com HCl 1,0M por 30 minutos, condição ótima, obtida a partir das superfícies de resposta, onde pode-se verificar que os glicosídeos foram hidrolisados e (C) com HCl 1,7M por 51 minutos, condição na qual os compostos de interesse já sofreram degradação, apresentando teores menores ou inexistentes. Para algumas amostras e condições de hidrólise observou-se a presença de picos de degradação.

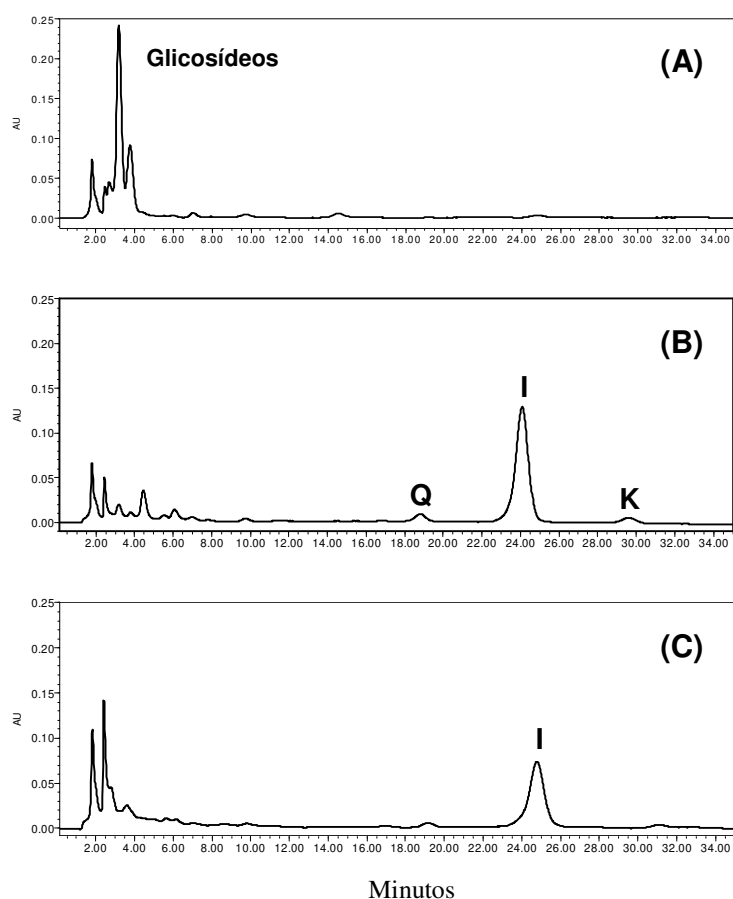


Figura 2. Cromatogramas dos flavonóides agliconas Q=quercetina, I=isoramnetina, K=kanferol dos extratos hidrolisados de pólen do estado da Bahia, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) sem HCl por 30 minutos, (B) com HCl 1,0M por 30 minutos e (C) com HCl 1,7M por 51 minutos. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m), fase móvel Metanol:THF:H₂O 26:17:57 (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) em corrida isocrática. Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 μ L, detecção: UV, 370 nm.

A Tabela 2 apresenta os coeficientes de regressão para as agliconas extraídas de amostras de pólen dos estados da Bahia, São Paulo e Santa Catarina. Para elaboração dos modelos, em função das variáveis estudadas, adotou-se 15% de significância na avaliação estatística dos coeficientes de regressão obtidos.

As equações codificadas com os parâmetros estatisticamente significativos, os coeficientes de determinação (R^2), F calculados e F tabelados estão apresentados na Tabela 3.

Pelos coeficientes de determinação (R^2) e F calculados obtidos, observa-se que os resultados experimentais tiveram um bom ajuste aos modelos propostos (R^2 entre 0,85 e 0,95) com exceção da extração/hidrólise de quercetina em pólen do estado de São Paulo, luteolina em pólen do estado de Santa Catarina, e miricetina em pólen do estado de São Paulo com R^2 de 0,76; 0,79 e 0,81. Estes valores mais baixos podem ser considerados estatisticamente aceitáveis, tendo-se em vista a heterogeneidade das amostras de pólen. Assim, as análises de superfície de resposta foram realizadas e apresentadas pelas curvas de contorno da Figura 3 para se determinar as faixas da concentração molar de HCl e tempos de hidrólise e obter a indicação das condições ideais de hidrólise.

A condição que maximiza a quantificação de todas as agliconas presentes nas amostras estudadas simultaneamente é 1,0M de HCl por 30 minutos, que corresponde aos valores definidos no ponto central do planejamento experimental, condição esta realizada em quadruplicata para cada amostra de pólen. Assim, as concentrações máximas de flavonóides em $\mu\text{g/g}$ obtidas para as três amostras analisadas estão apresentadas na Tabela 1, com os valores médios e seus respectivos erros padrões.

Tabela 2. Estimativas dos coeficientes da regressão do modelo polinomial quadrático e significância (p-valor), para a resposta dos teores de flavonóides agliconas nas amostras de pólen analisadas.

Pólen BA				
Quercetina			Isoramnetina	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	60,56*	0,0001	1378,27*	0,0001
B ₁	14,79*	0,0244	414,05*	0,0095
B ₁₁	-18,59*	0,0152	-383,65*	0,0209
B ₂	10,35*	0,0815	286,79*	0,0408
B ₂₂	-15,18*	0,0336	-280,96*	0,0632
B ₁₂	-14,77*	0,0793	-262,32*	0,1440
Pólen BA			Pólen SP	
Miricetina			Quercetina	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	3286,54*	<0,0001	2640,44*	0,0001
B ₁	-766,87*	0,0020	129,17	0,5609
B ₁₁	-456,44*	0,0318	-799,43*	0,0144
B ₂	-122,66	0,4347	437,82*	0,0820
B ₂₂	-0,74	0,9966	-383,03*	0,1537
B ₁₂	-257,34	0,2608	-576,10*	0,1003
Pólen SP				
Isoramnetina			Kanferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	133,87*	<0,0001	236,19*	<0,0001
B ₁	27,20*	0,0186	38,91*	0,0342
B ₁₁	-50,42*	0,0018	-92,43*	0,0012
B ₂	36,45*	0,0051	45,26*	0,0192
B ₂₂	-25,76*	0,0350	-59,34*	0,0098
B ₁₂	-10,26	0,4260	-31,61	0,1679
Pólen SC				
Miricetina			Luteolina	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	976,25*	<0,0001	617,10*	<0,0001
B ₁	-121,87*	0,0006	8,24	0,6571
B ₁₁	-191,16*	<0,0001	-62,50*	0,0194
B ₂	75,98*	0,0064	61,99*	0,0127
B ₂₂	-109,99*	0,0018	-34,34*	0,1326
B ₁₂	-130,39*	0,0025	-8,20	0,7539
Pólen SC				
Quercetina			Kanferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	2715,12*	<0,0001	1225,07*	<0,0001
B ₁	227,99*	0,1294	111,16*	0,0897
B ₁₁	-926,08*	0,0007	-444,05*	0,0004
B ₂	786,26*	0,0009	392,55*	0,0004
B ₂₂	-670,49*	0,0036	-339,11*	0,0015
B ₁₂	-252,39	0,2181	-63,39	0,4460

BA: Bahia; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; *p-valor < 0,15

Tabela 3. Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl (x_1) e tempo de hidrólise (x_2) presentes nas amostras de pólen analisadas.

		EQUAÇÃO Y = (μg Flavonóide aglicona /g pólen)	R^2	F_{CAL}	F_{TAB}
		(Valores de x_1 e x_2 codificados)			(α , v_R , v_I)
Pólen BA	Q	$Y = 60,56 + 14,79 x_1 - 18,59 x_1^2 + 10,35 x_2 - 15,18 x_2^2 - 14,7 x_1 x_2$	0,85	6,70	3,11
	I	$Y = 1378,27 + 414,05 x_1 - 383,65 x_1^2 + 286,79 x_2 - 280,96 x_2^2 - 262,32 x_1 x_2$	0,86	7,22	3,11
	M	$Y = 3285,95 - 766,87 x_1 - 456,28 x_1^2$	0,81	19,35	3,01
Pólen SP	Q	$Y = 2640,44 - 799,43 x_1^2 + 437,82 x_2 - 383,03 x_2^2 - 576,10 x_1 x_2$	0,76	5,67	2,96
	I	$Y = 133,87 + 27,20 x_1 - 50,42 x_1^2 + 36,45 x_2 - 25,76 x_2^2$	0,90	15,50	2,96
	K	$Y = 236,19 + 38,91 x_1 - 92,43 x_1^2 + 45,26 x_2 - 59,34 x_2^2$	0,87	12,01	2,96
Pólen SC	M	$Y = 976,26 - 121,87 x_1 - 191,16 x_1^2 + 75,98 x_2 - 109,99 x_2^2 - 130,39 x_1 x_2$	0,90	10,65	3,11
	L	$Y = 617,10 - 62,5 x_1^2 + 61,99 x_2 - 34,34 x_2^2$	0,79	9,95	2,92
	Q	$Y = 2715,12 + 227,99 x_1 - 926,08 x_1^2 + 786,26 x_2 - 670,49 x_2^2$	0,92	20,45	2,96
	K	$Y = 1225,07 + 111,16 x_1 - 444,05 x_1^2 + 392,55 x_2 - 339,11 x_2^2$	0,95	32,70	2,96

BA: Bahia; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; R^2 =coeficiente de determinação; $F_{\text{CAL}} = (QM_{\text{Regressão}}/QM_{\text{Resíduo}})$; M=miricetina,

L=luteolina, Q=quercetina, I=isoramnetina, K=kanferol, α =nível de significância (15%); v_R =graus de liberdade da regressão;

v_I =graus de liberdade dos resíduos.

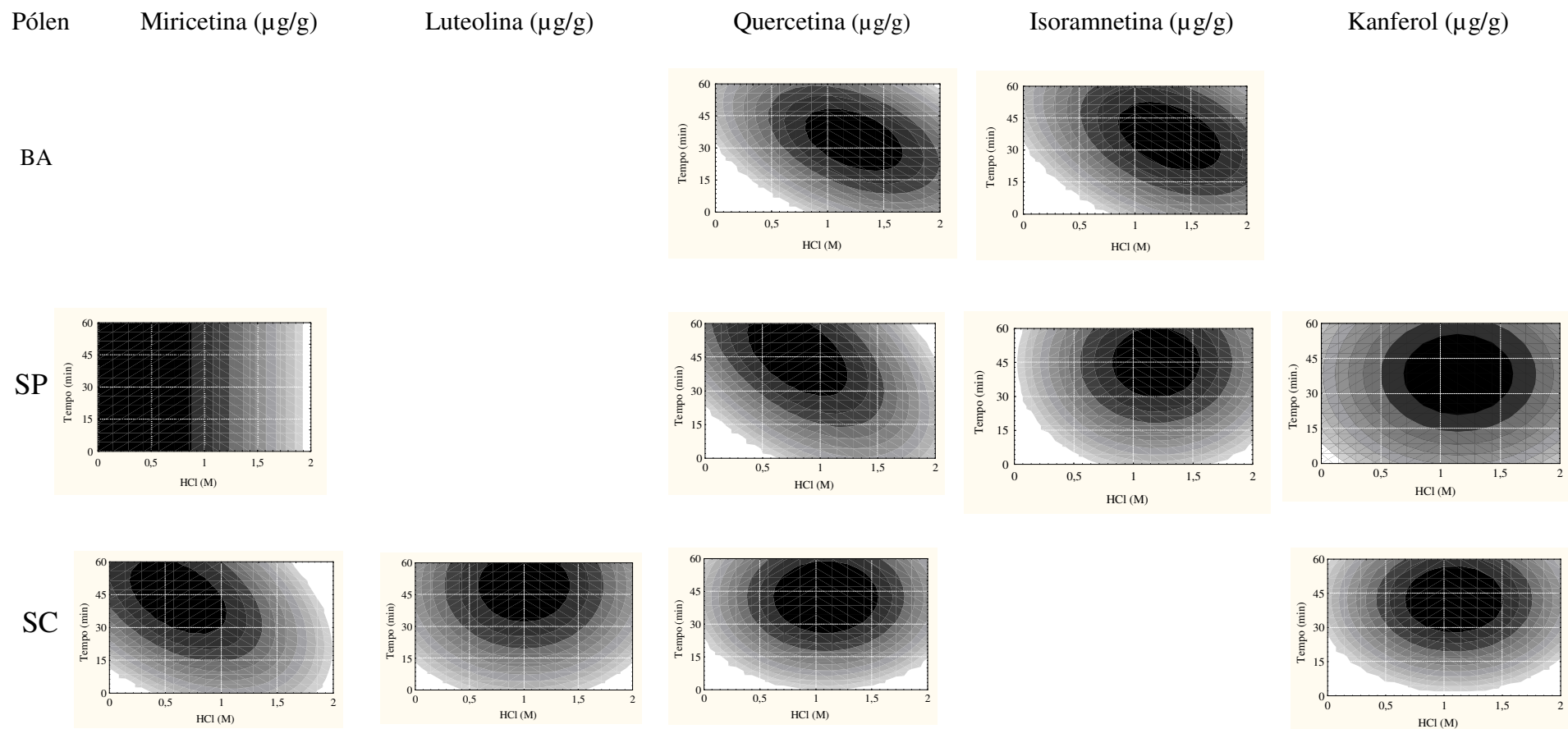


Figura 3. Curvas de contorno para a concentração das agliconas miricetina, luteolina, quercetina, isoramnetina e kanferol como uma função do tempo (minutos) e da concentração de ácido clorídrico (M) em amostras de pólen apícola provenientes dos estados: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC).

