

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

RENATA ALMEIDA FARIAS

**COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PÓLEN APÍCOLA DE DIFERENTES
BIOMAS**

GUARAPUAVA

2023

RENATA ALMEIDA FARIAS

**COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PÓLEN APÍCOLA DE DIFERENTES
BIOMAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós graduação em Química Aplicada, Área de concentração Química Analítica, Universidade Estadual do Centro Oeste, como requisito parcial à qualificação para obtenção do título de Mestre em Química aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Pércio
Quináia

Coorientador: Prof. Dr. Chalder Nogueira
Nunes

GUARAPUAVA

2023

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

F224c Farias, Renata Almeida
Composição físico-química de pólen apícola de diferentes biomas /
Renata Almeida Farias. -- Guarapuava, 2023.
ix, 58 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada. Área de Concentração:
Química Analítica, 2023.

Orientadora: Sueli Pércio Quináia
Coorientador: Chalder Nogueira Nunes
Banca examinadora: Letícia Malta Costa, Fábio Luiz Melquíades

Bibliografia

1. Pólen. 2. EDXRF. 3. Colorimetria. 4. Capacidade redutora. 5.
Quimiometria. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada.

CDD 543

RENATAS ALMEIDA FARIAS

COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PÓLEN APÍCOLA DE DIFERENTES BIOMAS.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em, 01 de fevereiro de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br LETICIA MALTA COSTA
Data: 01/02/2023 15:54:02-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof^ª. Dr^ª. Leticia Malta Costa (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO LUIZ MELQUIADES
Data: 01/02/2023 21:01:58-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Fábio Luiz Melquiades (UEL)



Prof. Dr. Chalder Nogueira Nunes (Coorientador)



Prof^ª. Dr^ª. Sueli Pércio Quináia (Orientadora)

GUARAPUAVA-PR

2023

AGRADECIMENTOS

A professora Dr^a. Conceição Liberato da Universidade Estadual do Ceará (UECE), pelo carinho, acolhimento, inspiração e apoio. Eu não teria chegado tão longe sem sua ajuda, e pelo auxílio na aquisição dos polens utilizados neste trabalho.

A minha fantástica orientadora, professora Dr^a. Sueli Pércio Quináia, por ter me aceitado como discente. Agradeço por sua empatia, apoio, atenção, conhecimentos compartilhados e por ter tido o prazer de ter a melhor orientadora. Lhe escolheria mil vezes, se fosse possível.

Ao meu coorientador, professor Dr. Chalder Nogueira Nunes, por todos os ensinamentos nos procedimentos da pesquisa, auxílio e ter estado sempre presente no meu projeto, mesmo navegando por águas desconhecidas.

Aos professores Dr^a. Yohandra Reyes Torres, Dr. Pedro Pablo Gonzalez Borrero e Dr. Fabio Luiz Melquiades pelas preciosas contribuições em todas as etapas de desenvolvimento desta dissertação.

Ao presidente da Federação dos Apicultores do Ceará (Fecap), Irineu Fonseca e aos apicultores dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Paraná que contribuíram diretamente com os polens estudados.

Ao aluno do bacharelado em Química Daniel Geffer Salvalaio, que foi peça fundamental na execução desta pesquisa.

A João Lucas T. Vieira, agradeço por ter acreditado no meu potencial e me apoiado nessa jornada, por todas as vezes que chorei de ansiedade e de saudades do Ceará.

As minhas primas e minha mãe que foram minha base de apoio no Ceará e a distância. E também aos meus velhos amigos de Fortaleza, e aos novos de Guarapuava, pelo suporte emocional e experiências compartilhadas, dentro e fora dos laboratórios, por quase uma década.

RESUMO

O pólen apícola é uma matriz formada por pólen floral aglutinado por abelhas operárias comumente utilizado como suplemento alimentar devido a composição rica em nutrientes essenciais a dieta humana e propriedades terapêuticas. Por conseguinte, o presente estudo analisou por técnicas espectroscópicas (ICP, FAAS e EDXRF) o conteúdo mineral de polens provenientes das regiões Nordeste, Sudeste e Sul para criar um *fingerprint* de seus constituintes como um marcador de suas propriedades físico-químicas e possível correlação geográfica, bem como a capacidade redutora dessas amostras. Os polens apresentaram valores médios de inibição de 10,9 a 86,1 %, sem diferença significativa por estado, bioma ou região. O teor de cinzas ficou entre 1,77 e 4,0 % onde os polens do Rio Grande do Norte apresentaram maior teor com significância estatística entre eles e os oriundos dos estados de São Paulo e Paraná. Com relação a cor, houve uma predominância das coordenadas vermelha e amarela no qual as amostras nordestinas apresentaram perfil opaco, escuro e menos avermelhadas em comparação as das regiões Sudeste e Sul. Foram obtidos raios X característicos dos elementos Br, Ca, Cu, Fe, K, Mn, P, Rb, S, Sr e Zn nas amostras, com predominância de K e Ca. A distribuição elementar deu-se por K, Ca, P, Zn e S no Nordeste; Mn, Rb e Fe no Sul, e Cu e Sr no Sudeste. Sugere-se que a acidez do solo foi fator relevante na distribuição elementar e características pedogênicas regionais refletiram na composição dos polens estudados. A exemplo, a predominância de amostras do Sul no eixo do Fe e as do Nordeste na componente principal do K e Ca. O EDXRF foi, portanto, uma técnica viável na avaliação da composição elementar do pólen como uma alternativa rápida e mais ecológica.

Palavras-chave: Pólen. EDXRF. Colorimetria. Capacidade redutora. Quimiometria.

ABSTRACT

Bee pollen is a matrix formed by floral pollen agglutinated by working bees commonly used as a food supplement due to its composition being rich in essential nutrients for the human diet and therapeutic properties. Therefore, the present study analyzed with a spectroscopical approach (ICP, FAAS, and EDXRF) the mineral content of pollens from the northeastern, southeastern, and southern regions to set a fingerprint of their constituents as a marker of their physical-chemical properties and possible geographical correlation. In addition to the scavenging activity of the samples. The pollens presented mean inhibition from 10.9 to 86.1 % with no significant difference by state, biome, or region. The ash content was between 1.77 and 4.00 %, where the pollens from Rio Grande do Norte had the highest content with statistical significance between them and those from the states of São Paulo and Paraná. Regarding color, there was a predominance of red and yellow coordinates in which the northeastern samples had a duller, darker, and less reddish profile when compared to pollens from the southeastern and southern regions. It was found X-rays peaks for the elements Br, Ca, Cu, Fe, K, Mn, P, Rb, S, Sr, and Zn in the samples with a predominance of K and Ca. The elemental distribution occurred as follows K, Ca, P, Zn, and S, in the Northeast; Mn, Rb, and Fe in the South; Cu and Sr in the Southeast. It is suggested that soil acidity was a relevant factor in the elemental distribution and regional pedogenic characteristics reflected in the composition of the studied pollens accounting for the predominance of southern samples in the Fe principal component and the abundance of K and Ca for northeastern pollens. As a result, EDXRF is a feasible technique to assess the elemental composition of pollen as a quick and environmentally friendly alternative.

Keywords: Pollen. EDXRF. Colorimetry. Scavenging activity. Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DO PÓLEN APÍCOLA.....	12
FIGURA 2 – SOLUÇÃO DE DPPH E SUA FORMA REDUZIDA.....	15
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA E ALIMENTOS QUE CONTÉM ESTE FLAVONOIDE	16
FIGURA 4 – RELAÇÃO ENTRE NUTRIENTES E pH DO SOLO	18
FIGURA 5 – DIAGRAMA UNIFORME CIE E A RELAÇÃO DE SUAS COORDENADAS OPOSTAS	20
FIGURA 6 – VARIAÇÃO DE COR DE DIFERENTES POLENS EM PÓ.....	22
FIGURA 7 – PRINCÍPIO DA EMISSÃO DE RAIOS X CARACTERÍSTICOS	23
FIGURA 8 – COMPARAÇÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS DO PERCENTUAL DE CINZAS	34
FIGURA 9 – PASTILHAS DE PÓLEN Prensado e suas variações de cor	35
FIGURA 10 – AMOSTRA PADRÃO EM GRÃOS (CE08).....	36
FIGURA 11 – COMPARAÇÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS DO ESPAÇO DE COR.....	37
FIGURA 12 – GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS.....	38
FIGURA 13 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O EFEITO DOS PARÂMETROS OTIMIZADOS	39
FIGURA 14 – CURVA CINÉTICA DE DECAIMENTO DO RADICAL DPPH.....	39
FIGURA 15 – CURVA ANALÍTICA DA RELAÇÃO ENTRE O % DE INIBIÇÃO E O PADRÃO QUERCETINA	40
FIGURA 16 – ESPECTROS DE RAIOS X DAS 40 AMOSTRAS DE POLENS APÍCOLAS.....	44
FIGURA 17 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DOS ESPECTROS DE RAIOS X	47
FIGURA 18 – DENDOGRAMA DA ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AS AMOSTRAS	49
FIGURA 19 – DIVISÃO DOS AGRUPAMENTOS DE ACORDO COM A RAZÃO ELEMENTAR.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ORIGEM DAS AMOSTRAS DE PÓLEN	24
TABELA 2 – PARÂMETROS AVALIADOS E NÍVEIS ESTABELECIDOS NO DESIGN EXPERIMENTAL	27
TABELA 3 – ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² COM PONTO CENTRAL.....	28
TABELA 4 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS	31
TABELA 5 – RESÍDUO MINERAL POR ESTADO DE ORIGEM DOS POLENS ...	33
TABELA 6 – ANÁLISE UNIVARIADA PARA A VARIÁVEL DEPENDENTE RESÍDUO MINERAL.....	34
TABELA 7 – MÉDIA DAS COORDENADAS DE CORES DE 38 POLENS POR REGIÃO DE ORIGEM.....	37
TABELA 8 – COMPARAÇÃO PELO TESTE DE TUKEY DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS.....	38
TABELA 9 – MÉDIA DA CAPACIDADE REDUTORA DO PÓLEN APÍCOLA POR ESTADO DE ORIGEM	41
TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DOS METAIS, LOD E LOQ EM ug g ⁻¹ PARA PADRONIZAÇÃO EM EDXRF	42
TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO REAL, OBSERVADA EM mg g ⁻¹ E ERRO (%) NA CALIBRAÇÃO DO EDXRF PARA A AMOSTRA CE08 PARA INTEGRATION-FITTING POR PF	43
TABELA 12 – ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA A COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DO PÓLEN APÍCOLA.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 PÓLEN APÍCOLA	12
3.2 CAPACIDADE REDUTORA PELO MÉTODO DPPH	13
3.3 ORIGEM GEOGRÁFICA.....	16
3.4 BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES NO SOLO	17
3.5 COLORIMETRIA	19
3.6 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 RESÍDUO MINERAL FIXO: CINZAS.....	25
4.2 ANÁLISE DE COR DO PÓLEN: COLORIMETRIA.....	26
4.3 CAPACIDADE REDUTORA DAS AMOSTRAS	26
4.3.1 Preparação do extrato do pólen	26
4.3.2 Ensaio com o radical livre DPPH.....	27
4.3.3 Determinação da cinética do tempo ideal de reação e capacidade redutora in vitro pelo método DPPH	28
4.4 PADRONIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PÓLEN PARA CALIBRAÇÃO DO EDXRF	30
4.4.1 Digestão ácida.....	30
4.4.2 Reagentes e soluções	30
4.4.3 ICP-OES	30
4.4.4 FAAS e FAES	31
4.5 ANÁLISE ELEMENTAR POR EDXRF	32

4.5.1 Preparo da amostra	32
4.5.2 Obtenção dos espectros de fluorescência de raios X por energia dispersiva das amostras de pólen	32
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CINZAS	33
5.2 COLORIMETRIA - MÉTODO CIELAB	35
5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DPPH .	38
5.4 CAPACIDADE REDUTORA PELO MÉTODO DPPH	40
5.5 PADRONIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PÓLEN PARA DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS POR EDXRF	42
5.6 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA - EDXRF ..	43
5.7 ANÁLISE MULTIVARIADA E ORIGEM GEOGRÁFICA	45
5.7.1 Correlação entre a composição elementar das amostras de pólen.....	45
5.7.2 Origem geográfica	46
5.7.3 Discriminação por agrupamentos	48
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO

O pólen apícola é um coquetel natural de pólen floral, néctar, enzimas e secreções salivares das abelhas. Conhecido por sua composição rica em nutrientes, ele é um alimento funcional e tem sido particularmente utilizado em pesquisas clínicas para avaliar o impacto do seu uso medicinal (ALGETHAMI *et al.*, 2022).

Proveniente das abelhas, ele é recolhido junto ao néctar quando elas visitam as flores diariamente num raio de até 3 km de distância da colmeia, no qual o pólen atua como fonte de energia necessária para a manutenção da colônia como a busca por alimento e a reprodução (WAGH; PANASKAR, 2014).

Como qualquer outro organismo que prospera em um ambiente aberto, as abelhas são capazes de, ao longo do tempo, acumular seletivamente alguns microelementos e metais tóxicos por fatores alimentares, incluindo ingestão exógena com os componentes da alimentação e a água (BORG; ATTARD, 2020; FEDORUK; ROMANIV; KOVALCHUK, 2015).

O acúmulo involuntário pelas abelhas-operárias se dá devido às suas características corporais que transportam os metais até a colônia atingindo suas matérias primas (DINKOV; STRATEV, 2016; FAO *et al.*, 2021) e o excesso destes elementos é transportado ao longo da cadeia alimentar, sendo portanto, uma ameaça particular à pureza de produtos apícolas (MURASHOVA; TUNIKOV; NEFEDOVA, 2020).

O pólen apícola tem maior parte de sua matriz oriunda de plantas e está sujeito a influência dos minerais que a constituem, uma vez que as plantas necessitam de elementos inorgânicos para sobreviverem e completarem seus ciclos de vida. Desta forma, a avaliação dos elementos de sua composição induz uma melhor compreensão do papel dos minerais e o status de nutrição de uma planta até o alimento consumido (MARGUÍ; QUERALT; DE ALMEIDA, 2022).

Atualmente, obter produtos apícolas seguros e livres de contaminantes e/ou poluentes é de grande importância para a preservação de uma alta atividade bioativa do pólen (FEDORUK; ROMANIV; KOVALCHUK, 2015; KASIANCHUK *et al.*, 2019). Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o conteúdo mineral dos elementos e algumas propriedades físico-químicas do pólen apícola para avaliar sua segurança alimentar e produção em locais livres de poluição.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar polens apícolas brasileiros mediante suas propriedades físico-químicas por técnicas analíticas e estatísticas buscando relacionar a composição mineral e sua possível origem geográfica que podem atuar na marcação de seus constituintes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar o teor de cinzas nas amostras de pólen apícola;
- b) Determinar as espécies inorgânicas presentes no pólen por meio da espectrometria de fluorescência de raios X para obtenção do *fingerprint* de sua composição mineral;
- c) Determinar a cor e suas variações nas amostras de pólen por Colorimetria;
- d) Avaliar a capacidade redutora *in vitro* dos extratos etanólicos de pólen;
- e) Verificar a possível correlação entre cinzas, composição mineral e origem geográfica dos polens.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PÓLEN APÍCOLA

O pólen apícola é um promissor alimento natural para o desenvolvimento de suplementos alimentares devido as suas propriedades nutricionais e terapêuticas, sendo ele caracterizado como uma mistura de pólen de plantas com néctar e secreções das abelhas (LI *et al.*, 2018). Este, difere-se do pólen floral devido ao pólen apícola ser o resultado da aglutinação do pólen das flores, coletado pelas abelhas-operárias, juntamente com néctar e suas substâncias salivares (COELHO *et al.*, 2008). Para melhor compreensão, o processo de coleta e processamento do pólen floral até sua conversão em pólen apícola para consumo está representado na FIGURA 1.

FIGURA 1 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DO PÓLEN APÍCOLA



(1) Coleta do pólen floral; (2) Cestas de pólen aglutinado pelas abelhas; (3) Armadilha de pólen na colmeia; (4) Desidratação do pólen apícola; (5) grãos desidratados para o consumo.

FONTE: O autor (2022).

O consumo de pólen apícola se dá por consumidores envolvidos com estilos de vida orientados para a saúde, consciência ambiental e idosos que buscam seus efeitos na apiterapia por sua conhecida capacidade redutora e demais efeitos terapêuticos (VÉGH *et al.*, 2022).

Desta forma, o pólen é considerado um alimento funcional devido as suas complexas propriedades bioquímicas e uma composição química contendo importantes componentes nutricionais que engloba carboidratos, proteínas, vitaminas, aminoácidos e minerais, estes últimos, em teores expressivos.