Nos trabalhos visando o isolamento e identificação dos flavonóides presentes em pólen apícola foram usadas distintas condições de tempo, concentração de ácido e temperatura para hidrólise dos mesmos. Tomás-Barberán et al.⁹ procederam a hidrólise em HCl 2M a 85°C, durante 45 min, enquanto Dauguet et al.¹⁴ utilizaram H₂SO₄ 2M a 100°C, durante 30 min. Outros autores empregaram metanol:HCl 3M 1:1, a 100°C durante 10 min.¹³ ou 15 min.¹¹. Entretanto, em nenhum destes estudos há relato de otimização do método para obtenção da melhor condição de hidrólise para extração dos flavonóides agliconas. Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a necessidade de proceder tal análise para obter valores confiáveis destes compostos e confirmam a observação de autores que avaliaram o teor de flavonóides em outras matrizes^{24,25}.

Avaliação da metodologia analítica

As curvas analíticas passaram pela origem e apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estabelecidas (Tabela 4). Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99 e os coeficientes de variação entre as triplicatas foram inferiores ou igual a 2,4. Os limites de detecção obtidos para M, L, Q, A, I e K foram de 1,04; 0,88; 0,89; 1,64; 0,82 e 1,19 µg/mL, respectivamente. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação de sete replicatas (Tabela 5) de uma amostra de pólen do estado de São Paulo. As taxas de recuperação para os diferentes flavonóides presentes em uma amostra de pólen do estado da Bahia estão apresentadas na Tabela 6, variando de 90% para kanferol a 99% para miricetina. Essas características comprovam o bom desempenho do método analítico.

Tabela 4. Propriedades das curvas analíticas.

Flavonóide	Faixa de concentração (µg/mL)	Coefficiente de determinação (r^2)	Coefficiente de variação entre as triplicatas
Miricetina	5,3 – 159	0,9962	1,4
Luteolina	0,9 – 141	0,9996	1,1
Quercetina	1,1 – 106	0,9985	1,0
Apigenina	4,7 – 94	0,9991	2,4
Isoramnetina	0,3 – 75	0,9992	2,4
Kanferol	0,4 – 38	0,9878	2,4

Tabela 5. Teores de flavonóides em amostra de pólen do estado de São Paulo e seus respectivos coeficientes de variação.

Flavonóide	Concentração (µg/g)*	Coefficiente de variação (%)
Miricetina	3348,22 ± 78,13	2,33
Luteolina	3472,78 ± 61,34	1,77
Quercetina	2616,17 ± 51,53	1,97
Isoramnetina	131,44 ± 1,91	1,45
Kanferol	381,40 ± 5,19	1,36

*média de sete repetições

Tabela 6. Quantidades adicionadas, percentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados em amostra de pólen do estado da Bahia.

Flavonóide	Quantidade adicionada (µg/g)	Recuperação ^a (%)	CV (%)
Miricetina	246,95	99	4,7
Luteolina	350,39	98	0,8
Quercetina	468,74	95	3,5
Apigenina	262,79	97	0,4
Isoramnetina	279,56	90	5,0
Kanferol	363,43	90	3,3

^a média de três determinações, M=miricetina, L=luteolina, Q=quercetina, A=apigenina, I=isoramnetina, K=kanferol.

CONCLUSÕES

A melhor condição cromatográfica para a determinação de flavonóis e flavonas nas amostras de pólen estudadas foi obtida com o uso de coluna de fase reversa C18 Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17) acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática.

A análise por superfície de resposta foi imprescindível na otimização do método de extração e hidrólise dos flavonóis e flavonas, sendo possível estabelecer as condições ótimas de concentração molar de HCl e tempo de hidrólise para amostras de pólen apícola (1,0M durante 30 minutos).

As condições estabelecidas para a determinação de flavonóis e flavonas em pólen apícola permitiram uma quantificação rápida e confiável dos flavonóides miricetina, luteolina, quercetina, isoramnetina e kanferol das amostras estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e ao UNASP pelo financiamento concedido.

REFERÊNCIAS

1. Linskens HF, Jorde W. Pollen as food and medicine – a review. *Econ Botany* 1997; 51: 78- 87.

2. Serra-Bonvehí J, Soliva-Torrentó M, Centelles-Lorente E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 1848-1853.
3. Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, Klepacz-Baniak J, Czekonska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem* 2007; 100: 237-240.
4. Carpes ST, Prado A, Moreno IAM, Mourão GB, Alencar SM, Masson ML. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. *Quím Nova* 2008; 31: 1660-1664.
5. LeBlanc BW, Davis OK, Boue S, DeLucca A, Deeby T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem* 2009; 115: 1299-1305.
6. Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y et al. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory Bursa for K-562 cell lines. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1652-1657.
7. Saric A, Balog T, Sobocanec S, Kusic B, Sverko V, Rusak G. et al. Antioxidant effects of flavonoids from Croatian *Cystus incannus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol* 2008; 47: 547-554.
8. Ferreres F, Ortiz A, Silva C, Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – A study of their botanical origin. *Z Lebensm Unters Forsch* 1992; 194: 139-143.
9. Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F, Ferreres F, Garcia-Viguera C. Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. *J Sci Food Agric* 1989; 47: 337-340.

10. Campos M, Markham KR, Mitchell KA, Cunha APD. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem Anal* 1997; 8: 181-185.
11. Markham KR, Campos M. 7- and 8-*O*-methylherbacetin-3-*O*-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochem* 1996; 43: 763-767.
12. Ferreres F, Juan T, Pérez-Arquillué C, Herrera-Marteache A., Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA. Evaluation of pollen as a source of kanferol in rosemary honey. *J Sci Food Agric* 1998; 77: 506-510.
13. Markham KR, Mitchell KA, Campos M. An unusually lipophilic flavonol glycoside from *Ranunculus sardous* pollen. *Phytochem* 1997; 45: 203-204.
14. Dauguet JC, Bert M, Dolley J, Bekaert A, Lewin G. 8-Methoxikanferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochem* 1993; 33: 1503-1505.
15. Tomás-Lorente F, Garcia-Grau MM, Nieto JL, Tomás-Barberán FA. Flavonoids from *Cistus Ladanifer* bee pollen. *Phytochem.* 1992;31:2027-2029.
16. Arráez-Román D, Zurek G, Bäßmann C, Almaraz-Abarca N, Quirantes R, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Annal Bioanal Chem.* 2007;389:1909-1917.
17. Freire KRL, Silva TMS, Santos FAR, Dórea MC, Câmara CA. Estudo químico de pólen apícola (*Apis mellifera*) do nordeste brasileiro. In: Anais da 30ª Reunião Anual

- da Sociedade Brasileira de Química (CD-Rom). Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2007.
18. Guo J, Zhang P, Zhang Z. Studies on chemical constituents from bee-collected rape pollen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009;34:1235-1237.
 19. Campos M, Sabatier S, Amiot MJ, Aubert S. Characterization of flavonoids in three hive products: bee pollen, propolis, and honey. *Plant Med* 1990; 56: 580-581.
 20. Carpes ST, Begnini R, Alencar SM, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Cienc Agrotec*. 2007;31(6):1818-1825.
 21. Herrmann K. On the occurrence of flavonols and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch* 1988; 186: 1-5.
 22. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 577-599.
 23. Matsubara S, Rodriguez-Amaya DB. Conteúdo de miricetina, quercetina e kanferol em chás comercializados no Brasil. *Ciênc Tecnol Alim* 2006; 26: 380-385.
 24. Huber LS, Rodriguez-Amaya DB, Rodrigues MI. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2007; 66: 143-152.
 25. Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. *Quím Nova* 2008; 31: 1378-1384.

26. Huber LS, Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Quantitative variation in Brazilian sources of flavonols and flavones. *Food Chem* 2009; 113: 1278-1282.
27. Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1591-1598.
28. Crozier A, Jensen E, Lean MEJ, McDonald MS. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatog A* 1997; 761: 315-321.
29. Nuutila AM, Kammiorvirta K, Oksman-Caldentey K-M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem* 2002; 76, 519-525.
30. Haaland PO. *Experimental design in biotechnology*. New York: Marcel Decker; 1989.
31. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley; 1978.
32. Barreto LMRC, Funari SRC, Orsi RO. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. In: *Anais do I Congresso de Apicultura del Mercosur*. Punta del Este, 2005; Disponível em: <http://www.culturaapicola.com.ar>
33. Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. Campinas: Casa do Pão Editora; 2005.
34. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 2004; 27: 771-780.

CAPÍTULO 5

Flavonóides em pólen apícola de três estados brasileiros

MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA MARTINS

DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

MARCELO ANTONIO MORGANO

Artigo a ser submetido à Revista Food Chemistry

Flavonóides em pólen apícola de três estados brasileiros

Marcia C. Teixeira Martins^{a,b}, Delia B. Rodriguez-Amaya^{a*}, Marcelo A. Morgano^c

**Endereço para correspondência: ^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, 13083-862, Campinas, SP. Telefone: (19) 3521-4013. E-mail: delia@fea.unicamp.br*

^bCentro Universitário Adventista de São Paulo, Estr. Itapecerica, 5898, 05858-001, São Paulo, SP.

^cCentro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, 13070-178.

Resumo

Acredita-se que a elevada capacidade antioxidante do pólen apícola seja pelo menos em parte decorrente da presença de flavonóides. Neste trabalho quatro flavonóis, miricetina (M), quercetina (Q), kanferol (K) e isoramnetina (I) e duas flavonas, luteolina (L), apigenina (A) foram analisados e quantificados em 36 amostras de pólen apícola desidratado produzidas em três estados brasileiros: Bahia (BA), n=12; Santa Catarina (SC), n=17 e São Paulo (SP), n=7. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna C18. Apigenina não foi detectada em nenhuma das amostras, enquanto quercetina foi a mais frequente, encontrada em quase todas as amostras analisadas. As amostras de SP apresentaram predominância de M, L e Q, BA de Q e I e SC de Q e K. Os teores variaram entre 119 e 5587 µg/g para M; 14,4 e 3429 µg/g para L; 28,1 e 2700 µg/g para Q; 11,6 e 1879 µg/g para I e 70,2 e 3056 µg/g para K, sendo variável também entre amostras do mesmo local.

Palavras-chave: flavonóides, pólen apícola, análise por CLAE.

Summary

The high antioxidant activity of bee pollen is believed to be due, at least in part, to the presence of flavonoids. In the present work four flavonols, miricetin (M), quercetin (Q), kaempferol (K) and isorhamnetin (I) and two flavones, luteolin (L) and apigenin (A) were quantified in 36 dehydrated bee pollen samples from three Brazilian states: Bahia (BA), n=12; Santa Catarina (SC), n=17 and São Paulo (SP), n=7. The analyses were carried out by high performance liquid chromatography with a C18 column. Apigenin was not detected in any sample, while Q was the most frequent, encountered in almost all of the samples analyzed. Miricetin, L and Q predominated in SP samples, Q and I in SC samples and Q and K in SC samples. Flavonoid levels ranged from 119 to 5587 $\mu\text{g/g}$ for M; 14.4 to 3429 $\mu\text{g/g}$ for L; 28.1 to 2700 $\mu\text{g/g}$ for Q; 11.6 to 1879 $\mu\text{g/g}$ for I, and 70.2 to 3056 $\mu\text{g/g}$ for K, variations being also observed between samples from the same site.

Keywords: flavonoids, bee pollen, HPLC analysis.

1. Introdução

O pólen apícola é coletado pelas abelhas operárias quando estas visitam variadas espécies florais, sendo então aglomerado e misturado com néctar e com secreções das glândulas hipofaríngeas (Serra Bonvehí, Soliva Torrentó & Centelles Lorente, 2001; MAPA, 2001). Assim que as abelhas entram na colméia o grão de pólen, preso às suas patas é colhido por meio de aparelhos especiais denominados armadilhas de pólen. O pólen apícola fresco passa por um processo de limpeza, desidratação e embalagem e é comercializado para consumo humano. O produto tem sido estudado quanto à sua composição centesimal (Abreu, 1992; Almeida-Muradian, Pamplona, Coimbra & Barth; Barreto, Funari & Orsi, 2005; Baldi Coronel, Grasso, Pereira, Fernández, 2004; Bastos, Rocha, Cunha, Carvalho & Torres, 2003; Herbert & Shimanuki, 1978; Linskens & Jorde, 1997; Orzáez Villanueva, Díaz Marquina, Bravo Serrano & Blazquez Abellán, 2002; Serra Bonvehí e Escolà Jordà, 1997; Somerville & Nicol, 2002; Szczesna, 2006a; Szczesna, 2006b; Szczesna, 2007a, Szczesna, 2007b) e presença de componentes bioativos (Carpes, Prado, Moreno, Mourão, Alencar & Masson, 2008; Kroyer & Hegedus, 2001, Serra Bonvehí, Soliva Torrentó & Centelles Lorente, 2001).

Contando com uma rica e abundante floração escalonada durante quase todo o ano, o Brasil possui as condições necessárias para tornar-se o principal produtor e exportador de pólen apícola. Atualmente os estados de Santa Catarina (SC) e Bahia (BA), representam dois importantes pólos produtores de pólen apícola com distintas condições climáticas. Em SC o clima é mesotérmico (subtropical úmido) e na BA o clima é tropical ou tropical semi-árido (sendo que a região do município de Canavieiras (BA) produz mensalmente até uma tonelada de pólen desidratado para consumo no mercado nacional (Freire, Silva, Santos,

Dórea & Câmara, 2007). O estado de São Paulo é um dos principais estados consumidores de pólen apícola no Brasil no qual o preço de venda do produto é mais elevado.

O conhecimento do conteúdo de flavonóides em pólen apícola destinado ao consumo humano é de grande interesse para o conhecimento da sua origem botânica floral (Campos, Markham, Mitchell & Cunha, 1997; Campos, Webby & Markham, 2002; Dauguet, Bert, Dolley, Bekaert & Lewin, 1993; Markham, Mitchell & Campos 1997; Tomás-Barberán, Tomás-Lorente, Ferreres & Garcia-Viguera, 1989; Tomás-Lorente, Garcia-Grau, Nieto & Tomás-Barberán, 1992) e para o entendimento do seu papel na saúde humana (Almaraz-Abarca, Campos, Ávila-Reyes, Naranjo-Jiménez, Corral & González-Valdez, 2007; Carpes, Prado, Moreno, Mourão, Alencar & Masson, 2008; Kroyer & Hegedus, 2001; LeBlanc, Davis, Boue, DeLucca & Deeby, 2009; Leja, Mareczek, Wyzgolik, Klepacz-Baniak & Czekonska, 2007; Saric et al., 2009). Estudos mostram que o consumo de flavonóides é inversamente proporcional ao risco de doenças crônico-degenerativas como doenças cardiovasculares e câncer (Hertog, Feskens, Hollman, Katan & Kromhout, 1993; Hollman, 2001; Hollman, Hertog & Katan 1996; Liu et al., 2000).

No Brasil, somente três trabalhos foram realizados sobre os flavonóides presentes em pólen apícola (Carpes, Benigni, Alencar & Masson, 2007; Carpes, Prado Moreno, Mourão, Alencar & Masson, 2008; Freire, Silva, Santos, Dórea & Câmara, 2007). No último foi avaliado o perfil cromatográfico de flavonóides e a origem polínica de amostras do nordeste brasileiro. Carpes, Benigni, Alencar e Masson (2007) determinaram o conteúdo de compostos fenólicos totais de extratos etanólicos de pólen produzido nos estados de Alagoas e Paraná, enquanto Carpes, Prado, Moreno, Mourão, Alencar e Masson (2008) determinaram compostos fenólicos e flavonóides em amostras da região sul do Brasil. Rutina e miricetina foram quantificadas em duas e uma amostra, respectivamente.

Uma vez que o modo de ação e eficácia dos flavonóides variam entre classes de flavonóides e entre membros do mesmo grupo, a identificação e quantificação individual dos flavonóides se fazem necessárias. O objetivo do presente estudo, portanto, foi identificar e quantificar os flavonóides presentes em amostras de pólen apícola produzidas nos dois principais estados produtores de pólen apícola brasileiro (BA e SC) e no principal consumidor de pólen apícola no mercado interno nacional (SP) ao longo de um ano de produção.

2. Material e métodos

2.1. Amostras

Trinta e seis amostras de pólen apícola (com peso variando entre 200 e 300g) prontas para serem comercializadas (produto desidratado, limpo e embalado) provenientes de três estados brasileiros (Bahia, n=12; Santa Catarina, n=17 e São Paulo, n=7) foram adquiridas diretamente dos produtores e recebidas geralmente no mesmo mês da coleta, em sacos plásticos.

Imediatamente ao receber as amostras, estas foram seladas a vácuo usando-se um filme de poliamida e polietileno para evitar absorção de umidade e oxigênio e armazenadas em freezer a -16°C até o momento das análises (no máximo três meses), quando foram quarteadas em quarteador de inox e, em seguida, trituradas em moinho refrigerado, com hélice de tungstênio (M20, IKA Labortechnik, Staufen, Baden, Ge). Em seguida, as amostras foram tamizadas usando-se malhas de 30 mesh (600 μm) para padronizar o tamanho das partículas de pólen.

2.2. Reagentes e padrões

As fases móveis e as amostras foram preparadas utilizando-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bellerica, EUA)). Os solventes metanol e tetrahidrofurano (THF) grau cromatográfico foram adquiridos da Mallinckrodt (Philipsburg, EUA). Ácido ascórbico, ácido fórmico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore (Bellerica, EUA), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina (M), quercetina (Q), luteolina (L), kanferol (K), apigenina (A) e isoramnetina (I) foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonóide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 500 µg/mL e conservadas a -18°C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nessas condições.

2.3. Análise dos flavonóides

Um método avaliado e validado anteriormente foi utilizado (Capítulo 4; Ribani, Bottoli, Collins, Jardim & Melo, 2004). Os limites de detecção obtidos para miricetina, luteolina, quercetina, apigenina, isoramnetina e kanferol foram de 1,04; 0,88; 0,89; 1,64; 0,82 e 1,19 µg/mL, respectivamente. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação de sete replicatas de uma amostra de pólen do

estado de São Paulo, sendo todos inferiores a 5%. As taxas de recuperação para os flavonóides variaram de 90 a 99%.

Todas as análises foram feitas em duplicata. Amostras homogêneas de pólen foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (em proporções de 1:3,5) e ácido ascórbico e homogeneizadas durante 2 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5 g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5 mL de metanol e 5 mL de HCl 5 M. A solução de extração assim obtida consistiu de concentração molar final de HCl 1,0 M em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante (ácido ascórbico). Este extrato foi levado a refluxo a 90°C durante 30 minutos. Esta condição de hidrólise (1,0 M de HCl por 30 minutos) foi previamente otimizada através de um delineamento composto central rotacional (Capítulo 4).

Após a hidrólise os extratos foram resfriados e filtrados em funil sinterizado com porosidade G2. O volume foi completado a 50 mL com metanol e a solução foi homogeneizada manualmente. Uma alíquota de aproximadamente 2 mL foi filtrada em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) da Milipore (Billerica, EUA) de 0,45 µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

A análise cromatográfica foi conduzida em um módulo de separação a líquido (Waters modelo 2690, Milford, EUA), equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), detector de arranjo de diodos (Waters modelo 996, Milford, EUA), controlado pelo Software Millennium 32, sendo a detecção fixada em 370 nm.

Para separação dos flavonóides agliconas foi empregada uma coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) da Waters. O fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL/min e o volume de

injeção de 5 µL. A fase móvel foi composta por metanol:tetrahidrofurano:água 26:57:17, acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática.

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia e pelos espectros obtidos de padrões através do detector de arranjo de diodos.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras e simulando as condições de hidrólise. Para simular as condições após hidrólise do pólen, alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5 mL de água purificada em Mili-Q com ácido ascórbico para obter-se 0,04% na solução de injeção. A esta solução foi adicionado 1 mL de HCl 5M (equivalente a 1,0 M na solução de injeção) e o volume foi completado a 5 mL com metanol. As curvas analíticas passaram pela origem e foram lineares nas faixas de concentração estabelecidas. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,98.

2.4. Análise dos dados

Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Fischer para avaliar diferenças entre os teores de flavonóides obtidos em pólenes provenientes dos estados de SP, BA e SC, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 2.01. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados e discussão

Os cromatogramas das amostras de pólen apícola provenientes de SP, BA e SC são apresentados na Figura 1.

A quercetina foi a aglicona mais frequente, tendo sido encontrada em 35 (97%) das 36 amostras analisadas. Kanferol e isoramnetina também foram encontrados em grande parte das amostras, respectivamente 92% (n=33) e 88% (n= 32). Menos freqüentes foram os flavonóides miricetina e luteolina, presentes respectivamente, em 58% (n=21) e 47% (n=17) das amostras analisadas. A flavona apigenina não foi detectada em nenhuma das amostras estudadas.

As agliconas miricetina, luteolina e quercetina estavam presentes em todas as amostras de SP, enquanto as agliconas quercetina e isoramnetina ocorreram em todas as amostras da BA (exceto por uma amostra, que não continha quercetina) e as agliconas quercetina e kanferol estavam presentes em todas as amostras de SC.

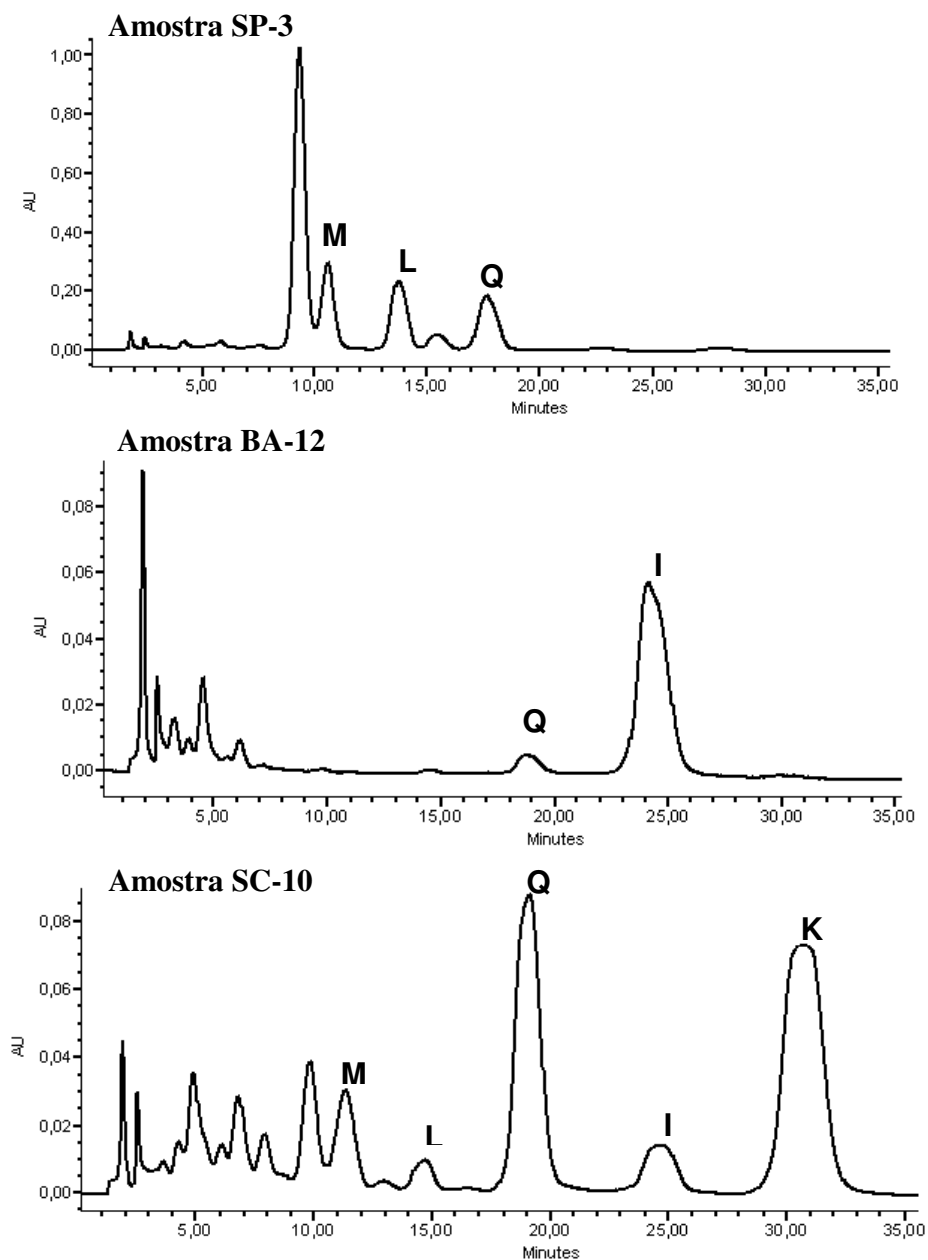


Figura 1. Cromatogramas dos flavonóides agliconas M=miricetina, L=luteolina, Q=quercetina, I=isoramnetina e K=kanferol dos extratos hidrolisados de amostras de pólen apícola desidratado coletadas em São Paulo (SP), Bahia (BA) e Santa Catarina (SC) para coluna Symmetry C18, fase móvel composta por metanol:tetrahydrofurano:água (26:57:17), acidificada com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática.

No trabalho realizado por Freire em 25 amostras de pólen apícola desidratado coletadas no município de Canavieiras (BA) ao longo de dez meses de produção foram identificados, mas não quantificados 8 flavonóides: isoquercetina, miricetina, tricetina, quercetina, selagina, kampferol, isoramnetina e 3-*O*-neohesperosideo isoramnetina, sendo quercetina, isoquercetina, isoramnetina e isoramnetina e 3-*O*-neohesperosideo os flavonóides mais frequentes (Freire, Silva, Santos, Dórea & Câmara, 2007). No presente estudo, os flavonóides miricetina, quercetina, isoramnetina e kanferol também foram encontrados em amostras de pólen produzidas nessa região, sendo isoramnetina presente em todas as amostras e quercetina em 11 das 12 amostras. Luteolina foi identificada em apenas uma amostra de pólen proveniente da Bahia.

Flavonóides foram identificados em pólen apícola nas formas de agliconas (isoramnetina, kanferol, luteolina, miricetina, quercetina, selagina e tricetina) e de glicosídeos de apigenina metilherbacetina, isoramnetina, kanferol metoxilado ou não, miricetina, e quercetina (Tomás-Lorente, Garcia-Grau, Nieto & Tomás-Barberán, 1992; Dauguet, Bert, Dolley, Bekaert & Lewin, 1993; Markham & Campos, 1996; Campos, Markham, Mitchell & Cunha, 1997; Markham, Mitchell, & Campos, 1997; Serra Bonvehi, Soliva Torrentó & Centelles Lorente, 2001; Arráez-Román et al., 2007; Freire, Silva, Santos, Dórea & Câmara, 2007; Guo, Zhang & Zhang, 2009). De fato, o presente trabalho mostrou a presença de glicosídeos e/ou agliconas de isoramnetina, kanferol, luteolina, miricetina, quercetina em nas amostras avaliadas, exceto apigenina.

Os teores dos flavonóides agliconas encontrados nas amostras avaliadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1.

Teores de flavonóides agliconas em 36 amostras de pólen apícola desidratado coletadas nos estados: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC).