Por possuir um leque de metabólitos secundários de plantas como o tocoferol, niacina, tiamina, biotina, ácido fólico, polifenóis, carotenoides, fitosteróis e flavonoides, o pólen possui considerável atividade antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena (colón e próstata), hepatoprotetora, antialérgica, antifúngica e anti-inflamatória. No qual, acredita-se que seu efeito benéfico a saúde seja devido à presença dos compostos fenólicos em sua constituição (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; LI *et al.*, 2018; NURDIANA *et al.*, 2016; SARAIVA *et al.*, 2018).

A composição química do pólen foi estimada por Thakur e Nanda (2020) em mais de 100 estudos publicados desde 2009 em 20 países. Neles, observaram que de seus constituintes 54,22 % são carboidratos, 21,30 % proteínas, 8,75 % fibras, 5,31 % lipídeos e 2,91 % cinzas, além de frutose, glucose e sucrose. Dentre os nutrientes minerais, destacam-se em ordem decrescente o K, P, Ca, Mg, Zn e Fe. Além de vestígios de I, Cu, Mn, Co, Mo, Se, Cr, Ni, Sb, B, F e V (LEGLER, 2002).

Na Europa, 45 amostras de polens gregos e macedônicos foram analisadas em ICP-MS por Zafeiraki *et al* (2022) e observaram que os macro elementos mais abundantes neles foram K (48 %) e o P (32%) seguido pelos elementos traços detectados, Fe (33%), Al (22 %), Zn (16 %), B (12 %), Mn (10 %).

Segundo os autores acima, o pólen pode ser coletado em uma variedade de plantas que podem estar sujeitas a tratamentos agroquímicos, por conseguinte, é inevitável a sua contaminação, contudo, os demais elementos traços representaram menos de 10 % da composição. Além destes, 18 compostos de 242 ingredientes ativos de agrotóxicos foram encontrados sendo predominantes pesticidas e acaricidas. Todavia, as amostras estudadas apresentaram risco negligenciável a saúde humana.

3.2 CAPACIDADE REDUTORA PELO MÉTODO DPPH

A capacidade redutora do pólen apícola está fortemente relacionada aos ácidos fenólicos que influenciam desde sua aparência visual alterando a pigmentação do grão ao sabor, como adstringente e amargo (MARTINELLO; MUTINELLI, 2021). Estes compostos são capazes de contra atacar os efeitos do estresse oxidativo responsável por um considerável número de doenças patológicas como o câncer, Alzheimer, doenças cardiovasculares, diabetes dentre outras causadas por radicais livres que são gerados constantemente causando extensivo dano ao corpo humano (DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016; KOCOT *et al.*, 2018).

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos que possuem elétrons desemparelhados em suas camadas mais externas ou orbitais moleculares que atuam na condução de diversas funções fisiológicas no corpo humano e o seu excesso pode levar a distúrbios de saúde provocados por efeitos inflamatórios em cascata, que podem ser inibidos pela estabilização do radical por substâncias naturais (LALHMINGHLUI; JAGETIA, 2018; QAZI; MOLVI, 2018).

O combate aos radicais livres ocorre por meio de substâncias antioxidantes de origem natural ou sintética. Entre os naturais, incluem-se os compostos enzimáticos como a catalase e não enzimáticos que abrange os minerais, vitaminas e outros importantes compostos bioativos como os flavonoides, carotenoides e os ácidos fenólicos, enquanto os sintéticos mais conhecidos são o BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol), BHT (2,6-diterc-butil-p-creso) e Trolox (ZEHIROGLU; OZTURK SARIKAYA, 2019).

Geralmente oriundo de plantas, os antioxidantes naturais atuam como aditivos alimentares retardando a deterioração de alimentos ao prolongar a vida de prateleira e preservar suas qualidades nutricionais (LAU; WONG, 2019). Eles reduzem a ação oxidativa, perca de nutrientes e mantêm propriedades como a cor, frescura e textura. (GRIFFITHS *et al.*, 2016).

Devido aos antioxidantes sintéticos acumularem no corpo podendo causar câncer e danos ao fígado, os naturais possuem maior apelo ao consumidor pois apresentam maior segurança, melhor ação redutora, baixa volatilidade e maior estabilidade, além de seus potenciais efeitos terapêuticos e nutricionais (DENG; CHENG; YANG, 2011; GRIFFITHS *et al.*, 2016).

Atualmente, um dos métodos mais populares para medir a capacidade redutora em alimentos e plantas é o DPPH, que é baseado no radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, conhecido por sua estabilidade e disponibilidade comercial com forte absorção no espectro visível ($\lambda_{\max} \approx 520$ nm) a depender do solvente escolhido. No qual, através da mudança de cor e concentração do DPPH é feita a quantificação da capacidade sequestrante de radicais de um composto (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012; FOTI *et al.*, 2011).

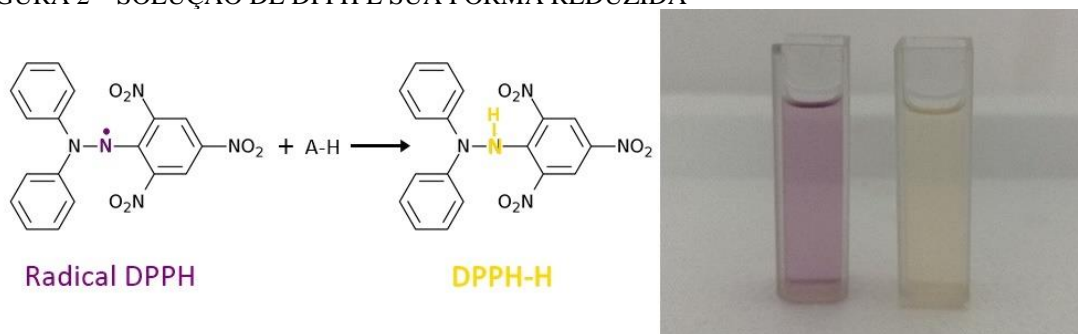
O DPPH atua com um pro-oxidante no qual a capacidade redutora de um composto é dada pela quantidade restante do radical no sistema examinado, este radical é caracterizado pelo deslocamento de elétrons livres que alteram sua cor para violeta ou púrpura com um pico de absorção da cor em 517 nm (DENG; CHENG; YANG, 2011). Desta forma, ocorre a transferência de elétrons de um composto antioxidante para um

oxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006) no qual o [A·] menos reativo interage com o radical livre, e também com o outro [A·] (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012) conforme as equações abaixo:



Na presença de compostos sequestrantes de radicais que podem doar átomos de hidrogênio, a sua cor característica desaparece do sistema reativo originando sua forma reduzida surge resultante do grupo picril ainda presente em solução, a hidrazina reduzida torna a solução amarelo pálido (MOLYNEUX P, 2004) conforme FIGURA 2.

FIGURA 2 – SOLUÇÃO DE DPPH E SUA FORMA REDUZIDA



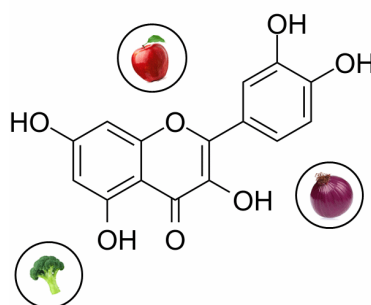
FONTE: O autor (2022).

Assim como os ácidos fenólicos, os flavonoides presentes no pólen também são conhecidos por terem a habilidade de sequestrar radicais livres. Em estudos com o radical DPPH, o flavonoide quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) tem sido particularmente popular devido a sua abundância na dieta humana (FOTI *et al.*, 2011) e sua potente ação antioxidante, sendo ele um pigmento de plantas presente na cebola, uva, brócolis e frutas cítricas (DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016). Por essa razão, este flavonoide é extensivamente usado como padrão analítico na quantificação da capacidade redutora de diversos produtos (FIGURA 3).

O estudo de De Souza e De Giovani (2004) com complexos metal-flavonoide observou que estes complexos possuem maior capacidade redutora quando comparado ao flavonoide livre. A capacidade em logaritmo é linearmente dependente ao potencial oxidante, logo, quanto menor o potencial, maior a capacidade redutora em complexos com quercetina, rutina, galangina e catequina.

No entanto, um aumento da concentração de metais causa uma desaceleração quase linear na cinética do DPPH e essa mudança pode ser atribuída a formação de complexos metálicos com os componentes do sistema em extratos de plantas (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012).

FIGURA 3– ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA E ALIMENTOS QUE CONTÉM ESTE FLAVONOIDE



Fonte: O autor (2022).

Em sua análise comparativa da capacidade redutora da quercetina em chás, Pekal e Pyrzynska (2015) observaram que íons metálicos isoladamente não promovem a inibição do radical DPPH, assim, mudanças nessa propriedade podem ser atribuídas a complexos metal-flavonoide e a redução de sua eficiência depende do tipo de metal e sua concentração.

Os íons são componentes naturais das plantas e suas concentrações em extratos depende de fatores como espécie, tipo de íon, condições de crescimento, contaminação por metais, dentre outros (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012).

3.3 ORIGEM GEOGRÁFICA

Segundo Katerinopoulou *et al* (2020), as fraudes destacam-se entre os fatores que mais afetam a autenticidade e a qualidade de alimentos como mel, laticínios e frutos do mar. Desse modo, conhecer a origem geográfica de um alimento é uma forma de criar uma identidade a produtos de origem agro alimentícia de modo a preservar e fortalecer suas imagens no mercado, pois estes atraem considerável atenção dos consumidores.

As fraudes se caracterizam pela substituição com ingredientes mais baratos que dificultam a detecção por técnicas analíticas, ou a troca de um produto “local” por um que não apresenta as mesmas características de sua suposta origem. A origem geográfica, portanto, remete a atributos únicos tais como propriedades organolépticas específicas, patriotismo do consumidor e busca pela alta qualidade, que asseguram o desenvolvimento

de novos produtos, sua penetração no mercado e formam sua identidade regional (DANEZIS; GEORGIU, 2022; KELLY; HEATON; HOOGEWERFF, 2005).

Apesar da relação complexa entre solo-planta-animal, há uma clara correlação entre solo e plantas que possibilita a verificação da composição e comparação da autenticidade de um produto ou associação a regiões que possuem contaminantes, no qual indicam a presença de poluição local, criando uma imagem negativa para um alimento (DANEZIS; GEORGIU, 2022).

A análise elementar de nutrientes biodisponíveis no solo pode dar informações diretas sobre a origem de alimentos e produtos agrícolas com o auxílio de técnicas espectrométricas como o plasma acoplado indutivamente (ICP) e a absorção atômica por chama (FAAS). Ambas técnicas possuem como característica alta reprodutibilidade e faixa linear adequada para quantificação de diversos elementos, qualidades que possibilitam a obtenção de um *fingerprint* de alimentos e bebidas.

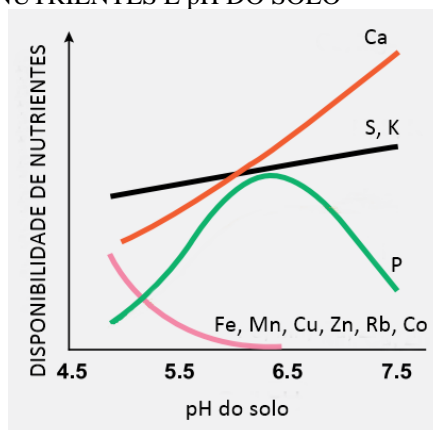
Desse modo, os minerais presentes no pólen apícola podem atuar não apenas como suplemento alimentar para dietas com deficiências de nutrientes essenciais como também ser usado como marcador das características florais e monitoramento da qualidade (LI *et al.*, 2018).

3.4 BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES NO SOLO

De acordo com Gonzalvez; Armenta; De La Guardia (2009), a concentração de elementos traços em alimentos serve como um indicativo do tipo de solo em que a planta foi cultivada. Dentre as propriedades físico-químicas, o pH é uma das características principais que influencia na disponibilidade de minerais e sua absorção pelas raízes das plantas.

Estes minerais, por sua vez, quando disponíveis podem ser transportados para a colmeia pelas abelhas, e por conseguinte, são capazes de alterar as propriedades de seus produtos. Abaixo, há a relação entre o potencial hidrogeniônico e a biodisponibilidade dos nutrientes no solo (FIGURA 4).

FIGURA 4 – RELAÇÃO ENTRE NUTRIENTES E pH DO SOLO



FONTE: Adaptado de GAZEY; DAVIES (2009).

Em solos calcários com $\text{pH} > 6,5$ há baixa disponibilidade de P devido a fixação de fosfatos de cálcio, já em solos com $\text{pH} 5$, esses fosfatos são dissolvidos e o P-mineral se torna mais disponível para as raízes das plantas enquanto que em solos descalcificados, o P está pouco presente devido a maior absorção de fosfatos de ferro (MARTÍNEZ; PSUTY, 2008).

Uma alta acidez no solo favorece a absorção de Rb por plantas vasculares e fungos que apesar de possuir propriedades semelhantes à do K, há uma inversão na relação entre os elementos na razão K:Rb. Embora não ocorra em toda a faixa de acidez, em um solo mais ácido há um favorecimento da absorção do Rb em detrimento ao K (TYLER, 1983).

Com relação ao Sr, sua absorção no solo depende da competição dos íons presentes e que serão absorvidos pelas plantas, preferencialmente na seguinte ordem: $\text{K} > \text{Rb} > \text{Ca} > \text{Sr} > \text{Fe}$, com correlações positivas entre o Sr, Mn, Zn e Cd. Apesar de o Sr competir com o Ca e o K, um solo com pH mais baixo favorece a sua absorção (BURGER; LICHTSCHEIDL, 2019).

Deste modo, não apenas avaliar o pH do solo, mas também compreender as suas características facilita a correção e proporciona maior rendimento em plantações. Em vista disso, para facilitar tal compreensão, no Brasil, os solos são classificados de acordo com seus horizontes e atributos que permitem um melhor entendimento da sua composição pedogênica de acordo com o sistema brasileiro de classificação de solos (SiBCS) por SANTOS *et al* (2018).

Sabe-se que os estados da região sul e sudeste do Brasil são conhecidos por apresentarem um tipo de solo classificado como latossolo roxo, que possui coloração vermelho-arroxeadada com altos teores de Fe. A distribuição geográfica desse tipo de solo se dá nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Minas

Gerais. O latossolo roxo apresenta Fertilidade Potencial para os elementos Mn, Ni, Cu, Zn e Co. No qual Mn, Zn e Cu são essenciais as plantas (KER, 1997), essa fertilidade se manifesta em determinadas condições podendo limitar a capacidade do solo de ceder nutrientes exigindo correções.

No Paraná, 31 % do seu território corresponde ao latossolo vermelho que engloba considerável disponibilidade Fe e Mn (EMBRAPA, 2007), já em Santa Catarina há uma maior predominância do tipo cambissolo com valores de pH variando de fortemente a extremamente ácidos (EMBRAPA., 2004). Em Minas gerais, 25 % do seu solo é derivado do latossolo vermelho-amarelo (AMARAL *et al.*, 2004) onde seus solos são mais amarelos, com a presença de Cu (KER, 1997) e baixos teores de Fe comparado ao vermelho (EMBRAPA., 2004) que gera uma cor intermediária entre as duas cores deste grupo.

Em São Paulo, o latossolo bruno com coloração mais amarelada ocupa 38 % do estado (ROSSI, 2017) com mais teor de goethita do que hematita que altera sua cor, que é oriunda de dois minerais compostos por óxidos de ferro (AMARAL *et al.*, 2004). Já a região do semiárido nordestino que engloba os estados do Ceará, Bahia e Rio Grande do Norte tem em sua composição característica a predominância de latossolos amarelos e vermelho-amarelo, que também apresentam baixo teor de óxidos de ferro (EMBRAPA., 2004; SANTOS, 2017).

Reis *et al* (2020) avaliaram o potencial hidrogeniônico de neossolos litólicos de vários biomas brasileiros, e dentre eles, a caatinga foi a que apresentou maior pH 5,8, neste bioma o neossolo ocupa 19 % da superfície do semi-árido nordestino (SANTOS, 2017). Ao comparar os valores de pH em alguns solos cearenses, Teixeira-Filho (2016) obteve uma variação de 4,30 a 8,71, reiterando a tendência menos ácida do solo no Nordeste comparado as demais regiões do país.