Estado		Concentração (µg/g)				
		Miricetina	Luteolina	Quercetina	Isoramnetina	Kanferol
BA	Média ± DP	155 ± 30,4 ^b	nd	191 ± 130 ^c	1201 ± 422 ^a	257 ± 249 ^b
	Mediana	147	nd	161	1189	188
	Intervalo	130 – 211	nd	37,0 – 505	433 – 1879	70,2 – 857
SC	Média ± DP	426 ± 279 ^b	166 ± 158 ^b	1032 ± 713 ^b	290 ± 218 ^b	1323 ± 725 ^a
	Mediana	379	120	851	235	1168
	Intervalo	119 – 912	14,4 – 562	28,1 – 2645	11,6 – 672	258 – 3056
SP	Média ± DP	3281 ± 1312 ^a	1609 ± 1080 ^a	2242 ± 565 ^a	108 ± 76,3 ^b	542 ± 460 ^b
	Mediana	3327	1869	2503	99,2	381
	Intervalo	1933 – 5887	280 – 3429	1262 – 2701	28,5 – 225	135 – 1423
Total	Média ± DP	1300 ± 1617	751 ± 999	1010 ± 911	624 ± 567	867 ± 746
	Mediana	420	218	692	439	631
	Intervalo	119 – 5587	14,4 – 3429	28,1 – 2701	11,6 – 1879	70,2 – 3056

DP= desvio padrão, análise em duplicata; limite de quantificação: miricetina=3,70 µg/mL, luteolina=3,16 µg/mL, quercetina=3,19 µg/mL, isoramnetina=2,95 µg/mL e kanferol=4,25 µg/mL; nd = não detectado, limite de detecção: miricetina=1,04 µg/mL, luteolina=0,88 µg/mL, quercetina=0,89 µg/mL, isoramnetina=0,82 µg/mL e kanferol=1,19 µg/mL. Letras diferentes na mesma coluna identificam amostras com diferença com nível de 95% de significância.

Os resultados do presente estudo mostram uma grande variação qualitativa e quantitativa para os flavonóides em pólen apícola brasileiro, evidenciada pelos altos valores do desvio padrão, grande amplitude entre valores mínimos e máximos e grande diferença entre os valores de médias e medianas dos resultados. Essa constatação já era esperada, uma vez que outros autores também encontraram grandes variações, explicadas pela diversidade da origem botânica dos polens florais (Leja, Mareczek, Wyzgolik, Klepacz-Baiak & Czekonska, 2007; Serra Bonvehí, Soliva Torrentó & Centelles Lorente, 2001).

Os teores de miricetina, luteolina e quercetina foram significativamente mais altos nas amostras de SP, enquanto que os teores de isoramnetina foram mais altos nas amostras da BA e os teores de kanferol foram mais elevados nas amostras de SC.

Das três regiões estudadas, o pólen produzido no estado de São Paulo (cidade de Santa Branca), coletado na região da Mata Atlântica apresentou maior riqueza qualitativa e quantitativa em flavonóides agliconas. Este é o primeiro estudo que avalia a composição de flavonóides do pólen apícola produzido nessa região.

No estudo de Carpes, Prado, Moreno, Mourão, Alencar e Masson (2008), 36 amostras de pólen apícola desidratado provenientes de diferentes localidades da região sul do Brasil, coletadas ao longo de 9 meses apresentaram teores de flavonóides totais entre 2.000 e 28.000 $\mu\text{g/g}$, aproximadamente (método espectrofotométrico). Após classificação das amostras por varredura na região UV-visível os autores observaram a predominância de três grandes tipos de pólen. Deste modo, cada estado foi representado por uma amostra de pólen (levando em consideração também o teor de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante) para avaliação do perfil químico dos extratos etanólicos por CLAE-DAD. Na amostra de Santa Catarina foram identificados e quantificados os flavonóides rutina e miricetina respectivamente com teores de 841 e 695 $\mu\text{g/g}$. A rutina é um glicosídeo de quercetina. No presente estudo algumas amostras provenientes do estado de Santa Catarina apresentaram teores próximos destes valores para quercetina (736 $\mu\text{g/g}$, 851 $\mu\text{g/g}$ e 923 $\mu\text{g/g}$) e miricetina (665 $\mu\text{g/g}$).

Leja, Mareczek, Wyzgolik, Klepacz-Baiak & Czekonska (2007) determinaram o teor de flavonóis totais (método espectrofotométrico, leitura a 360 nm, quercetina como padrão) em amostras de pólen fresco provenientes da Polônia e de 12 espécies vegetais, o qual variou entre 1.710 e 13.490 $\mu\text{g/g}$. Serra Bonvehí, Soliva Torrentó & Centelles Lorente (2001) estudaram os flavonóides agliconas livres presentes em 11 amostras de pólen apícola desidratado (a 40°C durante 110 min), coletadas na Espanha. Treze compostos

fenólicos foram quantificados por HPLC-DAD, dos quais 8 foram ácidos fenólicos. Entre os flavonóides, foram encontrados rutina ($290 \pm 78,9 \mu\text{g/g}$), quercetina ($66 \pm 19,6 \mu\text{g/g}$), miricetina ($33,4 \pm 37,6 \mu\text{g/g}$), kanferol ($11,2 \pm 3,4 \mu\text{g/g}$) e isoramnetina ($6,8 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$). Os teores de flavonóides totais, quantificados por método espectrofotométrico, variaram de 3500 a 7800 $\mu\text{g/g}$ ($5100 \pm 1600 \mu\text{g/g}$).

Serra Bonvehí, Soliva Torrentó & Centelles Lorente (2001) recomendaram uma quantidade mínima de 200 $\mu\text{g/g}$ de rutina em pólen apícola para garantir as qualidades nutricionais e biológicas do produto, requeridas no mercado europeu. No presente estudo, o flavonóide glicosídeo rutina não foi quantificado. No entanto, um total de 26 (72%), das 36 amostras analisadas apresentou teores de quercetina superiores a 200 $\mu\text{g/g}$, incluindo 88% (n=15) das amostras coletadas no estado de Santa Catarina e 100% (n=7) das amostras provenientes do estado de São Paulo, indicando características promissoras para o pólen apícola coletado nessas regiões do Brasil, frente ao mercado europeu.

4. Conclusões

Apigenina não foi detectada em nenhuma das amostras, enquanto quercetina foi a aglicona mais frequente, tendo ocorrido em quase todas as amostras estudadas.

As amostras colhidas nos estados de SP, BA e SC apresentaram perfis de flavonóides, caracterizados por miricetina, luteolina e quercetina para SP, quercetina e isoramnetina para BA e quercetina e kanferol para SC. Ademais, as amostras de SP exibiram altos teores de seus flavonóides, enquanto, as amostras da BA e SC apresentaram teores mais elevados de isoramnetina e kanferol, respectivamente.

A grande variação observada nos teores de flavonóides observada é compatível com a variabilidade das fontes florais disponíveis por ocasião da coleta de cada amostra de pólen apícola.

Os altos teores de flavonóides encontrados nas amostras nacionais tornam o produto atraente para a realização de estudos futuros sobre suas possíveis ações biológicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e ao UNASP pelo financiamento do Projeto.

Referências

- Abreu, M. (1992). El pólen como alimento em la nutrición humana. *Alimentaria*, 235, 45-46.
- Almaraz-Abarca, N., Campos, M.G., Ávila-Reyes, J.A., Naranjo-Jiménez, N., Corral, J.H., González-Valdez, L.S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 119-124.
- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 105-111.
- Arráez-Román, D., Zurek, G., Bäbmann, C., Almaraz-Abarca, N., Quirantes, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Identification of phenolic compounds from

- pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1909-1917.
- Baldi Coronel, B., Grasso, D., Pereira, S.C., Fernández, G. (2004). Caracterización bromatológica Del pólen apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnologia*, 29, 145-181.
- Barreto, L.M.R.C., Funari, S.R.C., Orsi, R.O. (2005). Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. I Congreso de Apicultura del Mercosur. 24-26 de Junho de 2005. Punta del Este, Uruguay. [Access in: apr, 26, 2009] Available from: URL: http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/polen/14_polen_apicola_brasil.pdf (cited 2009 may 17).
- Bastos, D.H.M., Rocha, C.L., Cunha, I.B.S., Carvalho, P.O., Torres, E.A.S. (2003). Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 62, 239-244.
- Campos, M.G., Markham, K.R., Mitchell, K.A., Cunha, A.P.D. (1997). An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochemistry Analysis*, 8, 181-185.
- Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R. (2002). The unique occurrence of the flavone aglycone tricetin in Myrtaceae pollen. *Z. Naturforsch, C* 57(9-10), 944-946.
- Carpes, S.T., Benigni, R., Alencar, S.M., Masson, M.L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 1818-1825.

- Carpes, S.T., Prado, A., Moreno, I.A.M., Mourão, G.B., Alencar, S.M., Masson, M.L. (2008). Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. *Química Nova*, 31, 1660-1664.
- Dauguet, J.C., Bert, M., Dolley, J., Bekaert, A., Lewin, G. (1993) 8-Methoxikanferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochemistry*, 33, 1503-1505.
- Freire, K.R.L., Silva, T.M.S., Santos, F.A.R., Dórea, M.C., Câmara, C.A. (2007). Estudo químico de pólen apícola (*Apis mellifera*) do nordeste brasileiro. In: *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* (CD-Rom), Águas de Lindóia, Brazil.
- Guo, J., Zhang, P., Zhang, Z. (2009). Studies on chemical constituents from bee-collected rape pollen. *Zhonguo Zhong Yao Za Zhi*, 34, 1235-1237.
- Herbert Jr, E.W., Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9, 33-40.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 34, 1007-1011.
- Hollman, P.C.H. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of Science of Food & Agriculture*, 81, 842-852.
- Hollman, P.C.H.; Hertog, M.G.L.; Katan, M. B. (1996) Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Bioactive Compounds of Foods*, 24, 785-789.
- Kroyer, G., Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 171-174.

- LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, T. (2009) Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115, 1299-1305.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekonska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100, 237.
- Linskens, H.F. & Jorde, W. (1997). Pollen as food and medicine – a review. *Economic Botany*, 51, 78- 87.
- Liu, S., Manson, J.E.; Min-Lee, I.; Cole, S.R.; Hennekens, C.H.; Willett, W.; Buring, J.E. (2000). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 7, 922-928.
- Markham, K.R., Campos, M. (1996). 7- and 8-*O*-methylherbacetin-3-*O*-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochemistry*, 43, 763-767.
- Markham, K.R., Mitchell, K.A., Campos, M. (1997). An unusually lipophilic flavonol glycoside from *Ranunculus pollen*. *Phytochemistry*, 45, 203-204.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2001). *Regulamento técnico para fixação de qualidade e identidade do pólen apícola*. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Publicado no DOU de 23/01/01, Seção 1, p. 18-23.
- Orzáez Villanueva, M.T., Díaz Marquina, A., Bravo Serrano, R., Blazquez Abellán, G. (2002). The importance of bee collected pollen in the diet: a study of its composition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53, 217-224.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.

- Saric, A., Balog, T., Sobocanec, S., Kusic, B, Sverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D, Marotti, T. (2009) Antioxidant effects of flavonoids from Croatian *Cystus incannus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 547-554.
- Serra Bonvehí, J., Escolà Jordà, R. (1997). Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 45, 725-732.
- Serra Bonvehí, J., Soliva Torrentó, M., Centelles Lorente, E.C. (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1848-1853.
- Somerville, D. C., Nicol, H. I. (2002) Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42, 1131-1136.
- Szczesna, T. (2006a). Long-chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, 50, 65-78.
- Szczesna, T. (2006b). Protein content and amino acids composition of bee-collected pollen originating from Poland, South Korea and China. *Journal of Apicultural Science*, 50, 91-98.
- Szczesna T. (2007a). Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, 51, 5-13.
- Szczesna T. (2007b). Study on the sugar composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, 51, 15-22.
- Tomás-Barberán, F.A.; Tomás-Lorente, F.; Ferreres, F., Garcia-Viguera, C. (1989). Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47, 337-340.

Tomás-Lorente, F., Garcia-Grau, M.M., Nieto, J.L., Tomás-Barberán, F.A. (1992).
Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. *Phytochemistry*, 31, 2027-2029.

CAPÍTULO 6

Inorganic Contaminants in Bee Pollen from Southeastern Brazil

MARCELO A. MORGANO
MÁRCIA C. TEIXEIRA MARTINS
LUANA C. RABONATO
RAQUEL F. MILANI
KATUMI YOTSUYANAGI
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo submetido à Revista Journal of Agricultural and Food Chemistry

Inorganic Contaminants in Bee Pollen from Southeastern Brazil

Marcelo A. Morgano^{§*}, Marcia C. Teixeira Martins^{#Ψ}, Luana C. Rabonato[§], Raquel F. Milani[§], Katumi Yotsuyanagi[§] and Delia Rodriguez-Amaya^Ψ

[§]Food Science and Quality Center - CCQA, Food Technology Institute - ITAL, Av. Brasil, 2880, 13070-178, Campinas, SP, Brazil.

[#]Adventist University Center of São Paulo - UNASP, Estrada de Itapecerica, 5859, 05858-001, São Paulo, SP, Brazil.

^ΨDepartment of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, C.P. 6121, 1308-862 Campinas, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel: +55 19 3743-1778. Fax: +55 19 3242-4585, E-mail: morgano@ital.sp.gov.br

ABSTRACT

A set of experiments was carried out to validate a method for inorganic contaminants in honeybee collected pollen, consisting of digestion of the samples in a closed microwave-assisted system and quantification of 10 inorganic contaminants by ICP OES. Forty-three samples of Brazilian bee pollen, collected in Southeastern Brazil during a year were analyzed. Determination of these analytes is important both as bioindicators of pollution and to verify the safety of consuming the pollen itself. The method had satisfactory performance, with good accuracy and precision. The ranges of the mean levels were: 10.4 to 268.0 mg/kg for Al, <0.01 to 1.38 mg/kg for As, 2.78 to 17.63 mg/kg for Ba, 0.003 to 0.233 mg/kg for Cd, <0.01 to 1.11 mg/kg for Co, <0.01 to 2.32 mg/kg for Cr, <0.10 to 1.13 mg/kg for Ni, <0.01 to 0.44 mg/kg for Pb, <0.035 to 1.33 mg/kg for Sb, and <0.0004 to 0.0068 mg/kg for Hg. Contamination seemed to occur in the following decreasing order: São Paulo>Minas Gerais>Espírito Santo. Generally higher levels of all studied contaminants was observed in samples produced in an urban site, compared to those of a rural site. Aluminium, Cd, Co, and Pb tended to have higher levels during the dry months (July to October). Ingestion estimates showed that Al and As would have the highest contributions to the adult diet, reaching PTWI (provisional tolerable weekly intake) values of 27% and 8%, respectively, considering a daily portion of 25 g.

KEYWORDS: bee pollen; inorganic contaminants; ICP OES; aluminium; arsenic; cadmium.

INTRODUCTION

With its extensive territory, diversified flora, and favorable climate throughout the year, Brazil has great potential for apiculture (1). Among the apiary's products, the bee-collected pollen has nutritive and therapeutic properties that make it attractive in terms of human health (2-8). It is the major source of protein, lipids, minerals, and vitamins for the bee colony itself (9). More studies are needed on the nutrient and bioactive compound composition of this product to promote its greater production and commercialization in the domestic and international markets. It is also important, however, to verify the presence of contaminants that are harmful to health. Although a good source of nutrient minerals, the pollen can also contain toxic heavy metals (10-16).

On the other hand, increased pollution of the air in both urban and industrial areas has generated growing interest on bioindicator-based techniques for the detection and evaluation of environmental contamination in recent years (17-19). Considering that bee foraging activity generally extends over a superficial area of about 7 km, many authors have proposed apiculture products (honey, pollen, propolis, and wax) and honeybees as bioindicators of chemical pollution brought about by different factors such as metal containing agricultural chemicals, disposal of wastes from mines or mills, industrial emissions and emissions from vehicles, etc. (12, 17-22).

The objectives of this study, therefore, were: (1) validate a method for inorganic contaminants, using digestion of the samples in a closed microwave-assisted system and quantification by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP OES); (2) determine aluminum (Al), arsenic (As), barium (Ba), cadmium (Cd), chromium (Cr), cobalt (Co), nickel (Ni), lead (Pb), antimony (Sb), and mercury (Hg) in samples from different

producing sites in southeastern Brazil; and (3) estimate potential exposure to Al, As, Cd, Pb and total Hg, using the provisional tolerable weekly intake (PTWI).

MATERIALS AND METHODS

Sampling. A total of 43 samples of dehydrated, granulated bee pollen ready for commercialization (dry, clean, packed products) were acquired directly from apiculture producers of 3 Brazilian states of the Southeastern region: São Paulo (SP), Espírito Santo (ES), and Minas Gerais (MG) (**Figure 1**), between 2007 and 2008 during the period of production. The samples weighing 200 to 330 g were taken to our laboratory, within the month of collection, most of which were packed in plastic bags with a few in glass containers.

On arrival, the samples were packed under vacuum in polyamide and polyethylene bags, to avoid absorption of moisture and oxygen, and stored in a freezer at -16°C until the analyses were carried out (maximum of 3 months). On the day of analysis, the samples were quartered in a stainless steel quartering device, ground in a refrigerated mill with tungsten helix (M20, IKA Labortechnik, Wasserburg, Germany). The resulting powder was sieved through a 30-mesh (600 μm) sieve to standardize the particle size of the pollen.

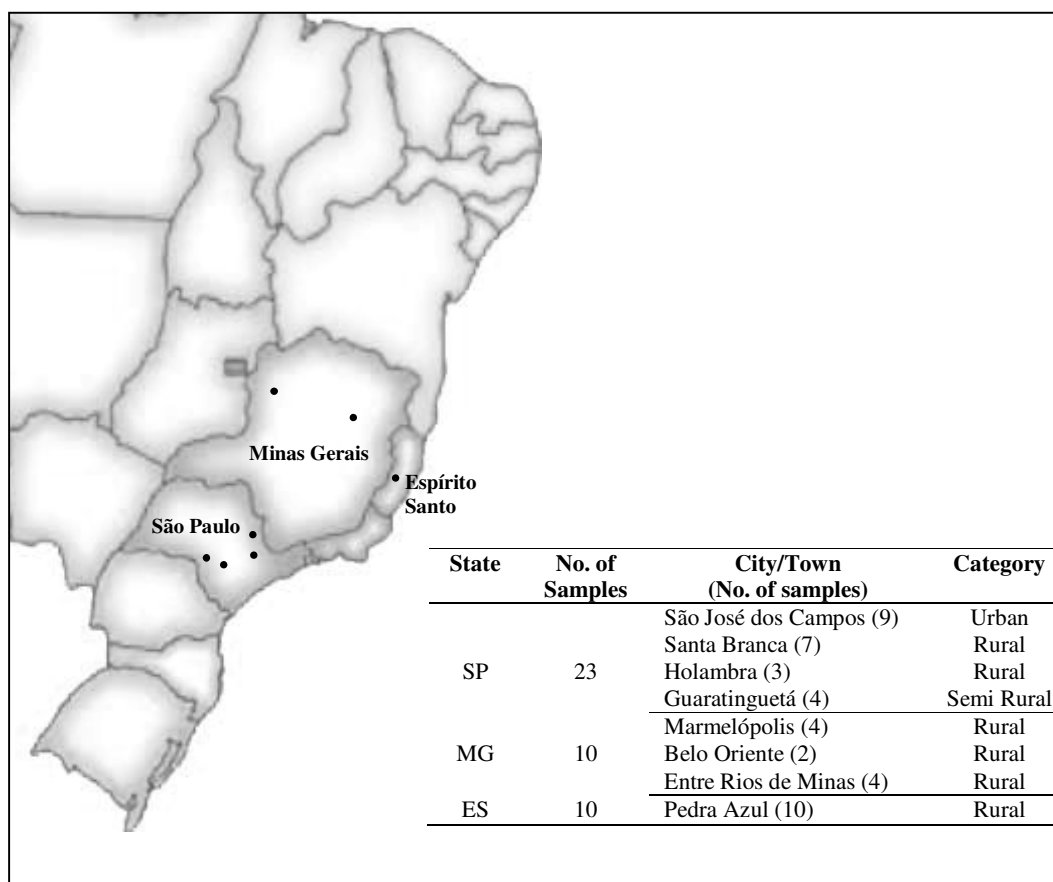


Figure 1: Localization of bee pollen sample collection areas. Southeastern states: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES).

Analytical Method and Instrumentation. The digestion of the samples was carried out in a microwave acid digestion unit (Microwave Digestion System Start D, Milestone, Sorisole, Italy), using HNO_3 and H_2O_2 as oxidizing agents. A sample of 0.65 to 0.70 g was weighed, 10 mL of concentrated HNO_3 was added, followed by 3 mL of 30% H_2O_2 . Digestion was done in two steps, using the following conditions: Step 1- potency = 1000 W, temperature = 180°C , time = 70 min; Step 2 - potency = 1000 W, temperature = 200°C , time = 50 min. After digestion, the sample was transferred to a 25 mL volumetric flask, and the volume was completed with a 5% solution of HCl (v/v).

Quantification of the inorganic contaminants was carried out using an ICP OES (Vista MPX, Varian, Mulgrave, Australia), with axial vision, equipped with a radiofrequency source (RF) of 40 MHz, a simultaneous multielement detector of solid state type CCD (Charge Coupled Device), peristaltic pump, nebulizing chamber, and a nebulizer sea spray. The system was controlled by software ICP Expert, utilizing argon with purity of 99.996 % (Air Liquid, SP, Brasil) as plasma gas liquid. The operating conditions of the ICP OES equipment were: potency, 1000 W; nebulizing rate, 0.9 L/min; flow rate of argon and the auxiliary gas, 1.5 and 15 L/min; integrating and reading times, 10 and 3 s; number of replicates, 3. The wavelengths (nm) used were: Al, 308.215; As, 193.696; Ba, 455.403; Cd, 214.439; Co, 228.615; Cr, 276.653; Ni, 221.648; Pb, 220.353; Sb, 206.834; and Hg, 194.164.

Hydride Generator. For the quantification of total mercury, a hydride generator (VGA77, Varian, Mulgrave, Australia) coupled with ICP OES was used, with argon as carrier gas and for the formation of plasma. For the generation of mercuric hydride, SnCl_2 in 10 mol/L HCl was employed as reductant. The operating conditions were: sample flow rate, 9 mL/min; acid flow rate, 1 mL/min; SnCl_2 25% (m/v) flow rate, 1 mL/min; carrier gas pressure, 350 kPa; carrier gas flow rate, 100 mL/min.

Standard Curves. For the standard curves, a multielement standard solution was prepared in 5% HCl v/v from stock solutions of 1000 mg/L of Co, Ni, Ba, Cd, Cr, Pb, Al (Merck, Darmstadt, Germany), As (High Purity Standards, Charleston, USA), Sb (Specsol, Jacareí, Brazil) and Hg (Qhemis High Purity, Jundiaí, Brazil). The concentration ranges for the standard curves were: 0.005 to 0.5 mg/Kg for Co, Ni, Ba, Cd, As, Cr, Pb, and Sb; 0.05 to 2.5 mg/Kg for Al; and 0.0005 to 0.01 mg/Kg for Hg.

Evaluation of the Method Performance. Because a reference material was not available for bee pollen, recovery tests at two levels were carried out to evaluate the accuracy of the method. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated according to Mermet and Poussel (23). Precision was evaluated through the coefficient of variation of eight repetitions.

Statistical Analysis. In order to verify if the means of inorganic contaminants obtained for the dehydrated bee pollen samples from different states were statistically different at $p < 0.05$, the Tukey multiple comparison test (by the approximation method with different numbers of repetition per state) was applied using the software Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

Calculation of Potential Exposure. For Al, As, Cd, Pb, and Hg, for which provisional tolerable weekly intake (PTWI) values have been established by JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), the percentages of PTWIs were estimated (24-26). This was based on daily portions of 25 g (approximately threeo tablespoons) for adults (considering body weight of 60 kg) and 10 g for children (body weight of 34.5 kg). From the estimated weekly intake, the contribution of each contaminant was calculated and expressed as percentage of PTWI.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Performance. The method for sample preparation using digestion in a closed microwave-assisted system permitted quantification of Al, As, Ba, Cd, Cr, Co, Ni, Pb, Sb, and Hg in a single sample preparation. The residual carbon was 3.7 ± 0.6 g/100 g,

indicating low level of organic matter after digestion of the sample. The digestion time was approximately 120 min.

The performance of the method was good, as shown by the coefficient of correlation (r) equal or close to 1, LOD and LOQ indicating adequate sensitivity for the contaminants analyzed, and satisfactory CVs at the LOQs obtained (**Table 1**).

Results obtained for recovery are shown in **Table 2**, which were within the range of 79 to 123%, mostly close to 100%, indicating adequacy of the analytical method.

Table 1. Performance characteristics of the method for determining bee pollen inorganic contaminants.

element	λ (nm)	r	sensitivity (L mg ⁻¹)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	CV (%)
Al	308.215	0.9998	898	0.03	0.07	5.7
As	193.696	1.0000	52	0.01	0.07	5.1
Ba	455.403	1.0000	540454	0.0004	0.002	2.3
Cd	214.439	1.0000	3215	0.001	0.007	6.7
Co	228.615	1.0000	2310	0.01	0.05	9.1
Cr	276.653	1.0000	3842	0.01	0.06	6.7
Hg	194.164	0.9999	9816	0.0004	0.002	6.4
Ni	221.648	1.0000	375	0.01	0.05	5.9
Pb	220.353	0.9999	328	0.01	0.06	5.5
Sb	206.834	0.9999	127	0.04	0.2	5.0

λ = wavelength; r = coefficient of correlation; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification, n=10, CV = coefficient of variation, n=8.

Table 2. Mean recovery percentages obtained for the elements studied.

element	fortification level (mg/L)	level found ^a (mg/L)	recovery ^a (%)
Al	0.15	0.16 ± 0.01	107
	0.80	0.63 ± 0.02	79
As	0.01	0.008 ± 0.000	80
	0.10	0.096 ± 0.001	96
Ba	0.05	0.061 ± 0.002	123
	0.15	0.148 ± 0.002	99
Cd	0.01	0.009 ± 0.001	87
	0.10	0.088 ± 0.001	88
Co	0.01	0.010 ± 0.000	100
	0.10	0.088 ± 0.003	88
Cr	0.05	0.049 ± 0.003	98
	0.10	0.099 ± 0.004	99
Ni	0.01	0.012 ± 0.002	121
	0.10	0.11 ± 0.002	94
Pb	0.05	0.045 ± 0.003	89
	0.10	0.083 ± 0.002	83
Sb	0.01	0.012 ± 0.000	120
	0.10	0.091 ± 0.004	91
Hg	0.001	0.0009 ± 0.0000	90
	0.010	0.0080 ± 0.0003	80

^a Mean values obtained from 3 replicates.

Levels of the Inorganic Contaminants. The means, standard deviations and ranges of the inorganic contaminant concentrations found in the 43 samples of bee pollen analyzed are presented in **Table 3**. There was very wide within-state variation in the levels of all analytes. Mainly because the levels varied considerably within the same state, the between-

state variation was not significant for Al, As, Ba, Co, Cr, and Hg. MG and SP presented significantly higher levels of Ni and Sb, respectively. Levels of Cd and Pb were also significantly lower in ES.