3.5 COLORIMETRIA

A percepção humana das cores sofre alterações de acordo com o indivíduo porque o sensor do olho humano, a retina, não apresenta as mesmas propriedades em toda a sua composição fazendo com que cores distintas sejam observadas para um mesmo objeto. Desta forma, surgiu a colorimetria, a ciência da medida de cores e trabalha com a conversão da cor de respostas subjetivas em um sistema numérico objetivo regido por três fatores: a natureza da

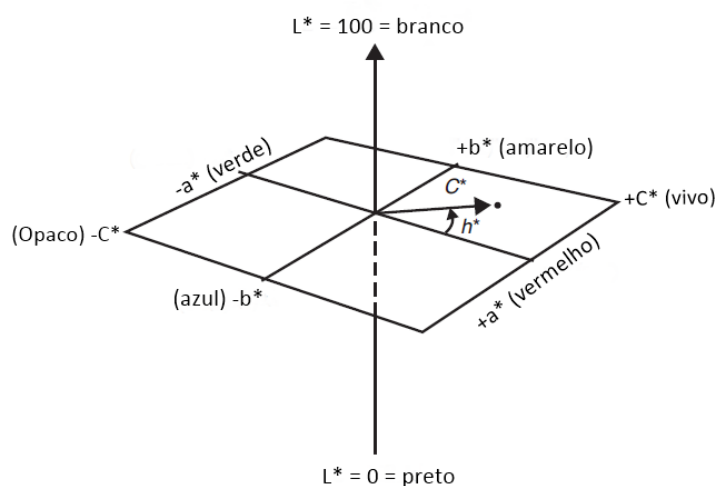
iluminação, as propriedades óticas do objeto e a resposta do olho humano (GILCHRIST; NOBBS, 2000; OLEARI, 2016).

A cor de objetos está associada a quantidades físicas conhecida por estímulo de cor (OLEARI, 2016), no qual, esse estímulo é um fenômeno psicofísico que faz parte do sistema de percepção visual do cérebro e olho e pode gerar erros que não refletem o mundo externo que o compõe (MACDOUGALL, 2010).

A visão da cor é um fenômeno iniciado pelo estímulo da cor com a interação entre a radiação eletromagnética e o sistema visual. Devido ao cone de visão humano ser tri cromático, uma mistura da luz azul, vermelho e verde, outras cores intermediárias podem ser produzidas ao variar a intensidade relativa destas três luzes (STOCKMAN, 2004), além dos subsequentes mecanismos de processamento pós-retina: acromático (claro e escuro) e cromático (vermelho-verde e amarelo-azul) (MACDOUGALL, 2010).

Por consentimento de diversos países foram estabelecidas recomendações com relação aos padrões básicos de cor, em acordo com a CIE 1931 (COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE, 2004), para que se obtivesse uma base normalizada para especificar as cores em quantidades mensuráveis. Para tal, o sistema CIE $L^* a^* b^*$ conhecido como CIELAB foi criado baseado no sistema tri cromático substituindo o estímulo visual das cores primárias (azul, verde e vermelho) por coordenadas matemáticas que independem do observador (FIGURA 5).

FIGURA 5 – DIAGRAMA UNIFORME CIE E A RELAÇÃO DE SUAS COORDENADAS OPOSTAS



FONTE: Adaptado de MACDOUGALL (2010).

Neste sistema, a diferença de cor é um vetor da distância euclidiana entre dois pontos de cores no espaço que as representa e o espaço CIELAB tem o objetivo de comparar objetos de mesmo tamanho e formato contra um fundo neutro naturalmente cinza (SCHANDA, 2007).

Para tal, as coordenadas matemáticas em pares são representadas por eixos em um espaço tridimensional em extremidades opostas (OLEARI, 2016).

O eixo vertical x representa a iluminação, 100 para uma amostra perfeitamente branca e 0 para um objeto perfeitamente preto. Valores positivos de a^* e b^* representam vermelho e amarelo, respectivamente, enquanto que os negativos representam verde (a^*) e azul (b^*). Além do sistema $L^* a^* b^*$ há também o $L^* C^* h^*$, no qual a saturação C^* indica cor mais opaca ($-C^*$) ou vívida ($+C^*$) e h^* o ângulo da tonalidade.

Para determinar características colorimétricas de um material é necessário um padrão de referência, uma geometria de medida, um padrão de iluminação e do observador (SCHANDA, 2007). Contudo, as medidas nem sempre refletem a visão do observador, por isso, o CIE e seu sistema de padronização utilizam essas medidas geométricas para se aproximar de como vemos os materiais (GILCHRIST; NOBBS, 2000).

Por sua uniformidade de cor e proximidade ao olho humano, o sistema CIELAB é comumente utilizado para a medição de alimentos, uma vez que a cor é o primeiro parâmetro de qualidade avaliado pelos consumidores e pode indicar o grau de aceitação destes antes da consumação de um produto (MARKOVIC *et al.*, 2013).

Por ser um alimento, o pólen apícola apresenta variedades de cores que são influenciadas pelos compostos bioativos que o compõe e que atuam na decisão final do consumidor, dentre estes pode-se citar os carotenoides e antocianinas. A perda do brilho natural do pólen floral ocorre pela adição de umidade e de substâncias como o néctar, para formar grãos de pólen apícola (SATTLER *et al.*, 2015; THAKUR; NANDA, 2020) podendo apresentar diferença de cor em amostras coletadas na mesma fonte botânica, assim como o de diferentes flores pode ter coloração semelhante.

A condição de preparo e desidratação do pólen afeta sua coloração devido a oxidação de seus compostos bioativos. Assim, após pulverizado, há uma predominância de altos valores de L^* e b^* com prevalência de tons amarelados (THAKUR; NANDA, 2020) conforme a FIGURA 6. Portanto, o uso do sistema CIELAB tem sido relatado na literatura para comparação de sua coloração como uma nova ferramenta de investigação de suas propriedades físico-químicas.

FIGURA 6 – VARIAÇÃO DE COR DE DIFERENTES POLENS EM PÓ



FONTE: O autor (2022).

3.6 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Em boa parte da literatura, a análise do conteúdo mineral para a determinação de metais se dá por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e pela espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES e ICP-MS) sendo raras pesquisas envolvendo a análise de pólen apícola brasileiro por fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) visando avaliar sua composição mineral.

A fluorescência tem progressivamente se tornado um método efetivo de obter registros elementares de alta resolução por ser uma técnica não destrutiva e de medições quase contínuas, tendo ela se estabelecido como uma vantagem em comparação a outras técnicas espectroscópicas (MCCOMB *et al.*, 2014).

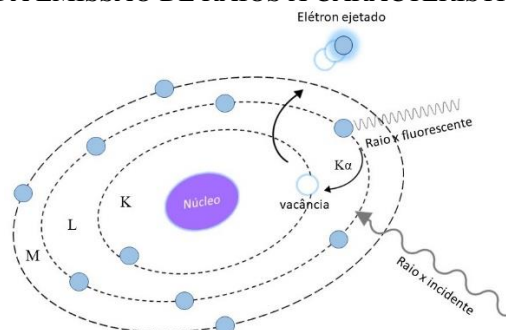
A fluorescência de raios X é uma técnica analítica bem estabelecida e com um longo histórico de pesquisas em diversos campos e aplicações ao qual apresenta uma boa precisão quantitativa e alta sensibilidade na investigação de metais devido a sua capacidade multielementar (KASIANCHUK *et al.*, 2019; TSUJI *et al.*, 2011).

O uso dessa metodologia em amostras vegetais oferece a vantagem de ser rápida, requerer mínimo pré-tratamento da amostra (MARGUÍ; QUERALT; DE ALMEIDA, 2022) e não exigir o uso de reagentes químicos prejudiciais ao ambiente, além de poder ser usado na caracterização multielementar de diferentes matrizes com as mesmas curvas de calibração (GHIDOTTI *et al.*, 2021).

O princípio da fluorescência de raios X está relacionado à excitação da radiação para produzir a ionização das camadas internas dos átomos presentes na amostra devido a absorção do efeito fotoelétrico, já o equipamento de EDXRF consiste de uma fonte de excitação e um sistema detector, que combinados com um analisador multicanal, permitem serem determinados todos os raios X de uma amostra ao mesmo tempo com

grande velocidade na aquisição das informações. (DÍA-GARCÍA; BADÍA-LAÍÑO, 2019) ilustrado na FIGURA 7.

FIGURA 7 – PRINCÍPIO DA EMISSÃO DE RAIOS X CARACTERÍSTICOS



Fonte: O autor (2022).

A fluorescência relaciona a intensidade da fonte de raios X primários de cada elemento com sua concentração na amostra gerando um *fingerprint* único para elementos específicos. Embora seja uma técnica útil, há desvantagens como interferência de elementos, sobreposição de picos e danos a amostra após longa exposição aos raios X (FENG; ZHANG; YU, 2021).

Contudo, para Panebianco *et al* (2022), que fez determinações em tomates sicilianos, a fluorescência associada a procedimentos estatísticos cria uma sólida base para a caracterização elementar, auxiliando na rastreabilidade mineral com resultados confiáveis e representando uma alternativa rápida e viável comparada a técnicas como o ICP-MS.

Com ampla aplicação na literatura desde artefatos arqueológicos a alimentos no geral, o EDXRF apresenta alta empregabilidade e precisão na análise de componentes inorgânicos em análises qualitativas, sendo, portanto, uma alternativa útil na avaliação dos componentes minerais de produtos apícolas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de pólen apícola foram provenientes das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil e foram adquiridas diretamente com apicultores, no comércio local e online. As informações sobre suas origens constam abaixo, bem como o bioma predominante na região de coleta de acordo com os dados do portal Infosanbas (2022) (TABELA 1):

TABELA 1 – ORIGEM DAS AMOSTRAS DE PÓLEN

(continua)				
Amostra	Florada	Cidade	Bioma	Estado
RN01	Heterofloral	Maxaranguape	Mata Atlântica	RN
RN02	Heterofloral	Maxaranguape	Mata Atlântica	RN
CE03	Mufumbo e Jurema Branco	Novo Oriente	Caatinga	CE
BA04	Heterofloral	Canavieiras	Mata Atlântica	BA
BA05	Coqueiro	Canavieiras	Mata Atlântica	BA
SC06	Heterofloral	Ararangua	Mata Atlântica	SC
PR07	Heterofloral	União da Vitória	Mata Atlântica	PR
CE08	Coqueiro	Trairi	Caatinga	CE
PR09	Heterofloral	Guarapuava	Mata Atlântica	PR
RN10	Heterofloral	Mossoró	Caatinga	RN
PR11	Heterofloral	Campo Largo	Mata Atlântica	PR
RS12	Heterofloral	São Gabriel	Pampa	RS
SC13	Heterofloral	Sombrio	Mata Atlântica	SC
PR14	Heterofloral	Cambará	Mata Atlântica	PR
PR15	Heterofloral	Congonhinhas	Mata Atlântica	PR
SC16	Heterofloral	Não identificado	Indisponível	SC
RS17	Heterofloral	Alpestre	Mata Atlântica	RS
SP18	Heterofloral	São Paulo	Mata Atlântica	SP
MG19	Heterofloral	Juiz de Fora	Mata Atlântica	MG
PR20	Heterofloral	Curitiba	Mata Atlântica	PR
SP21	Heterofloral	Ribeirão Preto	Cerrado	SP
SP22	Eucalipto	Salesópolis e Cabreúva	Mata Atlântica	SP

TABELA 1 – ORIGEM DAS AMOSTRAS DE PÓLEN

(conclusão)

Amostra	Florada	Cidade	Bioma	Estado
MG23	Heterofloral	Itapecerica	Mata Atlântica	MG
NI24	Heterofloral	Não identificado	Indisponível	NI
PR25	Bracatinga	Rio Azul e Prudentópolis	Mata Atlântica	PR
PR26	Heterofloral	Ortigueira	Mata Atlântica	PR
MG27	Heterofloral	Formiga	Cerrado	MG
SP28	Heterofloral	Pilar do Sul	Mata Atlântica	SP
SP29	Heterofloral	Pariquera-Açu	Mata Atlântica	SP
SP30	Heterofloral	Franca	Cerrado	SP
SP31	Heterofloral	Indaiatuba	Mata Atlântica	SP
SP32	Heterofloral	Piracaia	Mata Atlântica	SP
MG33	Heterofloral	São Lourenço	Mata Atlântica	MG
PR34	Heterofloral	Lapa	Mata Atlântica	PR
PR35	Heterofloral	Campina Grande do Sul	Mata Atlântica	PR
PR36	Heterofloral	Mandirituba	Mata Atlântica	PR
NI37	Heterofloral	Não identificado	Indisponível	NI
PR38	Heterofloral	Lapa e Curitiba	Mata Atlântica	PR
PR39	Heterofloral	Cerro Azul	Mata Atlântica	PR
PR40	Heterofloral	Lapa	Mata Atlântica	PR

LEGENDA: NI - Não identificado

FONTE: O autor (2022).

4.1 RESÍDUO MINERAL FIXO: CINZAS

O teste foi realizado em triplicata pelo método gravimétrico com a metodologia adaptada da ISO 936:1998 da Organização Internacional para Normalização descrita no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2019).

Pesou-se individualmente cadinhos de porcelana previamente secos em forno de mufla da marca Spencer modelo SP2707-21 a 550 °C durante 20 minutos e posteriormente esfriados em dessecador até temperatura ambiente. Em seguida, 2 g da amostra pulverizada e homogeneizada em gral com pistilo foi pesada no cadinho.

A calcinação procedeu gradualmente, com aumento da temperatura de 100 °C a cada 1 hora, até atingir 550 °C ± 25 °C em forno de mufla mantendo a amostra por no mínimo 4 horas na temperatura máxima para obtenção de cinzas claras. Todas as pesagens foram realizadas em balança ultra analítica de modelo Shimadzu AUW220D.

4.2 ANÁLISE DE COR DO PÓLEN: COLORIMETRIA

Para a determinação da cor do pólen utilizou-se um colorímetro portátil (CR-400/410 Chroma Meter, Konica Minolta). Uma pequena quantidade da amostra de pólen em pó foi adicionada diretamente ao colorímetro e a média de três medidas colorimétricas foram obtidas pelo método CIELab que levam em consideração o sistema de coordenadas descrito pela Commission Internationale de L'éclairage (2004).

A diferença de cor pode ser definida por comparação numérica da cor de uma amostra contra um padrão ao qual sugere uma diferença em coordenadas absolutas de cor matematicamente referenciado pelo valor de delta (Δ). As coordenadas de cores representam: L* luminosidade, a* vermelho-verde, b* amarelo-azul, C* croma (saturação) e h* tonalidade. A variação entre duas cores foi dada pela distância entre dois pontos de cor ao qual é representada por ΔE^*_{ab} .

As coordenadas de cores entre duas amostras diferentes foram comparadas usando seus valores de L*1, a*1, b*1, C*1 e L*2, a*2, b*2, C*2 respectivamente. A diferença de coloração foi calculada a partir do teorema matemático de Pitágoras conforme a fórmula abaixo onde um pequeno valor de ΔE^*_{ab} sugere que as cores são próximas entre si.

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

4.3 CAPACIDADE REDUTORA DAS AMOSTRAS

4.3.1 Preparação do extrato do pólen

A preparação do extrato etanólico de pólen (EEP) seguiu a metodologia de CARPES *et al* (2007). Para cada amostra, 2 g de pólen previamente macerado foram homogeneizados e extraídos com 15 mL de etanol P.A (70 % v/v), em temperatura ambiente e sob agitação constante por 30 min. Em seguida, filtrado em papel-filtro Unifil

C41 11 mm e os extratos obtidos foram armazenados em tubos tipo Falcon de 15 mL a 0 °C para posterior determinação da capacidade redutora.

4.3.2 Ensaio com o radical livre DPPH

A determinação da capacidade redutora foi adaptada do método analítico de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) que se baseia na redução do radical estável DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Um design experimental foi conduzido para otimizar os volumes dos reagentes através de um planejamento fatorial 2² por superfície de resposta visando obter as melhores condições para a quantificação do percentual de inibição dos compostos antioxidantes.

Executou-se um planejamento fatorial 2² com ponto central para otimização dos volumes relativos das soluções de extrato de pólen e do radical DPPH a serem utilizados no ensaio através do modelo de delineamento composto central. A melhor combinação das duas variáveis independentes foi determinada e seus efeitos e interações avaliados (TABELA 2).

TABELA 2 – PARÂMETROS AVALIADOS E NÍVEIS ESTABELECIDOS NO DESIGN EXPERIMENTAL

Parâmetros avaliados	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)	Ponto central
Volume de extrato (µL)	20,00	50,00	35,00
Volume de DPPH (µL)	2000	3500	2750

FONTE: O autor (2022).

Para a realização do experimento foi utilizada a amostra PR40 por apresentar a coloração visualmente mais escura baseado no pressuposto de PONTIS *et al* (2014) que apresentou uma correlação positiva entre capacidade redutora e a intensidade da cor em méis. Pesou-se 2,40 mg de DPPH, o qual foi dissolvido em etanol PA e avolumado em um balão volumétrico de 100 mL, para uma concentração final de 6×10^{-5} mol L⁻¹, a solução estoque de DPPH foi coberta com papel alumínio e armazenada sob refrigeração para conservação até seu uso.

Realizaram-se 13 ensaios com volumes pré-definidos pelo planejamento fatorial (TABELA 3) onde o volume final foi ajustado com etanol até completar 4 mL em um tubo de ensaio. Uma solução controle foi preparada para a leitura da absorbância inicial

de cada ensaio, que constituiu do volume da solução de DPPH, descrito no planejamento, a substituição do volume de extrato por água ultrapura e ajustado com etanol.

As soluções ficaram em repouso por 30 minutos protegidas com papel alumínio da exposição à luz, transcorrido o tempo, a solução foi transferida para uma cubeta de vidro e sua absorbância lida em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP 2000UV) a 517 nm.

TABELA 3 – ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2² COM PONTO CENTRAL

Ensaio	Extrato (µL)	DPPH (µL)
1	20,00	2000
2	50,00	2000
3	20,00	3500
4	50,00	3500
5	15,00	2750
6	50,00	2750
7	35,00	1700
8	35,00	3800
9	35,00	2750
10	35,00	2750
11	35,00	2750
12	35,00	2750
13	35,00	2750

FONTE: O autor (2022).

4.3.3 Determinação da cinética do tempo ideal de reação e capacidade redutora in vitro pelo método DPPH

A determinação do tempo de reação ideal entre os antioxidantes do pólen e o radical DPPH deu-se por uma curva cinética com os valores definidos como ótimos pela superfície de resposta no planejamento 2². Nessa etapa, utilizou-se 35 µL do extrato e 2750 µL da solução de DPPH 6×10^{-5} mol L⁻¹ e 1215 µL de etanol, em seguida, a absorbância da solução resultante foi monitorada a cada 5 minutos, durante um período de 40 minutos no comprimento de onda de 517 nm. O percentual em solução de DPPH após a obtenção de um estado estável numa região onde a absorbância não apresente

grandes decaimentos observáveis foi dado pela fórmula a seguir conforme Mishra, Ojha e Chaudhury (2012):

$$\% \text{ DPPH restante} = \frac{A_f}{A_o} \times 100$$

Onde:

A_o = Absorbância à 517nm no início da reação

A_f = Absorbância do estado estável determinado pela cinética

A determinação da capacidade redutora utilizou o método espectrofotométrico de inibição do radical estável DPPH no qual 35 μL de cada EEP foi adicionado a 2750 μL de DPPH e 1215 μL de etanol. Cada amostra foi analisada em triplicata após um período 10 min. determinado pela curva cinética do pólen apícola e a leitura da absorbância deu-se à 517 nm contra um branco de etanol.

Para a leitura da absorbância inicial preparou-se um controle negativo constituído de 35 μL de água ultrapura, 2750 μL da solução de DPPH e 1215 μL de etanol e a determinação do percentual de inibição foi dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{(\text{Abs controle})} * 100$$

Onde:

Abs controle = Absorbância do controle;

Abs amostra = Absorbância de cada EEP.

A capacidade redutora do pólen apícola foi também expressa em termos de equivalente de quercetina (Sigma, 98 %), no qual uma curva analítica com o antioxidante padrão foi elaborada e os valores convertidos em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Uma solução estoque de quercetina na concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada em 25 mL de etanol assistido por ultrassom.

Diluições foram realizadas em balões volumétricos de 10 mL para formar as seguintes concentrações 25, 50, 100, 200, 400, 600 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O procedimento de preparação da curva seguiu os mesmos valores do design experimental: 35 μL de quercetina, 2750 μL da solução de DPPH e 1215 μL de etanol e após 10 minutos, realizou-se a leitura a 517 nm em espectrofotômetro contra um branco de etanol P.A.

4.4 PADRONIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PÓLEN PARA CALIBRAÇÃO DO EDXRF

Foram selecionadas 5 amostras e 12 elementos (Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Sr e Zn) das três regiões do país estudadas (Nordeste, Sudeste e Sul). As análises da foram realizadas por FAAS, FAES e ICP-OES, objetivando criar amostras padrão para calibração e determinações quantitativas por EDXRF e para medir o teor dos analitos foi necessária uma digestão ácida das amostras.

4.4.1 Digestão ácida

5 g de pólen foram calcinados, em triplicata, seguindo a metodologia de resíduo mineral fixo, descrita previamente, até a obtenção de suas cinzas. O resíduo das cinzas passou por um processo de digestão para que fosse realizada a determinação de minerais, desta forma, os resíduos foram dissolvidos em 1,67 mL de HNO_3 8 mol L^{-1} , e filtradas para obtenção das cinzas solúveis e depois, levadas ao balão volumétrico de 10 mL para aferição de volume com água ultrapura.

Todo o procedimento seguiu a metodologia de Dionísio *et al* (2011) em que a solução com os minerais permaneceu armazenada sob refrigeração em tubos para centrífuga, tipo Falcon, previamente descontaminados durante 24 h com ácido nítrico 3 % e lavados com água ultra pura.

4.4.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados na análise foram: HNO_3 (Vetec) e soluções padrão de referência dos elementos K, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Na, Ni, Pb, Zn 1000 mg L^{-1} (Biotec). Soluções intermediárias foram preparadas semanalmente de acordo com as concentrações de cada elemento na matriz amostral.

4.4.3 ICP-OES

As leituras dos minerais foram realizadas por espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) em um equipamento da marca Perkin

Elmer Optima 8000. De modo a realizar as determinações, preparou-se uma solução multielementar de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a construção da curva de calibração dos minerais Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Sr.

As linhas de emissão utilizadas em nanômetros foram as seguintes: Cd 228.802; Co 238.892; Cr 267.716; Cu 324.754; Fe 260.568; Mn 257.610; Ni 231.604; Pb 220.353 e Sr 407.771. Diluições de 100 vezes foram necessárias para as medidas dos elementos Fe, Cu e Sr, enquanto que para o Mn diluiu-se 1000 vezes e os elementos presentes em baixas concentração foram medidos nas amostras não diluídas.

Os parâmetros instrumentais para medidas em ICP-OES dos elementos estudados foram otimizados de modo a obter a máxima taxa de sinal-ruído: Radiofrequência da força incidente (1.3 kW); fluxo de argônio (1.5 L min^{-1}); fluxo do nebulizador (0.9 L min^{-1}); réplicas (3); tocha axial. A determinação dos limites de detecção e quantificação instrumental foram calculadas de acordo com Shrivastava e Gupta (2011).

4.4.4 FAAS e FAES

As leituras dos minerais Ca e Zn deram-se por absorção atômica por chama (FAAS) e o K por emissão atômica por chama (FAES) em um espectrômetro da marca Varian Spectra AA220. Foram utilizados os gases acetileno, óxido nitroso e ar comprimido. As condições operacionais utilizadas para a análise das amostras estão presentes abaixo (TABELA 4).

TABELA 4 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Parâmetros	Ca	Zn	K
Largura da fenda (nm)	0,5	1,0	0,2
Corrente da lâmpada (mA)	10	5,0	-
Vazão C_2H_2 (L min^{-1})	6,3	2,0	2,0
Vazão ar (L min^{-1})	-	13	13
Vazão NO_2 (L min^{-1})	10	-	-

FONTE: O autor (2022).

Soluções padrão para a construção da curva de calibração de cada mineral foram preparadas e a leitura das amostras foi realizada em triplicata. As soluções de pólen foram diluídas 20, 400 e 700 vezes para Zn, Ca e K respectivamente.

4.5 ANÁLISE ELEMENTAR POR EDXRF

4.5.1 Preparo da amostra

Pesou-se 2 g de pólen macerado, prensou-se em pastilhador cilíndrico com o auxílio de uma prensa hidráulica manual (marca Specac, modelo GS15011) para obtenção da pastilha que foi usada para a identificação dos componentes inorgânicos por EDXRF.

4.5.2 Obtenção dos espectros de fluorescência de raios X por energia dispersiva das amostras de pólen

A determinação de espécies majoritárias (Ca, Fe, K, Mn, Zn) e micro (Cu, Ni, P, S, Sr, Br e Rb) no pólen deu-se pela técnica de fluorescência de raios X (EDXRF) por método espectrométrico utilizando um equipamento do modelo Shimadzu EDX-7000 que foi escolhido por ser uma técnica rápida e não destrutiva.

A excitação foi realizada com um tubo de raios X de Rh de 50 W em atmosfera de ar nas faixas de Na-Sc e Al-U, em um tempo de medida de 100s e 3 varreduras por análise utilizando colimador de 10 mm e detector de silício SDD. A corrente foi ajustada automaticamente para um tempo morto máximo de 30 % sem o uso de filtro no feixe primário.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedimentos estatísticos univariado e multivariados foram aplicados para analisar a variância dos dados e a possível correlação com a origem geográfica das amostras usando os softwares Statistica statsoft 7 e Origin 2021.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CINZAS

O pólen é uma fonte significativa de minerais com conteúdo de cinzas entre 2,5 a 6,5 % (AČKAR; FLANJAK, 2020), por conseguinte, neste estudo, o percentual médio de cinzas por estado de origem das amostras foi de $2,51 \pm 0,47$ com uma variação entre 1,76 – 4,00 % enquanto que amostras de pólen turcas estudadas por Altiner *et al* (2021) obtiveram cinzas de 2,92 a 5,03 %.

A instrução normativa nº 3 (BRASIL, 2001) estabelece um limite máximo de cinzas de 4 %; m/m, na base seca, consequentemente, nenhuma das amostras apresentou teores acima do permitido (TABELA 5), demais resultados de cada amostra analisadas estão presentes no ANEXO I.

TABELA 5 – RESÍDUO MINERAL POR ESTADO DE ORIGEM DOS POLENS

Origem	N	Média	Mínimo	Máximo
BA	2	2,94±0,43	2,63±0,06	3,24±0,04
CE	2	2,93±0,49	2,59±0,01	3,28±0,02
MG	4	2,57±0,49	2,09±0,04	3,05±0,02
NI	2	2,60±0,09	2,53±0,04	2,66±0,06
PR	14	2,27±0,30	1,87±0,04	2,77±0,04
RN	3	3,41±0,69	2,65±0,03	4,00±0,04
RS	2	2,63±0,47	2,30±0,36	2,96±0,01
SC	3	2,57±0,35	2,23±0,06	2,94±0,01
SP	8	2,30±0,36	1,77±0,02	2,96±0,02

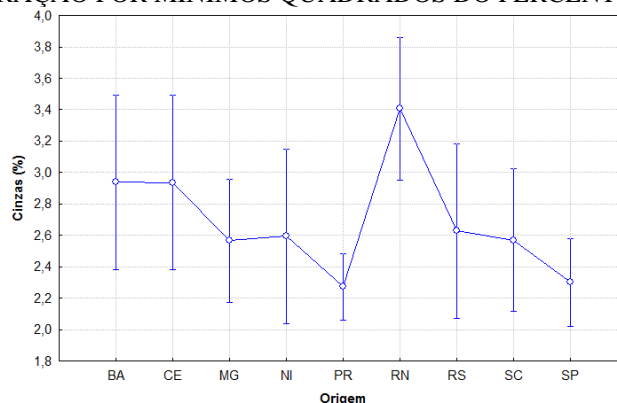
LEGENDA: N = número de amostras

FONTE: O autor (2022).

De acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, o teor de resíduos minerais nos polens estudados apresentou normalidade dos dados a um nível de confiança de 95 % no qual $p_{valor} 0,20 > 0,05$. Para melhor avaliá-los, aplicou-se uma análise paramétrica, a ANOVA de um fator para a origem dos polens (FIGURA 8) onde nove grupos foram considerados dentro do fator origem ao qual correspondem aos estados onde as amostras foram coletadas.

Verificou-se que existe uma diferença significativa entre os polens dos estados brasileiros com um p valor $0,004 < 0,050$, dados destacados em vermelho (TABELA 6). Os polens pertencentes a região Nordeste (Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte) foram os que apresentaram maiores teores de resíduos minerais em sua composição enquanto os menores foram encontrados nos estados do Paraná e São Paulo, já os demais apresentaram resultados aproximados entre si.

FIGURA 8 – COMPARAÇÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS DO PERCENTUAL DE CINZAS



FONTE: O autor (2022).

As variâncias dos resíduos minerais dos nove estados estudados são homogêneas a um nível de significância de 5 %, segundo o teste de Levene, pois p_{valor} é superior a 0,05. A maior homogeneidade entre as amostras cuja origem foi identificada encontra-se no estado do Paraná, que ao total são 14 polens, todos provenientes do bioma Mata Atlântica. A partir da análise univariada da variável resíduo mineral (TABELA 6), identificou-se que há uma diferença estatística entre pelo menos 8 polens de origem distintas.

TABELA 6 – ANÁLISE UNIVARIADA PARA A VARIÁVEL DEPENDENTE RESÍDUO MINERAL

	GL	Cinzas (%) - SQ	Cinzas (%) - QM	Cinzas (%) - F	Cinzas (%) - p
Intercepto	1	188	188	1268	0,000
Origem	8	4,34	0,542	3,65	0,004
Resíduo	31	4,60	0,148		
Total	39	8,94			

LEGENDA: GL – Graus de Liberdade; SQ – Soma quadrática; QM – Quadrado médio

FONTE: O autor (2022).

Em um nível de confiança de 95 %, observou-se pelo teste de Tukey, que a diferença de teor de cinzas ocorreu nas amostras provenientes de três estados diferentes: Rio Grande do Norte^a, Paraná^b e São Paulo^b. A diferença entre as médias do Rio Grande do Norte^a e Paraná^b foi de 1,13 % enquanto Rio Grande do Norte^a e São Paulo^b obtiveram 1,10 % do percentual de cinzas.

5.2 COLORIMETRIA - MÉTODO CIELAB

Este método tem como base o sistema de espaço de cor em termos de coordenadas $L^* a^* b^*$ e $L^*C^*h^*$ da CIE no qual, as medidas CIELAB foram realizadas para enfatizar a diferença de tom e luminosidade das amostras de pólen em pó, uma vez que, a amostra em grãos apresenta tonalidades heterogêneas devido a suas características florais.

A percepção visual da cor de cada amostra de pólen estudado no formato de pastilha prensada está apresentada na FIGURA 9.

FIGURA 9 – PASTILHAS DE PÓLEN PRENSADO E SUAS VARIAÇÕES DE COR



FONTE: O autor (2022).

Para que fosse possível uma comparação entre as amostras, escolheu-se um pólen cuja origem fosse mono floral, ao qual corresponde a sua composição ser acima de 80 % de uma única origem botânica predominante (Pohl *et al.*, 2020). O pólen cearense (CE08) foi selecionado pela homogeneidade da cor de seus grãos e sua florada de coqueiro (FIGURA 10).

A partir deste, determinou-se os valores de ΔL^* , ΔC^* e ΔE^*_{ab} , que equivalem as diferenças de luminosidade, croma e variação total da cor, respectivamente (ANEXO II) Em anexo, há a classificação dos polens em termos de croma e luminosidade em relação a amostra padrão.

FIGURA 10 – AMOSTRA PADRÃO EM GRÃOS (CE08)



FONTE: O autor (2022).

Sipos *et al* (2020) classificaram a diferença de ΔE^*_{ab} de acordo com suas características sensoriais onde $\Delta E^*_{ab} < 1,5$ não há diferença perceptível; $1,5 < \Delta E^*_{ab} < 3,0$ perceptível; $3,0 < \Delta E^*_{ab} < 6,0$ bastante perceptível, e acima de 6 sendo grandemente diferentes, no qual todas as 6 amostras húngaras apresentaram grande diferença sensorial. No presente trabalho, apenas 4 polens apresentaram diferenças sensoriais inferiores a 6, em comparação a amostra padrão, sendo essas quatro amostras a RN01, BA05, SC06 e MG23.

A maior diferença de cor entre os polens deu-se em três amostras paulistas com ΔE^*_{ab} acima de 80 para SP18, SP30 e SP32. Valor superior ao ΔE^*_{ab} máximo de 53,6 obtida por Sipos *et al* (2020) em suas amostras. A menor variação foi encontrada nos polens MG23 (1,67) e SC06 (2,29), indicando uma semelhança com a amostra padrão no quesito coloração.

As amostras mais vívidas (ΔC^*) foram a SP18 (48,70), SP30 (51,42) e SP32 (46,14), mesmas que apresentaram maior diferença de cor em relação a CE08, diferenciando-se da amostra padrão. Enquanto as mais opacas foram RN02 (-6,76) e MG33 (-3,96). Todas as amostras apresentaram valores de a^* e b^* positivos sugerindo que nestes atributos predominam coordenadas das cores vermelha e amarela (TABELA 7).