Aluminium was found in all of the bee pollen samples analyzed (10.4 – 314.9 mg/kg). The Southeastern Brazilian state that presented the highest concentrations was Minas Gerais (14.4–314.9 mg/kg). Aluminium was determined in bee pollen only in this and another Brazilian work (15). The maximum Al concentrations obtained in the present study are similar to those of Santos (15) (<0.05-310.15 mg/kg) in samples collected from the five Brazilian regions. However, Al ranges obtained in the present study are higher than those obtained by Santos (15) for samples from the Southeastern region (<0.05-93.6 mg/kg, SP n=12 and MG n=5) in years previous to the period of our work, indicating a possible increase of environmental contamination of Al in this region.

Aluminium can be found in the environment as a result of acidic precipitation. Acidification of catchments leads to increased Al concentrations in soil and freshwaters, affecting large parts of both the aquatic and terrestrial ecosystems (27-29). Highly versatile, Aluminium has a wide range of applications. It has been used in packing and construction materials, paint pigments, abrasives, cosmetics, food additives and antiacids. This results in wide variation of human contact with the metal and consequent impact on human populations (29).

Table 3. Inorganic contaminants levels in dehydrated bee pollen samples collected in one year in Brazilian Southeastern states.

				inorganic contaminants (mg/kg)									
State	N	n		aluminium	arsenic	barium	cadmium	cobalt	chromium	nickel	lead	antimony	mercury
SP	23	4	average $\pm$ SD	80.3 $\pm$ 89.0 ^a	0.46 $\pm$ 0.50 ^a	6.58 $\pm$ 3.36 ^a	0.051 $\pm$ 0.054 ^a	0.15 $\pm$ 0.22 ^a	0.38 $\pm$ 0.49 ^a	0.71 $\pm$ 0.27 ^b	0.17 $\pm$ 0.13 ^a	0.45 $\pm$ 0.38 ^a	0.0013 $\pm$ 0.0017 ^a
			median	34.4	0.24	5.71	0.033	0.08	0.21	0.71	0.14	0.45	0.0006
			interval	10.4-268.0	<0.01-1.38	2.78-17.63	0.003-0.233	<0.01-1.11	<0.01-2.32	0.10-1.13	<0.01-0.44	<0.035-1.33	<0.0004-0.0068
MG	10	3	average $\pm$ SD	143.1 $\pm$ 122.5 ^a	0.36 $\pm$ 0.47 ^a	5.39 $\pm$ 2.80 ^a	0.023 $\pm$ 0.018 ^a	0.06 $\pm$ 0.04 ^a	0.39 $\pm$ 0.27 ^a	1.75 $\pm$ 1.97 ^a	0.11 $\pm$ 0.12 ^a	0.14 $\pm$ 0.19 ^b	0.0006 $\pm$ 0.0005 ^a
			median	135.8	0.12	5.38	0.019	0.06	0.37	1.07	0.07	0.04	0.0004
			interval	14.4-314.9	<0.01-1.26	0.32-9.83	<0.001-0.062	<0.01-0.12	0.62-0.97	0.12-6.85	<0.01-0.32	<0.035-0.57	<0.0004-0.0016
ES	10	1	average $\pm$ SD	74.9 $\pm$ 56.9 ^a	0.29 $\pm$ 0.58 ^a	2.74 $\pm$ 1.21 ^a	0.007 $\pm$ 0.010 ^b	0.24 $\pm$ 0.42 ^a	0.19 $\pm$ 0.11 ^a	0.63 $\pm$ 0.25 ^b	0.02 $\pm$ 0.03 ^b	0.13 $\pm$ 0.11 ^b	0.0006 $\pm$ 0.0005 ^a
			median	56.3	0.01	2.31	0.001	0.02	0.16	0.65	0.01	0.083	0.0004
			interval	18.9-156.8	<0.01-1.83	1.41-5.10	<0.001-0.025	<0.01-1.22	0.05-0.38	0.12-0.92	<0.01-0.10	<0.035-0.32	<0.0004-0.0020
Total	43	8	general average $\pm$ SD	93.6 $\pm$ 93.9	0.40 $\pm$ 0.51	5.41 $\pm$ 3.22	0.034 $\pm$ 0.044	0.15 $\pm$ 0.26	0.34 $\pm$ 0.38	0.93 $\pm$ 1.04	0.12 $\pm$ 0.13	0.30 $\pm$ 0.33	0.0010 $\pm$ 0.0013
			Median	45.0	0.13	4.91	0.061	0.06	0.21	0.75	0.09	0.15	0.0004
			Interval	10.4-314.9	<0.01-1.83	0.32-17.63	<0.001-0.233	<0.01-1.22	<0.01-2.32	0.10-6.85	<0.01-0.44	<0.035-1.33	<0.0004-0.0068

N= number of samples, n = number of sampling sites. Values with different letters (a, b) in the same column are significantly different with $P < 0.05$.

The principal means of As contamination is through the air and water. Environmental contamination can be due to the use of As-based compounds in agriculture (32). Barium is a heavy metal widely used in the manufacture of glass, ceramics, television picture tubes, fireworks, insecticides, depilatories, etc., and also has many applications in the automotive industries, including rubber production, lubricating oil additives and fuel synthesis. It is part of the composition of urban street dust and is recognized as a valuable tracer for vehicle emissions (33, 34).

Cadmium, present in 79% of the samples, showed a wider range in the present work (<0.001 – 0.233 mg/kg) compared with those encountered in samples from Italy (<0.015 – 0.090 mg/kg, wet weight) (19), United Kingdom (<0.07 – 0.13 mg/kg) and Spain (0.07 – 0.10 mg/kg) (13).

Although all samples presented Cd levels below the Brazilian MTL established for foods, other than juices, syrups, soft drinks and beverages (1.00 mg/kg) (30), it is noteworthy that the five samples with highest levels were from urban or semi-rural areas. Three had Cd levels from 0.102 to 0.126 mg/kg and were collected in an area of preservation and environmental recovery near the urban center of São José dos Campos (SP), an important metal and weapon industrial region. Two samples with Cd levels of 0.104 and 0.233 came from Guaratinguetá, (SP), where the hives were located in a neighborhood, described by the producer as a semi-rural region. A previous work described environmental contamination with Pb and Cd in this region caused by a factory producing lead lingots, through disposal of industrial waste and recycling of batteries (35). It is possible that the presence of Cd in 1/3 of the samples collected in this region is due to remnants of previous contamination, aside from vehicle emissions. Lead was also present in four of these five samples at levels of 0.19 to 0.44 mg/kg.

Ambient air Cd concentrations increases from rural, to urban and industrialized areas. Leita et al. (18) found Cd levels as high as 2.2 mg/kg in bee pollen collected in hives located about 50 m from an extraurban crossroad. Cadmium also reaches water and soil through weathering and erosion of soils and bedrock, atmospheric deposition, direct discharge from industrial operations, leakage from landfills and contaminated sites, and the dispersive use of sludge and fertilisers in agriculture (36). Moreover, antiwear protectants incorporated in lubricants often contain Cd among other metals, which are released to the environment (18).

Co was found in 81% of the samples analyzed. Three samples (one from SP and two from ES) had Co levels above 0.80 mg/kg, the other samples having levels below 0.30 mg/kg. Cobalt is a heavy metal that can either be naturally found in soil, dust, and seawater or it can be released to the environment from burning coal and oil, from cars, trucks and airplane exhausts and from industrial processes that use the metal (37). Atmospheric concentrations of Co tend to be higher in heavily industrialised cities.

Ninety-three percent of the samples had Cr. The levels (<0.01-2.32 mg/kg) varied more than those of Italian samples (<0.030-0.112 mg/kg, wet weight) (19), which the authors considered very low. A total of 74% (n=32) of the samples we analyzed had Cr levels higher than the Brazilian MTL for Cr (0.10 mg/kg) for food (30).

Cromium is found in the air, soil, and water. The pollution of air by this element and its compounds comes primarily from industrial use and product use (eg. combustion activities at utilities and emissions from road dust) (38).

Although Cr is toxic in the hexavalent form, the trivalent form (more stable, found in plants, generally associated with organic complexes) is considered an essential nutrient for

humans, often a limiting mineral in the diet (39). Thus, future studies should determine the form in which this element is present in bee pollen.

Encountered in 100% of the samples analyzed, Ni presented the highest level in MG (0.12 – 6.85 mg/kg), but only one sample from this state had Ni level superior to the Brazilian MTL for foods, other than juices, syrups, soft drinks, beverages and hydrogenated products (5.00 mg/kg) (30). Kump et al. (11) found Ni levels of 2.5 ± 0.5 and 3.1 ± 2.3 mg/kg in samples from Slovenia.

Nickel is released into the atmosphere by power plants, trash incinerators and industries that make or use Ni or Ni compounds (40, 41). In the air it attaches to small particles of dust that settle to the ground or are taken out of the air in rain or snow. It usually takes a long time for nickel to be removed from air.

Lead was present in 63% of the samples analyzed. As with Cd, the state of SP presented the highest levels of Pb (<0.01 – 0.44 mg/kg), but all samples had levels lower than the Brazilian MTL established for majority of foods (0.8 mg/kg) (42).

Kump et al. (11) found Pb levels of 3.5 ± 2.3 by X-ray fluorescence spectrometry and 4.7 ± 0.9 mg/kg by total reflection X-ray fluorescence spectrometry in bee pollen from Slovenia, much greater than those obtained in the present work (<0.01-0.44 mg/kg). It was also reported in other European studies (<0.02-0.329 mg/kg in Italian pollen, 0.3-1.5 mg/kg in British pollen, 0.1-0.14 mg/kg in Spanish pollen) (19,13). Saavedra et al. (14) found a Pb level of 0.268 mg/kg in a fresh bee pollen sample from Venezuela. Santos (15) reported a range of Pb for Brazilian pollen (<0.05-0.41 mg/kg) that is similar to the present work, except one sample from SP that presented a high value (5.69 mg/kg), agreeing with those of Kump et al. (11). According to the authors, this sample was collected from a site near a

manufacturer of automobile batteries that had been fined for contaminating the soil and air with Pb residues.

Fifty-eight percent of the samples had Sb, with values ranging from <0.035 to 1.33 mg/kg. To date there is no reference of Sb levels in bee pollen in the scientific literature. The Sb levels encountered in this work are lower than the Brazilian MTL for foods, other than fruit juices, syrups, soft drinks and beverages (2.00 mg/kg) (30).

Mercury was the least frequent inorganic contaminant, present in 35% of the samples. No sample surpassed the Brazilian MTL for Hg (0.01 mg/kg) (30). Mercury was determined in bee pollen only in this and another Brazilian work (15) in which higher levels of Hg were found for the national range (<0.00012 – 0.01932 mg/kg) and for the Southeastern region (<0.00012 – 0.01652 mg/kg) than the present study (<0.0004 - 0.0068 mg/kg).

Mercury can be transported through long distances, aggregated to particles in suspension in the atmosphere, being considered an indicator of urban and industrial pollution, indicated for global monitoring of pollution. Among the causes of environmental contamination by Hg are: petroleum and other fossil combustibles; eletro-electronic, paint and metal industries; producers of steel and iron; deforestation; gold mines (43, 44). This element can be captured by leaves of plants, in which they cause damage to the roots, aside from interfering with water absorption, photosynthesis and respiration. Its transfer to cultivated soil provokes elevation of its level in the vegetables produced (45). The lower levels of Hg encountered in the present study in relation to those found previously by Santos (15) may indicate a decreasing tendency of urban and industrial pollution with this metal in the Southeastern region of Brazil.

Although presenting the two samples with the highest As (1.83 mg/kg) and Co (1.22 mg/kg) levels, the city of Pedra Azul (ES) showed generally lower levels of inorganic contaminants, with 42% of results below the method's LOD. The corresponding percentages were 28% and 12% for MG and SP samples, respectively, thus indicating higher environmental pollution indexes in these states.

Inorganic Contaminant Levels vs. Location of Apiary. Figure 2 shows the variation during a year of inorganic contaminant levels of bee pollen samples collected from an urban and a rural site in the states of São Paulo and Espírito Santo, respectively. Generally higher levels of all studied contaminants can be seen in samples produced in the urban site. Exceptions were Al in bee pollens produced in January, February, and December, Co and Ni in samples collected in September, and Cr from samples produced in February. No comparisons can be made for samples collected in April and July, since there was no pollen production in the urban site during these months. These results confirm the greater pollution in urban areas and shows that bee pollen can indeed be a bioindicator of environmental pollution.

It may also be observed that Al levels of samples from both sites and As levels from the urban site tended to be higher from July to October. Cd had noticeably higher levels in August to October and Hg in February and March in the samples collected from the urban site. Plausible explanations for these variations during the year can be the subject of future research.