Ao avaliar as amostras por origem, os polens são mais claros (L^*), vermelhos (a^*) e vívidos (C^*) na seguinte ordem decrescente Sudeste > Sul > Nordeste já para a coordenada correspondente ao amarelo (b^*) a ordem se inverte Nordeste > Sul > Sudeste.

TABELA 7 – MÉDIA DAS COORDENADAS DE CORES DE 38 POLENS POR REGIÃO DE ORIGEM

Coordenadas	Nordeste	Sudeste	Sul
L*	49,9±12,8	73,3±22,4	58,2±20,4
a*	16,9±14,5	42,7±23,7	31,2±17,5
b*	25,4±7,17	22,2±6,57	25,0±7,13
C*	32,5±10,8 ^a	50,4±19,1	42,5±11,9

FONTE: O autor (2022).

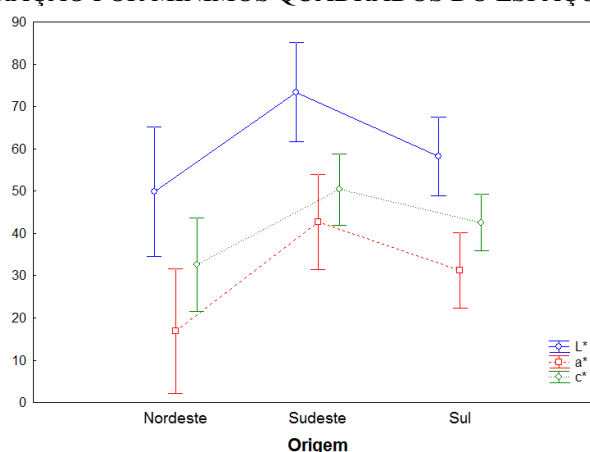
Amostras Turcas de pólen de Altiner *et al* (2021) apresentaram valores de L* entre 47,77 a 63,65; a* 1,54 a 7,19 e b* 19,92 a 30,39. Por conseguinte, os 40 polens brasileiros apresentaram coordenadas mais claras (25,64–99,99), vermelhas (7,99–74,8) e amarelas (13,7–37,4) em faixas mais amplas.

Ao analisar polens húngaros Sipos *et al* (2020) obtiveram valores positivos de a* e b* semelhantes aos deste estudo, ao qual atribuiu a presença de carotenoides e flavonoides, porém com menor intensidade de cor de 0,9 a 64,5. Os valores próximos a zero consideraram como de baixa saturação com faixas mais verde-avermelhadas.

De-Melo *et al* (2016) também encontraram em suas amostras de pólen coletadas em São Paulo valores de L* acima de 50 indicando que eles são mais claros com tendências predominantes de amarelo e vermelho.

A variação de cor entre as amostras foi submetida a uma ANOVA de um fator considerando 3 grupos principais (Nordeste, Sudeste e Sul), excluindo-se duas amostras de origem não identificada (FIGURA 11).

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS DO ESPAÇO DE COR



FONTE: O autor (2022).

As amostras da região Sudeste apresentaram maiores valores das coordenadas vermelho (a*), vívido (C*) e claro (L*) com perfil semelhante às da região sul enquanto que as amostras nordestinas possuem em menor quantidade os seguintes fatores:

claridade, cor menos vividez e intensidade da cor vermelha, comparadas as demais regiões.

As coordenadas de cor L*, a* e C* apresentaram diferença significativa entre as médias com valores de $p < 0,05$ em, pelo menos, duas amostras. A um nível de confiança de 95 %, no teste de Tukey, foi observado que a diferença se deu entre os polens das regiões Nordeste e Sudeste (TABELA 8).

TABELA 8 – COMPARAÇÃO PELO TESTE DE TUKEY DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS

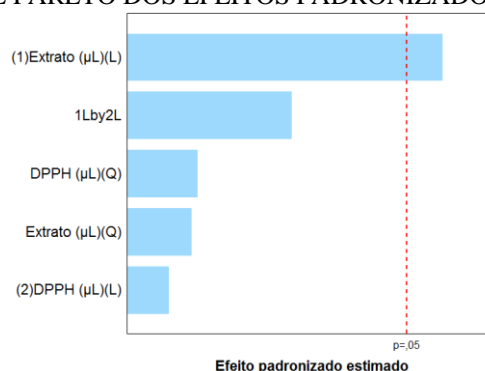
(A) Região	(B) Região	Diferença entre as médias A-B
Nordeste (L*)	Sudeste (L*)	23,43
Nordeste (a*)	Sudeste (a*)	25,81
Nordeste (C*)	Sudeste (C*)	17,85

FONTE: O autor (2022).

5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DPPH

Ensaio prévios para determinar os volumes adequados do EEP e radical livre indicaram que quando o volume do extrato concentrado aumenta, o aumento da porcentagem de inibição é diretamente proporcional. Tendo como resposta para o planejamento o fator porcentagem de inibição, foi considerado significativo somente o volume de EEP que apresentou valor de t acima do valor de $t_{(crítico)}$ no gráfico de Pareto (FIGURA 12).

FIGURA 12 – GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS



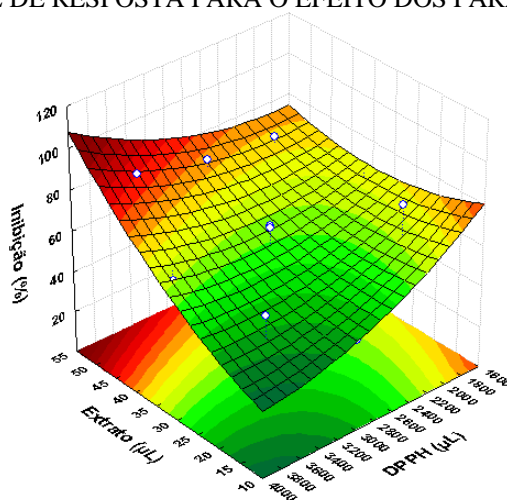
FONTE: O autor (2022).

Desta forma, foram testados volumes de extrato de pólen entre 15 e 50 µL conforme o design experimental, uma vez que o volume de DPPH não foi significativo. Optou-se pelos valores dados como ótimos dos pontos centrais que provocaram inibições entre 49,8 a 62 %, além disso, o efeito das variáveis independentes foi expresso também

em um gráfico de contorno otimizado para a escolha dos volumes adequados (FIGURA 13).

Pode-se notar na Figura 13 que a condição de maior inibição corresponde à 50 μL do extrato e 3800 μL de DPPH, no entanto, os volumes escolhidos foram 35 μL de EEP e 2750 μL de DPPH 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de modo a garantir que houvesse um excesso de DPPH para reagir com os antioxidantes do pólen. Evitando, assim, valores negativos ou extremamente baixos na absorbância das amostras que por ventura apresentassem elevado potencial antioxidante.

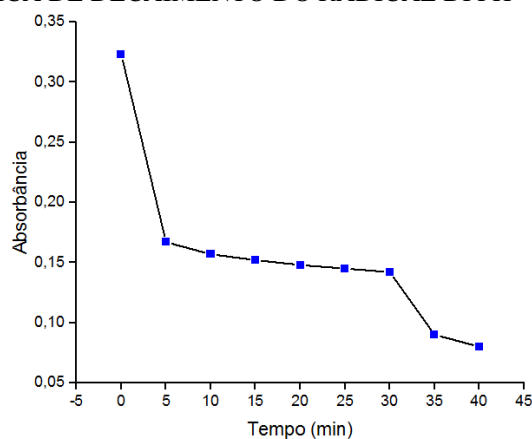
FIGURA 13 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O EFEITO DOS PARÂMETROS OTIMIZADOS



FONTE: O autor (2022).

Uma curva cinética foi criada para verificar o tempo mínimo ideal da reação entre os antioxidantes presentes no pólen apícola e o radical DPPH em função do decaimento da absorbância do DPPH pelo tempo à 517 nm (FIGURA 14).

FIGURA 14 – CURVA CINÉTICA DE DECAIMENTO DO RADICAL DPPH



FONTE: O autor (2022).

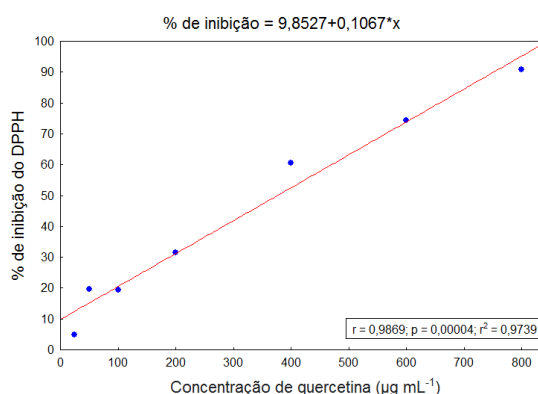
Leituras consecutivas a cada 5 minutos foram realizadas até a obtenção de um estado de estabilidade da degradação da absorvância do radical com os volumes otimizados de 35 μL de EEP, 2750 μL da solução de DPPH e 1215 μL de etanol.

Estabeleceu-se como tempo ideal da reação 10 minutos devido ao rápido decaimento da reação seguido por um período de estabilidade onde o percentual restante de DPPH no tempo estimado correspondeu a 48,61 % indicando que a quantidade de antioxidante foi adequada para reduzir em cerca de 50 % a concentração inicial do radical.

O comportamento cinético classificou-se como rápido no intervalo de 5 a 30 minutos, tempo necessário para que fosse atingido o estado de equilíbrio (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). Portanto, 10 minutos é considerado suficiente para completar a reação em comparação ao tempo fixo de 30 minutos devido a rápida ação oxidante das amostras.

De modo a ser possível uma comparação com a literatura, fez-se uso de um antioxidante padrão no qual os termos de percentual de inibição foram convertidos em equivalentes de quercetina em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ANEXO I). Desse modo, elaborou-se uma curva analítica do percentual de inibição do radical DPPH em função da concentração de quercetina obtendo um coeficiente de correlação de 97,4 % (FIGURA 15).

FIGURA 15 – CURVA ANALÍTICA DA RELAÇÃO ENTRE O % DE INIBIÇÃO E O PADRÃO QUERCETINA



FONTE: O autor (2022).

5.4 CAPACIDADE REDUTORA PELO MÉTODO DPPH

Os valores estimados para a concentração de antioxidantes pelo radical DPPH para os polens estudados variaram de 9,98 a 714 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em equivalentes de quercetina (EQ) aos quais correspondem a uma porcentagem de inibição de 10,9 a 86,1 %

respectivamente. A maior inibição foi obtida por um pólen proveniente do Rio Grande do Norte (RN01) e a menor no estado do Paraná (PR07).

A média da capacidade redutora de acordo com a origem dos produtos está representada na TABELA 9. Da região Nordeste, apenas duas amostras apresentaram inibição superior a 50 % enquanto que no Sudeste, três superaram o valor mínimo, por fim, a região Sul obteve a maior predominância de polens com boa capacidade redutora, dez ao todo.

Em sua maioria, os melhores resultados são oriundos do bioma Mata Atlântica, origem da maior fração de amostras, com exceção de dois polens dos biomas Caatinga e Pampa. Nenhuma amostra reconhecida do bioma Cerrado apresentou atividade redutora relevante neste estudo, provavelmente, devido a questões ambientais, como maior período de seca no Cerrado e flora característica da região.

TABELA 9 – MÉDIA DA CAPACIDADE REDUTORA DO PÓLEN APÍCOLA POR ESTADO DE ORIGEM

	Inibição (%)	EQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mínimo (%)	Máximo (%)
BA	21,2 \pm 11,1	106 \pm 103	13,3 \pm 1,6	29,0 \pm 1,9
CE	39,2 \pm 26,8	275 \pm 251	20,2 \pm 0,3	58,1 \pm 1,8
MG	27,3 \pm 6,9	163 \pm 65,0	21,1 \pm 0,6	35,7 \pm 0,3
NI	39,4 \pm 17,8	270 \pm 176	26,8 \pm 1,4	52,0 \pm 0,7
PR	51,7 \pm 21,3	405 \pm 208	10,9 \pm 0,7	81,1 \pm 0,9
RN	52,4 \pm 29,2	399 \pm 274	34,1 \pm 1,1	86,1 \pm 1,1
RS	47,9 \pm 39,9	359 \pm 370	19,6 \pm 1,2	76,2 \pm 1,3
SC	57,1 \pm 22,9	443 \pm 215	33,9 \pm 1,2	79,7 \pm 0,1
SP	50,2 \pm 23,4	378 \pm 219	22,0 \pm 0,1	84,5 \pm 1,3

LEGENDA: EQ - Equivalentes de Quercetina

FONTE: O autor (2022).

Kaškonienė *et al* (2015) encontraram uma capacidade redutora variando de 0,9 a 8,4 mg g⁻¹, em suas amostras dos países Letônia, Lituânia, Espanha e China, usando o padrão de quercetina (EQ mg g⁻¹). Neste estudo, a capacidade redutora para os polens brasileiros variou de 0,07 a 5,35 mg g⁻¹ por grama de pólen. Portanto, inferior à dos polens dos países estudados por Kaškonienė *et al* (2015).

Carpes *et al* (2013) estudaram três amostras de pólen correspondente a cada estado da região Sul do Brasil, as quais provocaram inibições de 24,84 % (PR); 14,91 % (RS) e

40,81 % (SC). Já amostras de polens estudados por Leblanc *et al* (2009) obtiveram percentuais de inibição em EEP de 11,35 a 75,90 % em amostras do Deserto de Sonora nos Estados Unidos. Os brasileiros apresentaram uma faixa de inibição de 10,92 a 86,07 %.

Apesar da grande variação dos resultados entre as amostras de pólen estudadas neste trabalho, por meio de uma ANOVA, verificou-se pelo teste de Levene que há uma homoscedasticidade na variância dos dados ao distribuí-los por estados de origem, bioma e também por região indicando que os polens apresentaram semelhanças entre si. Portanto, não há diferença significativa entre as médias dos grupos a um nível de confiança de 95 %.

5.5 PADRONIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PÓLEN PARA DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS POR EDXRF

Para avaliar a possibilidade de padronização das amostras de pólen para posterior calibração do EDXRF foi feita uma quantificação de 12 metais traços e majoritários por ICP, FAAS e FAES em 5 amostras de polens das três regiões do país, cujos valores foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$. Também se determinou os limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD), dos analitos de interesse em cada técnica, que estão dispostos na TABELA 10.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DOS METAIS, LOD E LOQ EM $\mu\text{g g}^{-1}$ PARA PADRONIZAÇÃO EM EDXRF

Amostra	RN01	SC06	CE08	MG23	PR40	LOQ	LOD
Ca	896±0,84	634±30,5	719±7,92	802±28,0	290±22,9	0,63	0,19
Cd	0,08±0,02	0,08±0,01	0,10±0,01	0,12±0,00	ND	0,08	0,02
Co	0,26±0,90	ND	0,28±0,02	0,32±0,00	ND	0,03	0,01
Cr	0,20±0,01	0,21±0,02	0,20±0,03	0,23±0,02	0,15±0,01	0,09	0,02
Cu	9,00±0,40	6,56±0,31	7,32±1,21	8,42±0,18	5,94±0,64	0,02	0,00
Fe	41,9±1,26	27,1±2,27	26,1±2,76	50,6±13,5	68,1±0,59	0,28	0,08
K	2708±389	268±70,3	3146±104	3432±13,2	2644±156	0,07	0,02
Mn	102±11,3	84,3±16,9	95,5±4,45	155±27,8	32,0±3,03	0,01	0,00
Ni	0,81±0,23	0,25±0,01	0,82±4,45	0,98±0,01	0,74±0,06	0,17	0,01
Sr	1,99±0,23	4,09±0,09	1,02±0,65	1,36±0,17	3,92±0,54	0,14	0,04
Zn	13,4±1,51	10,0±1,24	3,91±0,06	8,33±2,08	7,02±1,90	0,75	0,22

LEGENDA: ND - Não determinado
FONTE: O autor (2022).

Os polens brasileiros apresentaram, em sua composição, os elementos na seguinte ordem decrescente K > Ca > Mn > Fe > Zn > Cu > Sr > Ni > Co. Espécies tóxicas como

Cd e Cr foram detectadas em todas as amostras padrões em pequenas quantidades, com exceção do Pb, que ficou abaixo do limite de detecção do aparato.

Com relação a padronização do EDXRF, realizaram-se testes de calibração por Parâmetros fundamentais (PF) e sensibilidade do equipamento. Nos PF das amostras de pólen aplicou-se as funções de *integration*, *fitting*, *integration-fitting* e fator de correção para estimar o erro percentual e a viabilidade do método, neste caso, usou-se o valor das concentrações obtidas por ICP e FAAS para comparação e validação.

Já a sensibilidade em atmosfera de ar e vácuo, estimou-se pela intensidade dos picos de raios X que posteriormente foram convertidos em valores de concentrações, e então comparadas as concentrações determinadas com o auxílio das técnicas espectrométricas citadas (TABELA 11).

Contudo, observaram-se valores de erro percentual em módulo acima de 20 % para a maioria dos analitos de interesse, o que possibilitou apenas a avaliação qualitativa dos dados por EDXRF.

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO REAL, OBSERVADA EM mg g^{-1} E ERRO (%) NA CALIBRAÇÃO DO EDXRF PARA A AMOSTRA CE08 PARA INTEGRATION-FITTING POR PF

CE08	Conc. observada	Conc. real	Erro
K	2444	3146	22
Ca	927	719	29
Cr	1,00	0,20	388
Mn	210	95,5	120
Fe	35,7	26,1	37
Co	1,00	0,28	256
Ni	1,00	0,82	22
Cu	7,90	7,32	8
Zn	10,5	3,91	168
Sr	2,00	1,02	96
Cd	1,00	0,10	925

FONTE: O autor (2022).

5.6 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA - EDXRF

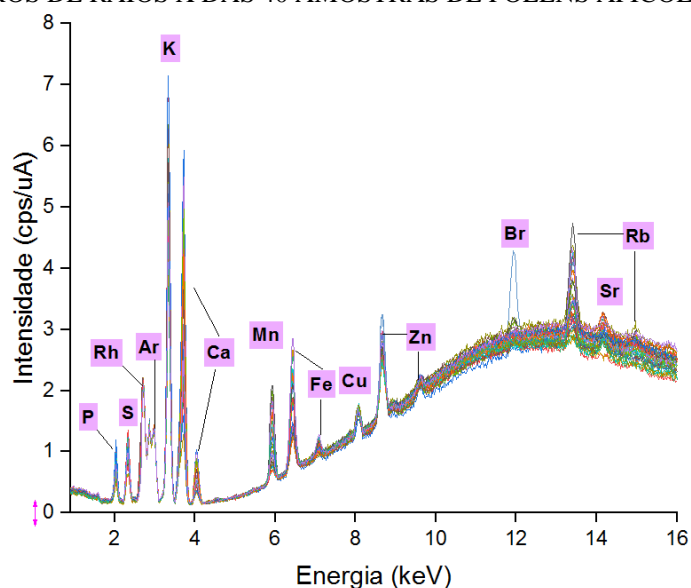
A determinação qualitativa da composição elementar do pólen apícola foi realizada por métodos de varredura por EDXRF em duas faixas elementares Na-Sc e Al-U. Foram encontrados picos de raios X característicos entre 2 e 14 keV que correspondem aos elementos P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb e Sr.

Os elementos citados também foram encontrados com a mesma técnica por Swiatly-Blaszkiwicz *et al* (2021) em amostras de pólen apícola poloneses, além dos já citados, os picos de Ar e Rh também apareceram devido as condições experimentais.

Para melhor processamento dos dados, foram removidas as partes finais do espectro a partir de 16 keV, ao qual inclui os picos de espalhamento Compton e Rayleigh do tubo de Ródio (entre 18 e 22 keV) e uma região sem picos característicos de 23 a 40 keV.

Os espectros de EDXRF para as 40 amostras deste estudo apresentaram picos de raios X semelhantes diferenciando-se pela intensidade de acordo com sua especificidade (FIGURA 16) além de um alto fundo de espalhamento na região de 8 a 18 keV. Os demais espectros, de acordo com a origem geográfica, estão presentes no ANEXO III. A partir da intensidade característica de cada elemento calculou-se a razão entre os picos para melhor comparação dos polens (ANEXO IV).

FIGURA 16 – ESPECTROS DE RAIOS X DAS 40 AMOSTRAS DE POLENS APÍCOLAS



FONTE: O autor (2022).

Cálculos a partir do pico mais intenso foram feitos para verificar a razão da intensidade do mesmo elemento entre as amostras. A região Nordeste destacou-se pela maior razão na intensidade dos picos característicos dos elementos K, Ca, P, Zn e S; no Sul, Mn, Rb e Fe e no Sudeste pelas razões de Cu e Sr.

Amostras do estado de São Paulo apresentaram maiores diferenças do elemento Sr; Rio Grande do Norte e Bahia, de Ca e K já as amostras do estado do Paraná

apresentaram uma predominância de altas intensidades de Mn, Cu, Fe e Rb em relação aos demais estados brasileiros.

Razões entre diferentes elementos para um mesmo pólen foram estabelecidas com base no coeficiente de correlação de Pearson e nos elementos de maior intensidade dos raios X característicos (ANEXO V). Com relação a Mn e Fe as amostras paranaenses possuem a maior abundância destes elementos enquanto há menor razão Mn:Fe deu-se nos polens do Rio Grande do Sul.

Polens da região Sul e São Paulo são mais deficientes dos elementos Ca e K, enquanto que as maiores razões de Ca:K concentram-se na Bahia e em Minas Gerais. Sul e Sudeste conjuntamente possuem os menores quocientes entre P e S, sendo as menores razões P:S observadas em São Paulo e Minas Gerais, além disso, polens do Rio Grande do Norte são ricos em P:S.

A região Sul e Sudeste respectivamente são as que possuem maiores diferenças em grandeza entre Fe e Mn, enquanto que polens da região Nordeste são mais pobres na razão Fe:Mn. Com relação a razão Mn:Rb, as amostras paranaenses mostraram-se mais ricas em comparação com amostras dos outros estados, fato esse, provavelmente relacionado à composição do solo.

5.7 ANÁLISE MULTIVARIADA E ORIGEM GEOGRÁFICA

5.7.1 Correlação entre a composição elementar das amostras de pólen

A direção e o grau da relação entre os resultados da análise elementar foram avaliados pelo coeficiente de correlação de Pearson (TABELA 12). Usou-se como base o dado da intensidade média dos raios X característicos de cada elemento analisado nas amostras e de acordo com os resultados as correlações mais significativas são todas positivas.

Há uma correlação muito forte entre P e S (0,90); correlações fortes entre K com P (0,86), K e S (0,77) e Mn com Rb (0,76). Adicionalmente houve também correlações moderadas entre K com Zn (0,64), Ca e P (0,64), P com Zn (0,61) e Zn e S (0,67). Desta forma, caso haja um aumento na intensidade de qualquer um dos pares implica num incremento de moderado a muito forte do outro. Polens ricos em P tendem, também, a serem fonte de S, assim, quanto mais forte a correlação entre os dois elementos, maior sua abundância.

TABELA 12 – ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA A COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DO PÓLEN APÍCOLA

	K	Ca	P	S	Zn	Fe	Mn	Rb	Sr
K	1,0								
Ca	0,48	1,0							
P	0,86	0,64	1,0						
S	0,77	0,52	0,90	1,0					
Zn	0,64	0,33	0,61	0,67	1,0				
Fe	-0,30	-0,52	-0,44	-0,36	-0,09	1,0			
Mn	0,26	0,46	0,51	0,43	0,12	-0,55	1,0		
Rb	0,13	0,39	0,32	0,28	-0,04	-0,45	0,76	1,0	
Sr	-0,31	-0,02	-0,30	-0,23	-0,11	0,42	-0,47	-0,29	1,0

FONTE: O autor (2022).

Há também correlações negativas moderadas: Ca e Fe (-0,52); Mn e Fe (-0,55). No caso do Fe, que apresenta em sua maioria correlações negativas entre as amostras, um acréscimo em sua intensidade sugere que a intensidade dos raios X característicos dos demais elementos terá uma redução, com exceção do Sr. Provavelmente, por fatores ligados a disponibilidade dos nutrientes no solo e seu pH, pois solos com maior teor de Fe são mais ácidos. Portanto, elementos com caráter mais básico como Ca, K, P e S apresentaram correlação negativa.

5.7.2 Origem geográfica

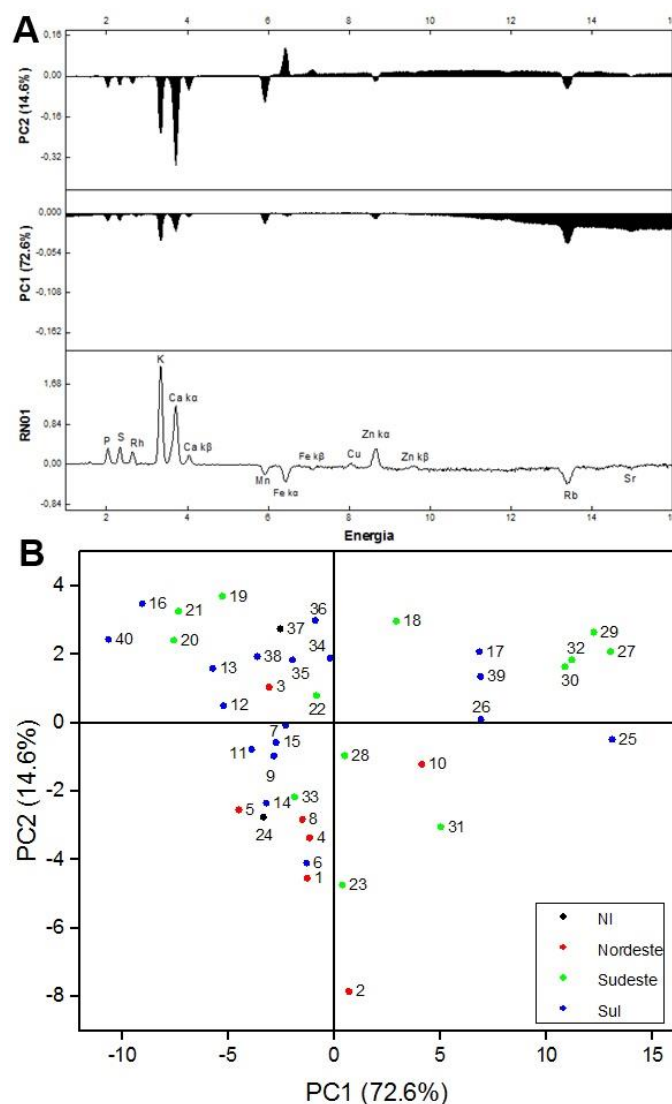
Os elementos determinados nas amostras de pólen foram submetidos a Análise de Componentes Principais (ACP), no qual a ACP foi utilizada como uma ferramenta descritiva de visualização dos dados em diferentes dimensões para encontrar possíveis relações entre a composição elementar e a origem dos polens.

O espectro completo da fluorescência foi submetido a um pré-processamento de centragem na média no software Chemostat. A PCA possibilitou o agrupamento e a redução do número de variáveis em duas componentes principais (PC) com um potencial de explicação da variabilidade dos dados de 87,2 % (FIGURA 17) demonstrando adequada qualidade do modelo a estes fatores. Adicionalmente, na Figura 17A há um gráfico de referência da amostra RN01 para identificação dos picos dos elementos de interesse.

Variações pronunciadas na distribuição das amostras foram observadas nos níveis de todos os minerais (FIGURA 16), no entanto, não há uma separação clara por

agrupamentos de acordo com a origem do material por estados da federação, apenas por região. A componente principal 1 possui o maior poder explicativo (72,6 %), nela, elementos como P, S, K, Ca, Mn, Zn e Rb estão presentes no quadrante negativo com maior influência nas amostras. Neste quadrante X negativo predominam os elementos K, Rb e Ca.

FIGURA 17 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DOS ESPECTROS DE RAIOS X



LEGENDA: (A) Gráfico de loadings das componentes principais do espectro de raios X e os picos característicos de cada elemento (B) Gráfico de scores dos polens por estado de origem
 FONTE: O autor (2022).

Na componente 2 o elemento Fe, com seus picos de $k\alpha$ e $k\beta$, está inversamente correlatado aos demais elementos, principalmente K, Ca e Mn. Amostras presentes no

quadrante positivo da PC2 apresentam maior intensidade de raios X do Fe. Os polens PR40 e SC16 se sobressaem com as maiores razões 1 e 0,97, respectivamente.

No quadrante negativo da PC2, estão as amostras com maior contribuição do elemento Ca, com pico mais intenso, seguido por K e Mn. Os elementos Cu e Sr não influenciaram significativamente nas separações das amostras.

Os efeitos geográficos avaliados por Morgano *et al* (2012), através de análises por ICP-OES, demonstraram que na região Nordeste do Brasil há maiores níveis dos elementos Zn, Ca, K e P. Dados semelhantes ao da PC1 deste trabalho, onde se encontrou a maior parte dos polens provenientes deste local. Para a região Sul, a partir das componentes principais, percebeu-se uma maior predominância de polens apícolas no quadrante do Fe pela PC2 enquanto que os polens do Sudeste se distribuíram em quadrantes distintos por toda a PCA.

As amostras paranaenses, de cidades com até 200 km de Curitiba, também apresentaram semelhança entre si (PR20, PR34, PR35, PR36, PR38 e PR40). A proximidade com o litoral dispôs no mesmo quadrante as amostras RN01, BA04, BA05, SC06 e CE08, onde predominaram os elementos Ca, Mn e Rb pela PC2. Os polens baianos apresentaram maior intensidade de Ca enquanto o do Rio Grande do Norte de K.

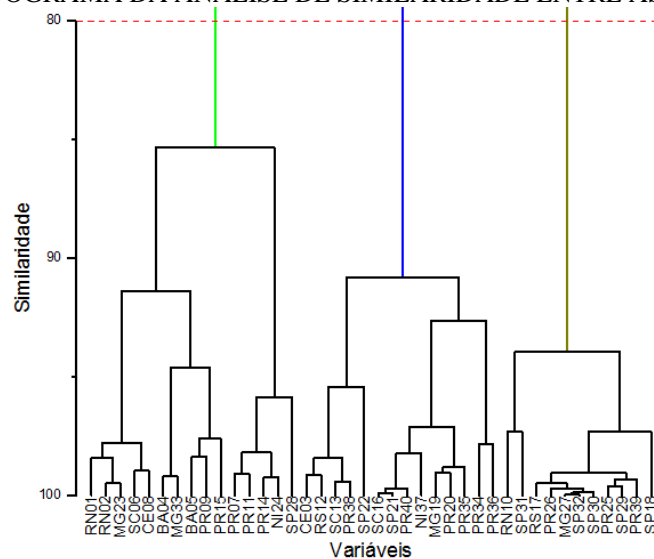
Os polens cearenses se assemelharam aos da Bahia, contudo, houve discrepâncias dentro do mesmo bioma, a caatinga cearense. O pólen CE03 foi coletado no sertão, e apresentou maiores razões de Sr (1,00) e Fe (0,69) e menor de Ca (0,38) enquanto o CE08, do litoral do estado, prevaleceu o Ca (0,78), baixa razão de Fe (0,23) e ausência de Sr.

Sugere-se que a variação na composição do pólen paulista, nesse caso, deu-se pela maior tendência de Fe durante os meses de agosto a outubro e Mn entre fevereiro e março, conforme citam Morgano *et al* (2012). Portanto, a estação de coleta pode influenciar no perfil mineral do pólen a além do bioma e estado de origem, provocando variações em seu rastreamento geográfico.

5.7.3 Discriminação por agrupamentos

A partir dos dados do espectro de raios X, uma avaliação exploratória foi conduzida pela análise hierárquica de agrupamento (HCA), criado a partir do cálculo das distâncias pelo método de Ward, para discriminar os polens através de um dendrograma (FIGURA 18) e tentar associar as amostras cujas informações são desconhecidas.

FIGURA 18 – DENDOGRAMA DA ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AS AMOSTRAS



FONTE: O autor (2022).

Por meio dos resultados obtidos verificou-se a presença de três *clusters* de similaridades delimitados pela linha de corte que corroboraram com a PCA. Os dados obtidos na HCA foram comparados com a razão dos elementos de sua composição e o teor de cinzas. A razão foi calculada a partir do pico mais intenso com os demais picos para todas as 40 amostras usando um pólen como referência para cada elemento (Anexo IV).

O primeiro agrupamento possui o maior número de amostras ($n = 15$) e é representado por polens de todos estados exceto o Rio Grande do Sul. Nele a maior parte das amostras são da região nordeste (5) com um predomínio do bioma mata atlântica. Apenas o pólen CE08 difere por ser da Caatinga.

Neste agrupamento, há uma forte presença de polens (6) oriundos de cidades litorâneas: Maxaranguape, Trairi, Ararangua e Canavieiras. No qual, em geral, o grupo apresentou maiores razões de K (0,58-1,00), Ca (0,39 – 1,07), S (0,73 – 1,00), Rb (0,23 – 1,00), Cu (0,75 – 1,00), Mn (0,24 – 1,00) e P (0,57 – 1,00). A razão média de Fe foi de 0,32, a menor entre os *clusters*. Além de um percentual de cinzas superior aos demais com média de 2,90 %. Destes, sete polens possuem cinzas acima do valor médio.