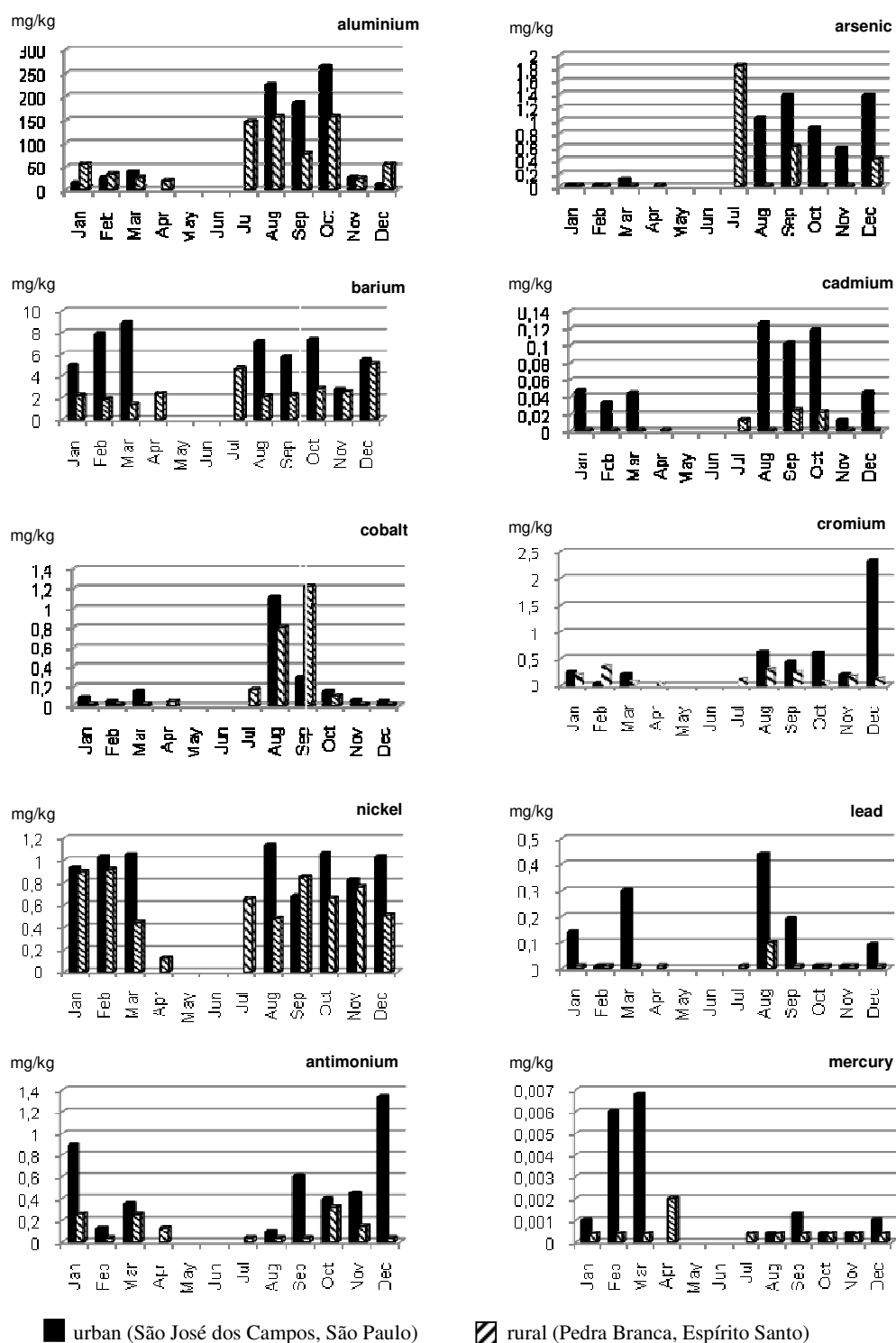


Figure 2. Annual variation of inorganic contaminant levels in bee pollen samples collected in an urban and a rural site in two Brazilian Southeastern states.

Inorganic Contaminant Levels vs. Rainfall. Figure 3 shows inorganic contaminants during the year. Aluminium levels tended to be higher from July to October, Cd from August to November, Co in August and September, and Pb from May to September.

Many factors may contribute to increasing soil Al levels, such as: high pluviometric precipitation rates, which favor Al^{3+} leaching release (46), and the burning of natural shielings which deteriorates soil conditions and results in higher levels of Al (47).

Figure 4 shows pluviometric precipitation levels in the three states during the studied period. It is noticeable that the monthly accumulated precipitation was higher from November to March, inversely related to the Al level in bee pollen, which was higher during the dry period. During rainy periods, soil leaching could favor Al accumulation in the plants, increasing its levels in bee pollen samples collected in the next blossoms that will occur during the dry period.

In Southeastern Brazil, the dry season coincides with winter, and is more prone to air pollution. Since Al, Cd, Co and Pb can be dispersed by air (10, 18, 29, 37), it is also reasonable to suspect that they accumulate in floral sources of bee pollen during the dry months.

Although the other contaminants may also be disseminated through water and/or by air, their levels did not show a definite pattern along the studied period.

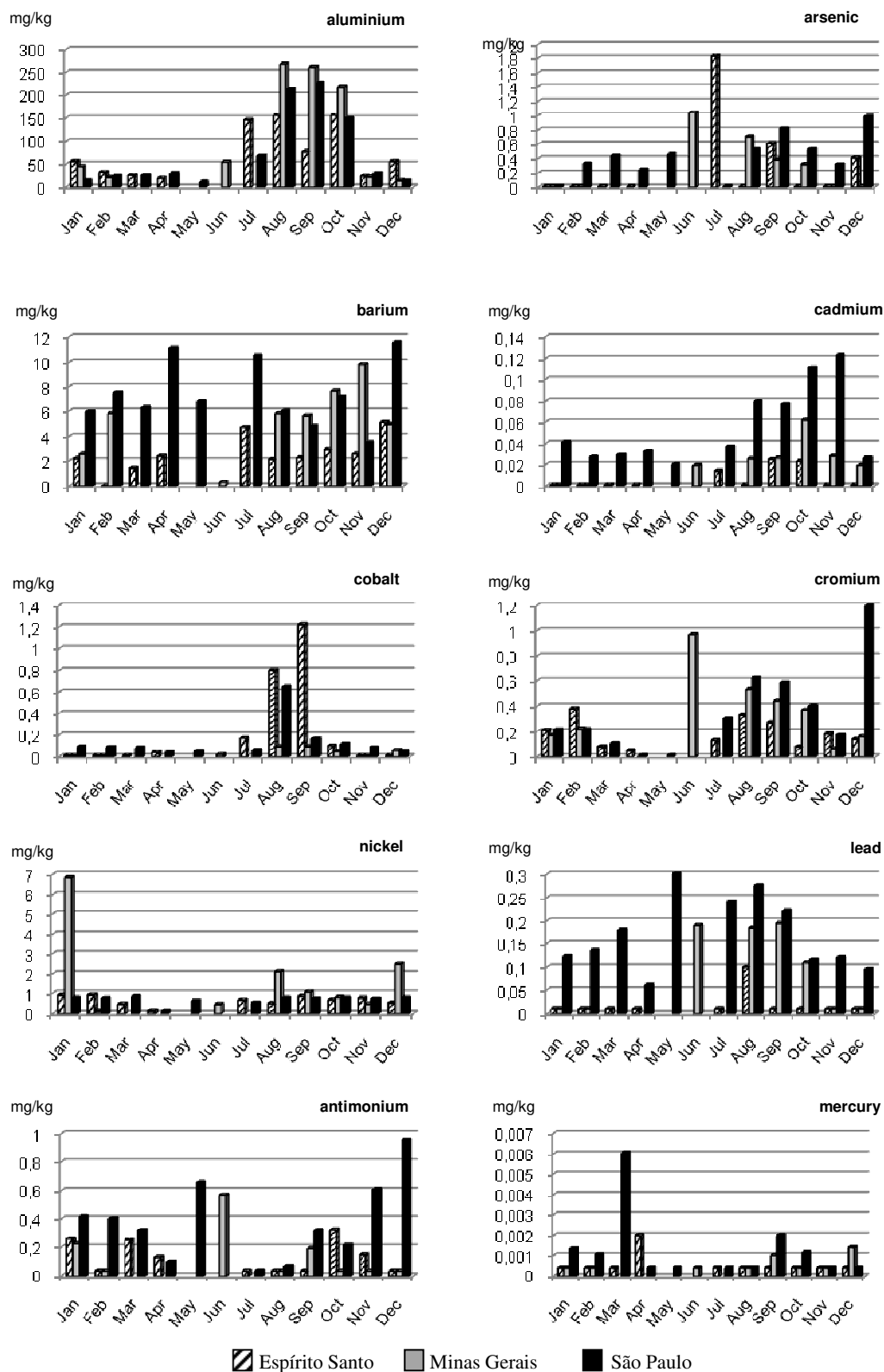


Figure 3. Inorganic contaminant average levels in bee pollen samples from Brazilian Southeastern states during one year.

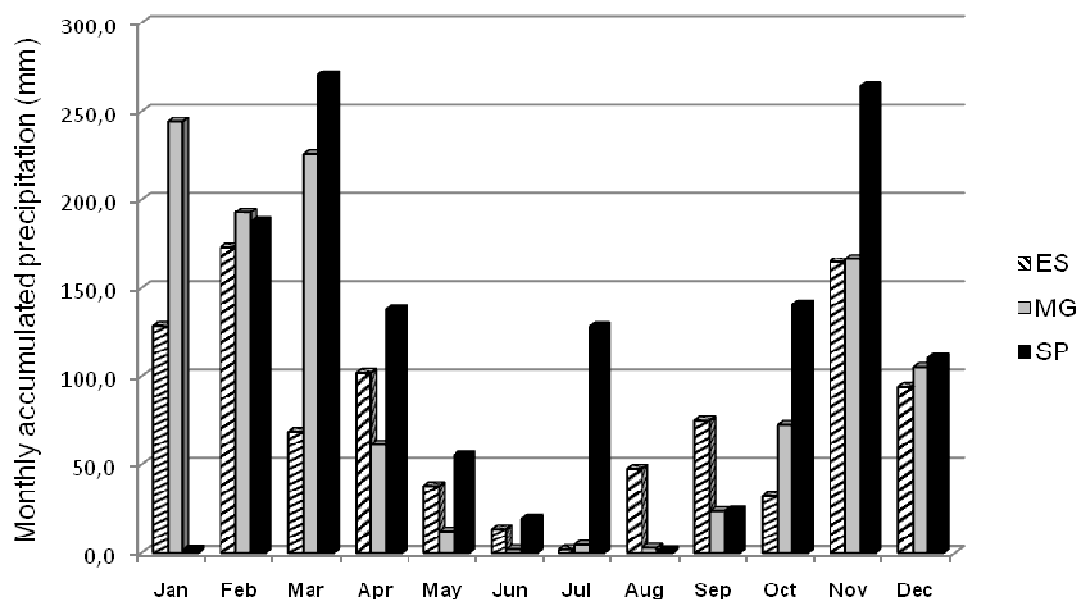


Figure 4. Monthly accumulated precipitation in Brazilian Southeastern states: Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) and São Paulo (SP) states during a year (data conceded by National Institute of Meteorology – INMET).

Risk Evaluation. Table 4 presents the mean levels of some inorganic contaminants, weekly ingestion and percentage of PTWI estimated for the consumption of one daily portion of dehydrated bee pollen. PTWI is expressed on a weekly basis to emphasize the long-term exposure risk to contaminants that may be accumulated in the human body.

Aluminium and As presented the highest possible contribution to the diets, reaching average PTWI values of 27% and 8% for adults and 19% and 5% for children, respectively.

In humans, the toxicity of Al has been associated with clinical complications and neurological dysfunctions, as Alzheimer's disease (49). However, the principal consideration with respect to Al and health is the potential toxicity when exposition is excessive (29).

Table 4. Occurrence of inorganic contaminants, weekly ingestion and percentage of PTWI estimated for the consumption of one daily portion of dehydrated bee pollen of 25 g for adults and 10g for children, based on average values found in 43 samples collected in three Brazilian Southeastern states during a year.

Element	mean level (mg/kg)	weekly ingestion		mean percentage of	
		$\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight ^a		PTWI ^b	
		Adult	Child	adult	child
		average	Average	average	average
Aluminium	93.6	273.1	190.0	27	19
Arsenic	0.40	1.16	0.81	8	5
Cadmium	0.034	0.099	0.069	1	1
Lead	0.12	0.360	0.250	1	1
Mercury	0.0010	0.0028	0.0020	0.06	0.04

^a Adult weight (> 17 years): 60 kg; Child weight (7-12 years): 34.5 kg.

^b Al PTWI level = 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week; As PTWI = 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week; Cd PTWI = 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week; Pb PTWI = 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week; Hg PTWI = 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week (48).

Arsenic exists in nature in a variety of chemical forms that differ in toxicity. The inorganic compounds are toxic, especially in the trivalent (As^{+3}) form, while the organic form has lower toxicity. Future work should investigate the chemical forms of As in the bee pollen samples, as well as the possible sources of contamination in the regions where the element is found.

Based on the levels of Ni encountered in the present work, its contribution to a daily portion (25g) of bee pollen may reach up to 171 $\mu\text{g/day}$. This intake is not negligible if one considers a possible human sensitivity to this element coupled with the fact that Ni is also present in many other food sources (eg. roots, vegetables, grains, bread, cocoa, chocolate, soy beans, oatmeal, nuts, almonds, fresh and dried legumes). Studies have shown that within the range of 600-5600 μg , Ni may provoke hand eczema, when given in single doses as nickel sulphate (50). Among dermatologists it is a general opinion that flare of hand eczema can occur after oral nickel exposure.

CONCLUSIONS

Preparation of the sample by digestion in a closed microwave-assisted system for inorganic contaminants in bee pollen provides satisfactory performance, with good accuracy and precision, allowing simultaneous multielement determination of volatile elements such as Hg, as well as non-volatile elements.

Aluminium, Ba and Ni were the most frequent inorganic contaminants found in all bee pollen samples analyzed, followed by Cr (93%), Co (81%), Cd (79%), Pb (63%), As (60%), Sb (58%), and Hg (35%).

A very wide within-state variation was observed in the levels of all analytes. This explains at least in part the lack of significant between-state variations for Al, As, Ba, Co, Cr, and Hg. MG and SP presented significantly higher levels of Ni and Sb, respectively. Levels of Cd and Pb were significantly lower in ES.

A total of 74%, 18% and 2% of the samples surpassed maximum tolerable levels established by Brazilian regulation for the majority of foods for the elements Cr, As, and

Ni, respectively. All samples presented Cd, Pb, Sb, and Hg levels below maximum tolerable levels.

Markedly high levels of Cd were found in two regions of SP state (one semi-rural and other urban), where there was a previous story of environmental contamination by this element.

Contamination seemed to occur in the following decreasing order: São Paulo>Minas Gerais>Espírito Santo.