Os polens do Rio Grande do Norte se destacaram por possuírem altas razões de K, Ca, P, S e Zn. Observou-se que polens com muitas cinzas apresentaram razões superiores de K. Com relação a amostra desconhecida, o pólen NI24 apresentou semelhança ao da cidade de Cambará (PR14) localizada próximo a uma região de divisa entre os estados de São Paulo e Paraná.

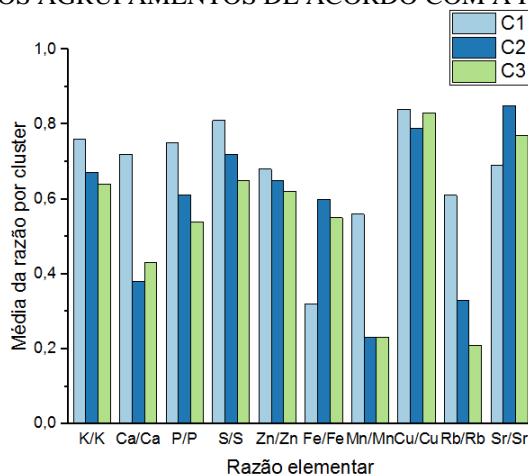
O agrupamento 2 ($n = 14$) é composto majoritariamente por amostras do eixo Sul-Sudeste. Exceto o pólen CE03 que advém do Nordeste. Este *cluster* é representado por polens da região metropolitana de Curitiba. Nele, há uma queda gradual nas razões de K (0,53 – 0,86), Ca (0,26 – 0,48), Mn (0,09 – 0,47) e Rb (0,00 – 0,74), seguido por um aumento na de Sr (0,64 – 1,00) e Fe (0,28 – 1,00).

Neste conjunto, o teor de cinzas é inferior a 3 % com valor médio de 2,3 %. Há uma correlação negativa do Fe com Ca, K e Mn e entre o Sr com Rb e K, nas amostras o que pode explicar a mudança de comportamento com o subgrupo 1. A média da razão de um elemento em cada um dos agrupamentos está exposta na FIGURA 19 de modo a facilitar a visualização da tendência de como cada elemento analisado varia por *cluster*.

Das três amostras com informações desconhecidas, duas estão enquadradas no agrupamento 2, o pólen NI37, cujo padrão é análogo a polens de cidades ao redor da capital paranaense, enquanto que o SC16, assemelhou-se ao bioma cerrado de São Paulo (SP21).

Os polens PR40 e CE03 também possuem razões parecidas, porém diferenciam-se pôr o pólen paranaense apresentar maiores razões de Fe (1,00) e Cu (0,84), enquanto o do sertão cearense possui mais Sr (1,00) e S (0,94).

FIGURA 19 – DIVISÃO DOS AGRUPAMENTOS DE ACORDO COM A RAZÃO ELEMENTAR



FONTE: O autor (2022).

O terceiro *cluster* possui o menor número de amostras ($n = 11$) e é ilustrado por polens do Sudeste, onde o teor de cinzas é inferior a 2,5 % para a maioria das amostras, exceto RN10 e SP21. Observou-se que Zn e Cu se assemelharam ao primeiro *cluster* e suas razões minerais pouco diferem do grupo 2. Contudo há uma queda nas razões de P (0,37 – 0,71) e S (0,47 – 0,79, elementos fortemente correlacionados, quando comparado ao cluster 1 assim como a menor razão de Rb (0,00 – 0,41) entre os grupos.

CONCLUSÃO

O pólen apícola é um importante suplemento alimentar, desta forma, conhecer suas propriedades é essencial para segurança deste como alimento funcional. O uso da quimiometria possibilitou determinar com eficácia a forma de extração dos compostos orgânicos nas amostras, e assim, determinar a capacidade redutora dos polens brasileiros.

A quantidade de matéria orgânica no pólen apícola foi superior a 96 % da sua composição, o que causou interferências no processo de calibração do equipamento de fluorescência de raios X, desta forma, a padronização de algumas amostras por ICP-OES e FAAS não permitiu a obtenção de análises quantitativas de todas as amostras por EDXRF. Contudo, a análise qualitativa dos espectros obtidos proporcionou uma maior compreensão do comportamento dos polens.

Embora não haja uma clara separação por origem geográfica, os elementos K, Ca, Fe, Sr e Rb possibilitaram uma identificação regional dos polens estudados, pois amostras do Rio Grande do Norte e da Bahia se diferenciam pela influência de K e Ca, respectivamente, provavelmente por serem mais alcalinos, enquanto que, as amostras do Sul, principalmente do Paraná, apresentaram as maiores concentrações em Fe, por possuírem solos mais ácidos.

Portanto, a técnica se fez viável na avaliação qualitativa da composição elementar deste alimento, firmando-se como uma alternativa rápida e verde em comparação as demais técnicas espectroscópicas de rotina. Para melhorar a análise exploratória recomenda-se o uso de quantidades de amostras similares por estado de origem para obter dados mais representativos do local de coleta.

REFERÊNCIAS

- AČKAR, Đ.; FLANJAK, I. Safety aspects of bee pollen use in nutrition. **Scientific-professional journal of nutrition and dietetics**, v. 9, n. 2, p. 63–68, 2020.
- ALGETHAMI, J. S.; EL-WAHED, A. A. A.; ELASHAL, M. H.; AHMED, H. R.; ELSHAFIEY, E. H.; OMAR, E. M.; NAGGAR, Y. Al; ALGETHAMI, A. F.; SHOU, Q.; ALSHARIF, S. M. Bee Pollen : Clinical Trials and Patent Applications. **Nutrients**, v. 14, n. 2858, p. 1–26, 2022.
- ALTINER, D. D.; ALTUNATMAZ, S. S.; SABUNCU, M.; AKSU, F. In-vitro bioaccessibility of antioxidant properties of bee pollen in Turkey. v. 2061, n. June, p. 133–141, 2021.
- AMARAL, F. C. S. do; SANTOS, H. G. dos; ÁGLIO, M. L. D.; DUARTE, M. N.; PEREIRA, N. R.; OLIVEIRA, R. P.; CRVALHO JÚNIOR, W. de. Mapeamento de Solos e Aptidão Agrícola das Terras do Estado de Minas Gerais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 63, p. 95 p., 2004.
- BORG, D.; ATTARD, E. Honeybees and their products as bioindicators for heavy metal pollution in Malta. **Acta Brasiliensis**, v. 4, n. 1, p. 60, 2020.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL, M. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001** Ministério da **Agricultura e do Abastecimento**. [s.l: s.n.].
- BRASIL, M. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. Brasília: MAPA, 2019. 89–90 p.
- BURGER, A.; LICHTSCHEIDL, I. Strontium in the environment: Review about reactions of plants towards stable and radioactive strontium isotopes. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1458–1512, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.312>>.
- CARPES, S. T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S. M. de; MASSON, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1818–1825, 2007.
- CARPES, S. T.; DE ALENCAR, S. M.; CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; MOURÃO, G. B.; HAMINIUK, C. W. I.; DA LUZ, C. F. P.; MASSON, M. L. Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. **CYTA - Journal of Food**, v. 11, n. 2, p. 150–161, 2013.
- COELHO, M. S.; SILVA, J. H. V.; OLIVEIRA, E. R. A.; ARAÚJO, J. A.; LIMA, M. R. Alimentos Convencionais E Alternativos Para Abelhas. **Revista Caatinga**, v. 21, p. 01–09, 2008. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Alimentos+Conven>

cionais+e+alternativos+para+abelhas#0>.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE. Colorimetry: Technical Report. n. 3, p. 12–18, 2004.

DANEZIS, G. P.; GEORGIU, C. A. Elemental metabolomics: food elemental assessment could reveal geographical origin. **Current Opinion in Food Science**, v. 44, p. 100812, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100812>>.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 84–89, 2016.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037–1043, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067>>.

DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, M. L. M. F.; SATTTLER, J. A. G.; SOUZA, B. R.; FREITAS, A. da S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 808–815, 2016.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430–1435, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.031>>.

DÍA-GARCÍA, M. E.; BADÍA-LAÍÑO, R. Fluorescence | Instrumentation. **Encyclopedia of Analytical Science**, n. January 2013, p. 292–300, 2019.

DIONÍSIO, A. G. G.; DE JESUS, A. M. D.; AMAIS, R. S.; DONATI, G. L.; MIRANDA, K. dos A.; GUERRA, M. B. B.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Old and New Flavors of Flame (Furnace) Atomic Absorption Spectrometry. **International Journal of Spectroscopy**, v. 2011, p. 1–30, 2011.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; JOSÉ, R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno / ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

EMBRAPA. Solos do Estado de Santa Catarina: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. **Solos do Estado de Santa Catarina: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. n° 46, p. 745, 2004.

EMBRAPA. Mapa de solos do Estado do Paraná. **Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n. 16**, v. 96, n. 1, 2007.

FEDORUK, R. S.; ROMANIV, L. I.; KOVALCHUK, I. I. The content of certain heavy metals in tissues and products of honey-bees under the condition of their feeding with native soy flour adding chloride and aquanano chrome citrate. **The Animal Biology**, v. 17, n. 1, p. 140–148, 2015.

FENG, X.; ZHANG, H.; YU, P. X-ray fluorescence application in food, feed, and agricultural science: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 14, p. 2340–2350, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1776677>>.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; DILABIO, G. A.; INGOLD, K. U. Kinetics of the oxidation of quercetin by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph •). **Organic Letters**, v. 13, n. 18, p. 4826–4829, 2011.

GAZEY, C.; DAVIES, S. Soil acidity: a guide for WA farmers and consultants. **Department of Agriculture and Food**, v. Bulletin 4, p. 1–48, 2009.

GHIDOTTI, M.; PAPOCI, S.; DUMITRASCU, C.; ZDINIAKOVA, T.; FIAMEGOS, Y.; GUTIÑAS, M. B. de la C. ED-XRF as screening tool to help customs laboratories in their fight against fraud. State-of-the-art. **Talanta Open**, v. 3, n. December 2020, p. 100040, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100040>>.

GILCHRIST, A.; NOBBS, J. Colorimetry , Theory. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**, v. 1, n. January 2000, 2000.

GONZALVEZ, A.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1295–1311, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.08.001>>.

GRIFFITHS, K.; AGGARWAL, B.; SINGH, R.; BUTTAR, H.; WILSON, D.; DE MEESTER, F. Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. **Diseases**, v. 4, n. 4, p. 28, 2016.

INFOSANBAS. Informações contextualizadas sobre saneamento no Brasil. Brasil, 2022. Disponível em: <<http://www.celepar.pr.gov.br/>>. Acesso em: 1 set. 2022.

KASIANCHUK, V.; BERHILEVYCH, O.; NEGAI, I.; DIMITRIJEVICH, L.; MARENKOVA, T. Determination of Honey Geographic Origin According To Its Elemental Composition By the Method of X-Ray Fluorescence. **EUREKA: Life Sciences**, v. 2, n. 2, p. 12–19, 2019.

KAŠKONIENĖ, V.; RUOČKUVIENĖ, G.; KAŠKONAS, P.; AKUNECA, I.; MARUŠKA, A. Chemometric Analysis of Bee Pollen Based on Volatile and Phenolic Compound Compositions and Antioxidant Properties. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1150–1163, 2015.

KATERINOPOULOU, K.; KONTOGEORGOS, A.; SALMAS, C. E.; PATAKAS, A.; LADAVOS, A. Geographical origin authentication of agri-food products: A review. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 1–16, 2020.

KELLY, S.; HEATON, K.; HOOGEWERFF, J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 12, p. 555–567, 2005.

KER, J. C. Latossolos Do Brasil: Uma Revisão. **Geonomos**, v. 5, n. 1, p. 17–40, 1997.

- KOCOT, J.; KIEŁCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.; MUSIK, I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.
- LALHMINGHLUI, K.; JAGETIA, G. C. Evaluation of the free-radical scavenging and antioxidant activities of Chilauni, *Schima wallichii* Korth in vitro. **Future Science OA**, v. 4, n. 2, 2018.
- LAU, J. T. F.; WONG, Y. C. **Food and nutritional analysis | Antioxidants and preservatives**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. 374–380 p.
- LEBLANC, B. W.; DAVIS, O. K.; BOUE, S.; DELUCCA, A.; DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1299–1305, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.055>>.
- LEGLER, S. Pólen apícola. p. 16, 2002. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Pólen+apícola#0>>.
- LI, Q. Q.; WANG, K.; MARCUCCI, M. C.; SAWAYA, A. C. H. F.; HU, L.; XUE, X. F.; WU, L. M.; HU, F. L. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. **Journal of Functional Foods**, v. 49, n. August, p. 472–484, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.008>>.
- MACDOUGALL, D. B. **Colour measurement of food: principles and practice**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2010. 312–342 p.
- MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; DE ALMEIDA, E. X-ray fluorescence spectrometry for environmental analysis: Basic principles, instrumentation, applications and recent trends *Chemosphere*. **Chemosphere**, v. 303, p. 135006, 2022.
- MARKOVIC, I.; ILIC, J.; MARKOVIC, D.; SIMONOVIC, V.; KOSANIC, N. Color Measurement of Food Products using CIE L * a * b * and RGB Color Space. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 4, p. 50–53, 2013.
- MARTINELLO, M.; MUTINELLI, F. Antioxidant activity in bee products: A review. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 1–42, 2021.
- MARTÍNEZ, M. L.; PSUTY, N. P. **Coastal Dunes: Ecology and Conservation**. New York: Springer, 2008. 391 p.
- MCCOMB, J. Q.; ROGERS, C.; HAN, F. X.; TCHOUNWOU, P. B. Rapid screening of heavy metals and trace elements in environmental samples using portable X-ray fluorescence spectrometer, A comparative study. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, n. 12, 2014.
- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>>.
- MORGANO, M. A.; TEIXEIRA MARTINS, M. C.; RABONATO, L. C.; MILANI, R. F.; YOTSUYANAGI, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A comprehensive

investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: Geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 727–736, 2012.

MURASHOVA, E. A.; TUNIKOV, G. M.; NEFEDOVA, S. A. International Transaction Journal of Engineering , Management , & Applied Sciences & Technologies MAJOR FACTORS DETERMINING ACCUMULATION OF TOXIC ELEMENTS BY BEES AND HONEY PRODUCTS. v. 11, n. 3, p. 1–14, 2020.

NURDIANAH, H. F.; AHMAD FIRDAUS, A. H.; ESHAIFOL AZAM, O.; WAN ADNAN, W. O. Antioxidant activity of bee pollen ethanolic extracts from Malaysian stingless bee measured using DPPH-HPLC assay. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 1, p. 403–405, 2016.

OLEARI, C. **Current and future titles in the Society of Dyers and Colourists - John Wiley Series**. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 2016.

PANEBIANCO, S.; MAZZOLENI, P.; BARONE, G.; MUSUMARRA, A.; PELLEGRITI, M. G.; PULVIRENTI, A.; SCORDINO, A.; CIRVILLERI, G. Feasibility study of tomato fruit characterization by fast XRF analysis for quality assessment and food traceability. **Food Chemistry**, v. 383, n. February, p. 132364, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132364>>.

POHL, P.; DZIMITROWICZ, A.; LESNIEWICZ, A.; WELNA, M.; SZYMCZYCHAMADEJA, A.; JAMROZ, P.; CYGANOWSKI, P. Multivariable optimization of ultrasound-assisted solvent extraction of bee pollen prior to its element analysis by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 157, n. May, p. 105009, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105009>>.

PONTIS, J. A.; DA COSTA, L. A. M. A.; DA SILVA, S. J. R.; FLACH, A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 69–73, 2014.

QAZI, M. A.; MOLVI, K. I. Free Radicals and their Management. **American Journal of Pharmacy And Health Research**, v. 6, n. 4, p. 1–10, 2018.

ROSSI, M. **Mapa pedológico do Estado de São Paulo: revisado e ampliado**. São Paulo: Instituto Florestal, 2017. 118 p.

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, VIRLEI ÁLVARO DE LUMBRERAS, JOSÉ FRANCISCO COELHO, MAURÍCIO RIZZATO ALMEIDA, JAIME ANTONIO DE ARAÚJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, JOÃO BERTOLDO DE CUNHA, T. J. F.; SOLOS., E. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa, 2018. 356 p.

SANTOS, M. C. dos. Solos do semiárido do Brasil. **Cadernos do Semiárido - Solos do Semiárido do Brasil**, v. 10, p. 55, 2017.

SARAIVA, L. C. F.; CUNHA, F. V. M.; LÉLLIS, D. R. O. D.; NUNES, L. C. C. Composition, biological activity and toxicity of bee pollen: State of the art. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 17, n. 5, p. 426–440, 2018.