Generally higher levels of all studied contaminants can be seen in samples produced in the urban site, confirming the greater pollution in urban areas and showing that bee pollen can indeed be a bioindicator of environmental pollution.

Aluminium, Cd, Co and Pb tended to have higher levels during the dry months, while other inorganic contaminants showed no definite pattern.

If bee pollen is regularly consumed by adults, it may be a vehicle of Al and As, with average doses of 27% and 12% of provisional tolerable weekly intake, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge FAPESP, CNPq and UNASP for providing financial support.

LITERATURE CITED

- (1) Barreto, L. M. R. C.; Funari, S. R. C.; Orsi, R. O. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. In I Congreso de Apicultura del Mercosur, Punta del Este, Uruguay; 2005; <http://www.culturaapicola.com.ar> (retrieved Dec 01, 2009).
- (2) Serra Bonvehí, J.; Escolà Jordà, R. Nutrient composition and microbiological quality of honey-bee-collected pollen in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 725-732.
- (3) Linskens, H. F.; Jorde, W. Pollen as food and medicine – a review *Econ. Botany* **1997**, *51*, 78-87.
- (4) Somerville, D. C.; Nicol, H. I. Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales. *Austr. J. Exp. Agric.* **2002**, *42*, 1131-1136.
- (5) Szczena, T. Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen. *J. Apic. Sci.* **2007**, *51*, 5-13.
- (6) Abreu, M. El pólen como alimento em la nutrición humana. *Alimentaria* **1992**, *235*, 45-46.
- (7) Funari, S. R. C.; Rocha, H. C.; Sforcin, J. M.; Filho, H. G.; Curi, P. R.; Gomes Dierckx, S. M. S.; Funari, A. R. M.; Orsi, R. O. Composições bromatológica e mineral de pólen coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* **2003**, *11*, 88-93.
- (8) Kroyer, G.; Hegedus, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* **2001**, *2*, 171-174.
- (9) Herbert Jr, E. W.; Shimanuki, H. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. *Apidologie* **1978**, *9*, 33-40.
- (10) Bogdanov, S. Contaminants of bee products. *Apidologie* **2006**, *37*, 1-18.

- (11) Kump, P.; Necemer, M.; Snajder, J. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta part B*, **1996**, *51*, 499-507.
- (12) Madras-Majewska, B.; Jasinski, Z. Lead contents of bees, brood and bee products from different regions of Poland. *J. Apic. Sci.* **2003**, *47*, 47-54.
- (13) MAFF UK. *Analysis of bee products for heavy metals*; Food Surveillance Information Sheet No 53; 1995; <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1995/no53/53bee.htm> (retrieved Dec 14, 2009).
- (14) Saavedra, A. R.; Di Bernardo, M. L.; Rondon, C.; Gutiérrez, L.; Saavedra, O.; González, I.; Vit, P. Determinación de plomo en polen apícola de *Brassica napus* L. del Páramo de Misintá, estado Mérida, Venezuela. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"* **2007**, *38*, 6-10.
- (15) Santos, M. L. A. Pólen coletado por *Apis mellifera* no diagnóstico da poluição ambiental causada por praguicidas e metais no Brasil (in Portuguese) *Doctoral thesis*, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005.
- (16) Okuyama, Y.; Matsumoto, K.; Okochi, H.; Igawa, M. Adsorption of air pollutants on the grain surface of Japanese cedar pollen. *Atm. Environ.* **2007**, *41*, 253-260.
- (17) Kevan, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1999**, *74*, 373-393.
- (18) Leita, L.; Muhlbachova, G.; Cesco, S.; Barbattini, R.; Mondini, C. Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination. *Environ. Monit. Assess.* **1996**, *43*, 1-9.
- (19) Conti, M. E.; Botrè, F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contaminations. *Environ. Monit. Assess.* **2001**, *69*, 267-282.

- (20) Staniskiene, B.; Matusevicius, P.; Budreckiene, R. Honey as an indicator of environmental pollution. *Environ. Res. Engin. Manag.* **2006**, *36*, 53-58.
- (21) Behrendt, H.; Becker, W. M.; Friedrick, K. H.; Ring, J. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1997**, *113*, 69-74.
- (22) Kalbande, D. M.; Dhadse, S. N.; Chaudhari, P. R.; Wate, S. R. Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environ. Monit. Assess.* **2008**, *138*, 233-238.
- (23) Mermet, J. M.; Poussel, E. ICP Emission spectrometers: analytical figures of merit, *Appl. Spectrosc.* **1995**, *49*, 12-18.
- (24) FAO/WHO. *Food Standards. Codex General Standard for contaminants and toxins in food and feed*. 1995, Codex Stan 193-1995; <http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do> (retrieved Dec, 10, 2009).
- (25) WHO. *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants*; Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No 776, Geneva, WHO, 1989.
- (26) WHO. *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants*; Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additive Series, No 24, Geneva: WHO, 1989.
- (27) Rosseland, B. O.; Eldhuset, T. D.; Staurnes, M. Environmental effects of aluminium. *Environ. Geochem. Health* 1990, *12*, 17-27.
- (28) Echart, C. L.; Cavalli-Molina, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. *Ciência Rural* **2001**, *31*, 531-541.
- (29) WHO. *Trace elements in human nutrition and health*; Genebra, WHO, 1996.

- (30) Brazilian Ministry of Health. *Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos*; Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965; <http://e-legis.anvisa.gov.br> (retrieved Dec, 13, 2009).
- (31) WHO. *Barium – Health and safety guide*, IPCS – International Programme on Chemical Safety, Health and Safety Guide No. 46. 1991; <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg046.htm#SectionNumber:7.2> (retrieved Dec, 9, 2009).
- (32) Sakuma, A. M. Avaliação da exposição humana ao arsênio no alto Vale do Ribeira (in Portuguese). Doctoral thesis, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- (33) Hopke, P. K. Lamb, R. E.; Natusch, F. S. Multielemental characterization of urban roadway dust. *Environ. Sci. Technol.* **1980**, *14*, 164-172.
- (34) Monassi, F.; Bargagli, R. Barium and other trace metals as indicators of vehicle emissions. *Water, Air, & Soil Pollution* **1997**, *100*, 89-98.
- (35) Okada, I. A.; Sakuma, A. M.; Maio, F. D.; Dovidauskas, S.; Zenebon, O. Avaliação dos níveis de chumbo e cádmio em leite em decorrência de contaminação ambiental na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. *Rev. Saúde Pública* **1997**, *31*, 140-143.
- (36) WHO. *Environmental Health Criteria 134 - Cadmium International Programme on Chemical Safety (IPCS) Monograph*; 1992; <http://www.inchem.org/documentes/ehc/ehc/ehc134.htm> (retrieved Dec, 05, 2009).
- (37) Canadian Ministry of the Environment. *Cobalt in the environment Fact Sheet*; Ontario, Canada, 2001; <http://www.ene.gov.on.ca/cons/3793e.htm> (retrieved Dec, 7, 2009).

- (38) National Academy of Sciences. *Chromium*; Washington, D.C. Printing and Publishing Office, National Academy of Sciences, 1974.
- (39) Anderson, R.A. Chromium as an essential nutrient for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1997**, 26(1 Pt 2), S35-41.
- (40) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) *Nickel*; CAS # 7440-02-0. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2005; <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts15.pdf> (retrieved Dec, 14, 2009).
- (41) Canadian Ministry of the Environment. *Nickel in the environment Fact Sheet*. Ontario; Canada. 2001; <http://www.ene.gov.on.ca/cons/4017e.htm> (retrieved Dec 14, 2009).
- (42) Brazilian Ministry of Health. Portaria nº 16 de 13 de março de 1990: fixa limites máximos de tolerância de chumbo em alimentos. *Diário Oficial da União* 1990, Brasília, Seção I, p. 5436, 15 de março.
- (43) Lacerda, L. D.; Marins, R. V. Anthropogenic Mercury emissions to the atmosphere in Brazil: The impact of gold mining. *J. Geochem. Explorat.* **1997**, 58, 223-229.
- (44) Marins, R. V.; Paula Filho, F. J.; Maia, S. R. R.; Lacerda, L. D.; Marques, W. S. Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. *Quím. Nova.* **2004**, 27, 763-770.
- (45) Nascimento, E. S.; Chasin, A. M. *Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos*. Ed.; CRA: Salvador, 2001.
- (46) Tebaldi, F.L.H.; Silva, J.F.C.; Vasquez, H.M.; Thiebaut, J.T.L. Composição mineral das pastagens das regiões norte e noroeste do estado do Rio de Janeiro. 3. Matéria orgânica, alumínio e pH dos solos. *Rev. Bras. Zootec.* **2000**, 29, 382-386.
- (47) Jacques, A.V.A. A queima das pastagens naturais – efeitos sobre o solo e a vegetação. *Ciência Rural* **2003**, 33, 177-181.

- (48) FAO/WHO. *Evaluation of certain food additives and contaminants*; Technical Report Series 837; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1993.
- (49) Campbell, A. The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2002**, 7, 17-20.
- (50) Flyvholm, M., Nielsen, G. D., Andersen, A. Nickel content of food and estimation of dietary intake. *Z Lebensm Unters Forsch. A* **1984**, 179, 427-431.

CONCLUSÕES GERAIS

1. O pólen apícola brasileiro mostrou uma grande variação na sua composição de umidade, lipídeos, proteínas, cinzas e açúcares entre locais do mesmo estado e entre estados, compatível com o grande número de fatores que interferem na composição deste produto.
2. Os teores de umidade encontrados foram superiores aos exigidos pela legislação brasileira o que aponta para a dificuldade dos apicultores em obter um produto que satisfaça as exigências, especialmente entre os produtores dos estados de Mato Grosso, Piauí, Sergipe e Bahia.
3. Teores expressivos de proteínas e lipídeos encontrados nas amostras de pólen apícola justificam o seu maior uso na alimentação humana desde que um controle efetivo de sua qualidade seja assegurado.
4. O pólen apícola nacional apresentou razão frutose/glicose igual ou superior à do mel e compatível com produtos de moderado a baixo índice glicêmico.
5. O perfil de aminoácidos livres apresentou predominância em prolina, conforme esperado para pólen apícola. A relação entre o conteúdo de prolina e o teor de aminoácidos livres totais foi indicativa de pólen apícola corretamente processado.
6. Para as análises dos elementos minerais e contaminantes inorgânicos, o método de preparo das amostras usando a digestão assistida por microondas em sistema fechado e quantificação pela técnica de espectrometria de emissão ótica em plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) proporciona desempenho satisfatório, com boa

exatidão e precisão para com a determinação simultânea de micro e macroelementos. Além disso, o método permite a determinação tanto de elementos voláteis como Hg, quanto de elementos não voláteis.

7. A composição mineral do pólen apícola apresentou amplas variações dentro dos estados avaliados e entre os mesmos. Potássio, fósforo, cálcio e magnésio foram os componentes majoritários.
8. Em termos de valores médios, o pólen apícola brasileiro pode ser considerado uma fonte rica em manganês e selênio e uma fonte de cobre, fósforo e zinco. Também apresenta a alta relação K/Na.
9. Na análise dos flavonóides em pólen apícola, a melhor condição cromatográfica para separação das agliconas (miricetina, luteolina, quercetina, isoramnetina e kanferol) foi obtida com o uso de coluna de fase reversa C18 Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17), acidificados com 0,3% de ácido fórmico, em corrida isocrática. A análise por superfície de resposta auxiliou na definição da concentração de ácido clorídrico e tempo de hidrólise para obtenção dos flavonóides nas suas formas agliconas (1,0M durante 30 minutos). As condições estabelecidas permitiram a quantificação rápida e confiável dos flavonóides de pólen apícola.
10. Altos teores de flavonóides e grande variação dos mesmos foram observados nas amostras de pólen apícola. Apigenina não foi detectada em nenhuma das amostras, enquanto quercetina foi a mais frequente, sendo encontrada em quase todas as amostras estudadas.

11. Os pólenes apresentaram perfis de flavonóides, caracterizados por miricetina, luteolina e quercetina para SP, quercetina e isoramnetina para BA e quercetina e kanferol para SC.
12. Alumínio, bário e níquel foram os contaminantes inorgânicos mais frequentes, encontrados em todas as amostras de pólen analisadas, seguidos por crômio (93%), cobalto (81%), cádmio (79%), chumbo (63%), arsênio (60%) e antimônio (58%) e mercúrio (35%).
13. As grandes variações nos teores de contaminantes inorgânicos em amostras do mesmo estado tornaram as diferenças entre estados insignificantes, com exceção de níquel e antimônio que foram significativamente mais altos em amostras de Minas Gerais e de São Paulo, respectivamente, e cádmio e chumbo que foram significativamente mais baixos em amostras de Espírito Santo.
14. Um total de 74%, 18% e 2% das amostras ultrapassaram os limites máximos toleráveis de crômio, arsênio e níquel, respectivamente, limites estes estabelecidos pela legislação brasileira para a maior parte dos alimentos.
15. A contaminação por elementos inorgânicos ocorreu na seguinte ordem decrescente: São Paulo>Minas Gerais>Espírito Santo, sendo que níveis mais altos dos contaminantes estudados podem ser encontrados nas amostras produzidas na região urbana, confirmando a maior poluição nestas áreas e mostrando a viabilidade de empregar o pólen apícola como um bioindicador de poluição ambiental.
16. Alumínio, cádmio, cobalto e chumbo tendem a apresentar níveis mais altos durante os meses de menor precipitação pluviométrica, enquanto os outros contaminantes inorgânicos não apresentaram um padrão definido.

17. Se o pólen apícola for regularmente consumido por adultos (porção diária de 25 g), pode ser um veículo de alumínio e arsênio, com teores médios de 27% e 12% da ingestão semanal tolerável provisória, respectivamente.