SATTLER, J. A. G.; DE MELO, I. L. P.; GRANATO, D.; ARAÚJO, E.; DA SILVA DE FREITAS, A.; BARTH, O. M.; SATTLER, A.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**, v. 77, p. 82–91, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>>.

SCHANDA, J. **Colorimetry: Understanding the CIE system**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p. 21, 2011.

SIPOS, L.; VÉGH, R.; BODOR, Z.; ZAUUU, J. L. Z.; HITKA, G.; BÁZÁR, G.; KOVACS, Z. Classification of bee pollen and prediction of sensory and colorimetric attributes—a sensometric fusion approach by e-nose, e-tongue and nir. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 23, p. 1–22, 2020.

STOCKMAN, A. Colorimetry. **digital Encyclopedia of Applied Physics**, p. 208–222, 2004.

SWIATLY-BLASZKIEWICZ, A.; PIETKIEWICZ, D.; MATYSIAK, J.; CZECH-SZCZAPA, B.; CICHOCKA, K.; KUPCEWICZ, B. Rapid and accurate approach for honeybee pollen analysis using ed-xrf and ftir spectroscopy. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 1–15, 2021.

TEIXEIRA-FILHO, C. D. **Teores de metais pesados em alguns solos do estado do Ceará**. 2016. Universidade Federal do Ceará, 2016.

THAKUR, M.; NANDA, V. Exploring the physical, functional, thermal, and textural properties of bee pollen from different botanical origins of India. **Journal of Food Process Engineering**, v. 43, n. 1, p. 1–14, 2020.

TSUJI, K.; NAKANO, K.; TAKAHASHI, Y.; HAYASHI, K.; RO, C. X-ray Spectrometry. **Analytical Chemistry**, n. 84, p. 636–668, 2011.

TYLER, G. Rubidium - availability and plant uptake in natural soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 14, n. 11, p. 1075–1089, 1983.

VÉGH, R.; CSÓKA, M.; SOROS, C.; SIPOS, L. Food safety hazards of bee pollen – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, n. February 2021, p. 490–509, 2022.

WAGH, V. M.; PANASKAR, D. Section A : Environmental Science Effect of Altered Environmental Conditions on Nutritional Quality of Bee Pollen : A Contemporary Overview Journal of Environmental Science , Computer Science and Engineering & Technology Section A : Environmental Science. **Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology**, v. 3, n. 4, p. 1814–1821, 2014.

ZAFEIRAKI, E.; KASLOTIS, K. M.; NISIANAKIS, P.; MANEA-KARGA, E.; MACHERA, K. Occurrence and human health risk assessment of mineral elements and pesticides residues in bee pollen. **Food and Chemical Toxicology**, v. 161, n. November

2021, p. 112826, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112826>>.

ZEHIROGLU, C.; OZTURK SARIKAYA, S. B. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 11, p. 4757–4774, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>>.

ANEXOS

**ANEXO I – AMOSTRAS DE PÓLEN, PERCENTUAL DE CINZAS E
CAPACIDADE REDUTORA PELO MÉTODO DPPH**

(continua)

Pólen	Cinzas	Inibição	EQ
	%	%	($\mu\text{g mL}^{-1}$)
RN01	3,57±0,04	86,1±1,04	714±10,2
RN02	4,00±0,04	37,0±0,96	255±8,97
CE03	2,59±0,01	58,1±1,78	452±16,6
BA04	2,63±0,06	29,0±1,90	180±17,9
BA05	3,24±0,04	13,3±1,64	32,7±15,4
SC06	2,94±0,01	57,6±1,30	448±12,2
PR07	2,30±0,03	10,9±0,72	9,99±6,76
CE08	3,28±0,02	20,2±0,30	97,0±2,70
PR09	2,55±0,01	77,3±1,58	621±14,8
RN10	2,65±0,03	34,1±1,15	227±10,7
PR11	2,36±0,02	43,9±0,14	319±1,34
RS12	2,96±0,01	76,2±1,29	621±12,1
SC13	2,54±0,09	79,7±0,15	655±1,42
PR14	2,77±0,04	44,2±1,21	344±11,4
PR15	2,63±0,00	41,3±0,15	295±1,42
SC16	2,23±0,06	33,9±1,21	225±11,4
RS17	2,30±0,36	19,6±1,18	97,7±1,42
SP18	2,04±0,03	22,0±0,15	114±1,42
MG19	2,20±0,07	30,0±0,61	189±5,69
PR20	1,87±0,03	72,5±1,50	587±14,2
SP21	2,20±0,02	25,2±1,06	144±9,91
SP22	2,37±0,01	84,5±1,32	699±12,4
MG23	3,05±0,02	21,1±0,61	105±5,71
NI24	2,66±0,05	52,0±0,75	395±7,08
PR25	2,22±0,03	70,0±0,57	563±5,35
PR26	2,43±0,01	44,2±0,96	322±9,06

(conclusão)

Pólen	Cinzas	Inibição	EQ
	%	%	($\mu\text{g mL}^{-1}$)
MG27	2,09 \pm 0,04	35,8 \pm 0,32	243 \pm 3,02
SP28	2,54 \pm 0,00	48,7 \pm 0,97	364 \pm 9,06
SP29	1,77 \pm 0,02	80,4 \pm 0,64	661 \pm 6,04
SP30	2,25 \pm 0,02	37,0 \pm 1,13	254 \pm 10,6
SP31	2,96 \pm 0,02	60,1 \pm 1,22	471 \pm 11,4
SP32	2,26 \pm 0,00	43,4 \pm 2,10	314 \pm 19,7
MG33	2,92 \pm 0,01	22,1 \pm 1,37	115 \pm 12,8
PR34	1,99 \pm 0,01	81,1 \pm 0,97	668 \pm 9,06
PR35	2,08 \pm 0,01	53,9 \pm 0,91	423 \pm 18,5
PR36	1,77 \pm 0,01	13,2 \pm 0,46	31,9 \pm 4,28
NI37	2,53 \pm 0,04	26,8 \pm 1,37	146 \pm 5,71
PR38	2,18 \pm 0,15	61,1 \pm 0,76	480 \pm 7,14
PR39	2,10 \pm 0,01	78,0 \pm 1,06	639 \pm 9,95
PR40	2,59 \pm 0,01	49,3 \pm 0,61	370 \pm 5,71

ANEXO II – COLORIMETRIA DOS POLENS ANALISADOS PELO SISTEMA CIE

(continua)

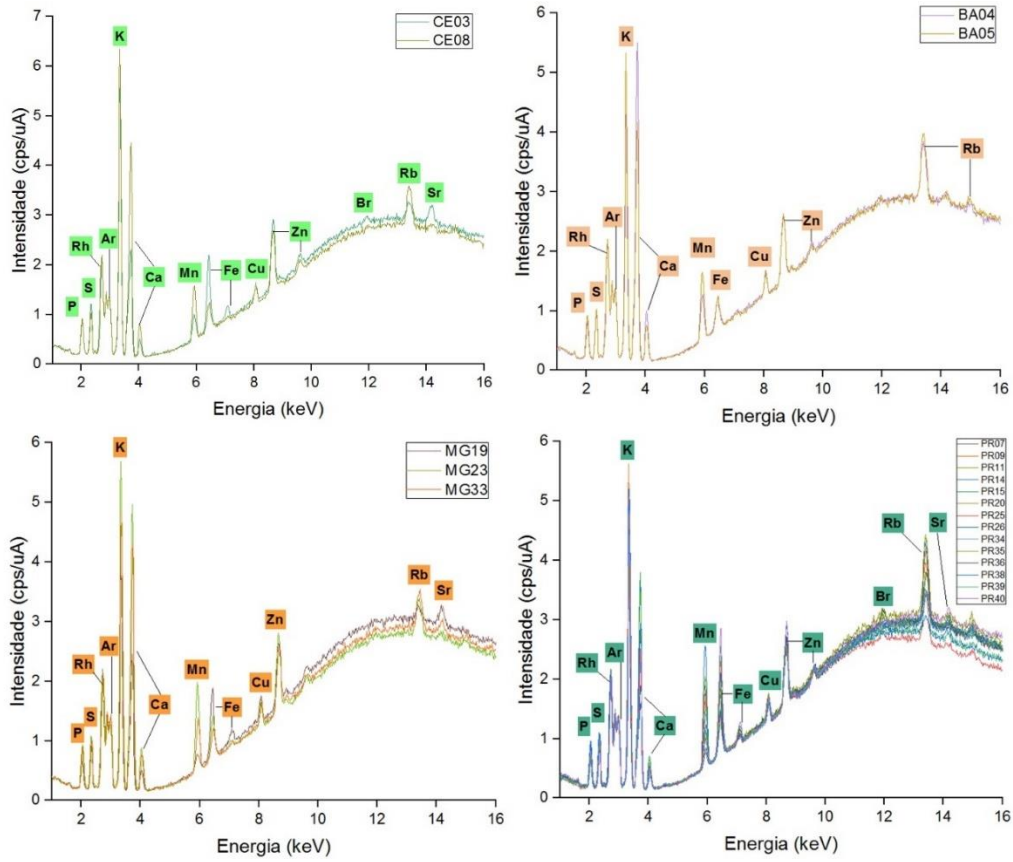
Pólen	L*	a*	b*	C*	ΔL^*	ΔC^*	ΔE^*_{ab}	Luminosidade e Croma
RN01	40,7	9,10	22,4	24,2	-3,75	-3,23	5,30	Escuro e opaco
RN02	38,7	9,10	18,5	20,6	-5,81	-6,76	9,54	Escuro e opaco
CE03	73,3	48,9	16,8	51,7	28,8	24,3	50,6	Claro e vívido
BA04	61,7	13,7	37,4	39,8	17,3	12,5	21,3	Claro e vívido
BA05	42,7	10,5	25,8	27,8	-1,81	0,43	2,75	Escuro e vívido
SC06	44,5	10,0	27,8	29,5	0,0	2,10	2,29	Escuro e vívido
PR07	50,2	29,4	22,2	36,8	5,76	9,44	22,1	Claro e vívido
CE08	44,5	8,42	26,1	27,4	0,0	0,0	0,0	Amostra padrão
PR09	52,3	23,6	30,8	38,8	7,78	11,4	17,7	Claro e vívido
RN10	47,8	18,7	31,1	36,3	3,35	8,90	11,9	Claro e vívido

(conclusão)

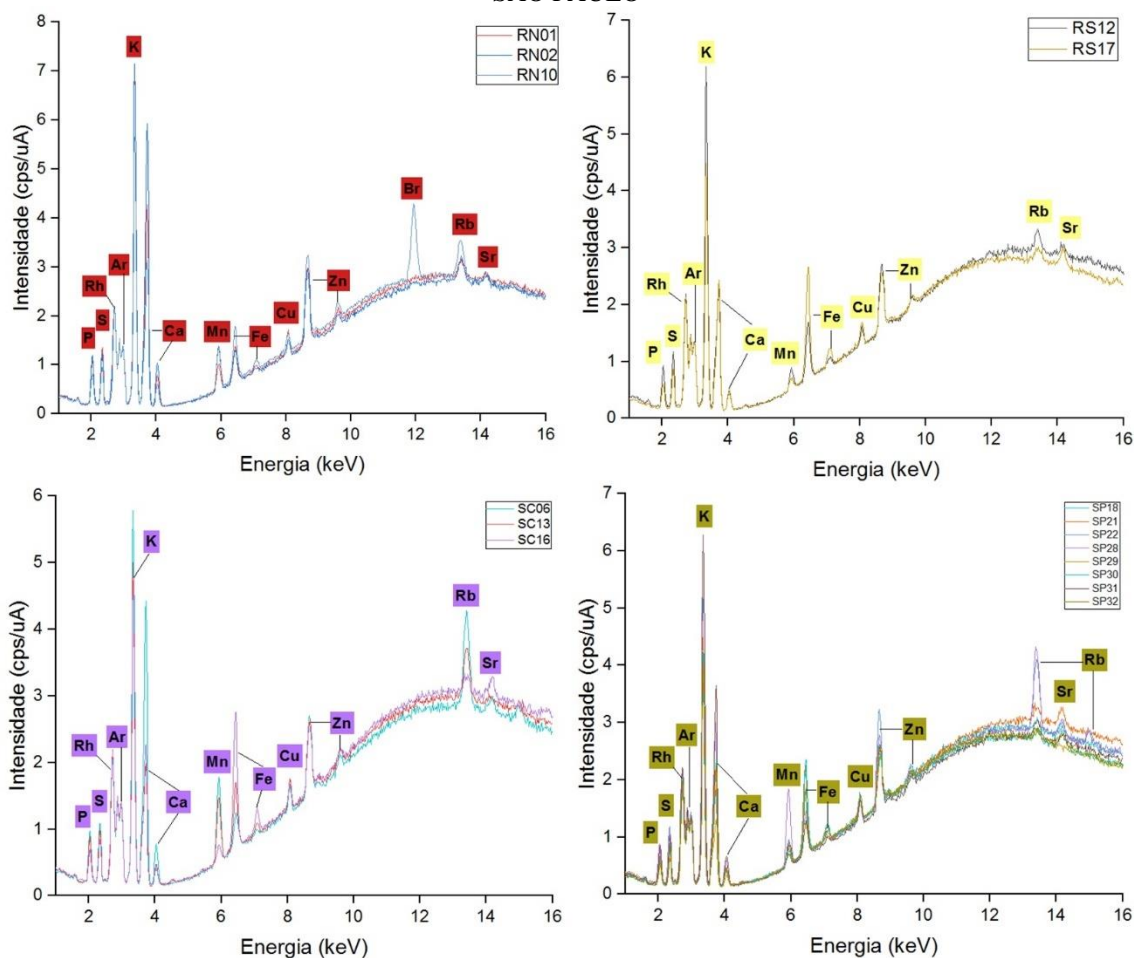
Pólen	L*	a*	b*	C*	ΔL*	ΔC*	ΔE*_{ab}	Luminosidade e Cromo
PR11	47,8	7,99	32,3	33,2	3,27	5,84	7,01	Claro e vívido
RS12	49,1	23,8	25,4	34,7	4,63	7,35	16,0	Claro e vívido
SC13	59,0	30,3	35,0	46,3	14,5	18,9	27,7	Claro e vívido
PR14	44,3	20,0	24,0	31,2	-0,22	3,84	11,8	Escuro e vívido
PR15	52,2	24,6	31,5	39,9	7,70	12,6	18,7	Claro e vívido
SC16	91,0	59,4	24,3	64,2	46,5	36,8	69,0	Claro e vívido
RS17	30,4	12,3	34,0	36,1	-14,1	8,71	16,6	Escuro e vívido
SP18	100,0	73,4	20,2	76,1	55,5	48,7	85,6	Claro e vívido
MG19	91,3	58,5	27,4	64,6	46,8	37,2	68,5	Claro e vívido
PR20	55,9	25,5	34,4	42,8	11,4	15,4	22,2	Claro e vívido
SP21	75,8	46,8	32,2	56,8	31,4	29,4	49,9	Claro e vívido
SP22	46,7	13,1	32,1	34,7	2,25	7,29	7,96	Claro e vívido
MG23	45,9	8,98	26,8	28,2	1,41	0,84	1,67	Claro e vívido
NI24	42,7	18,5	22,7	29,2	-1,81	1,84	10,7	Escuro e vívido
PR25	42,3	18,0	17,9	25,4	-2,18	-2,03	12,7	Escuro e opaco
PR26	72,3	45,4	15,2	47,9	27,8	20,5	47,5	Claro e vívido
MG27	65,8	40,6	15,2	43,3	21,4	16,0	40,1	Claro e vívido
SP28	87,0	45,3	13,7	47,4	42,5	20,0	57,6	Claro e vívido
SP29	70,7	38,5	13,8	40,9	26,3	13,5	41,8	Claro e vívido
SP30	100,0	74,9	24,3	78,8	55,5	51,4	86,6	Claro e vívido
SP31	56,9	32,9	16,9	37,0	12,4	9,61	29,0	Claro e vívido
SP32	100,0	70,1	22,3	73,5	55,5	46,1	83,0	Claro e vívido
MG33	40,0	9,80	21,3	23,4	-4,48	-3,96	6,70	Escuro e opaco
PR34	95,4	62,0	18,0	64,5	51,0	37,2	74,4	Claro e vívido
PR35	53,6	31,2	17,8	35,9	9,09	8,55	25,9	Claro e vívido
PR36	82,6	51,8	15,0	53,9	38,1	26,5	58,7	Claro e vívido
NI37	64,4	39,7	15,5	42,6	19,9	15,3	38,6	Claro e vívido
PR38	62,1	41,0	19,0	45,2	17,7	17,8	37,7	Claro e vívido
PR39	95,7	62,2	18,0	64,8	51,2	37,4	74,7	Claro e vívido
PR40	25,6	15,0	33,5	36,7	-18,8	9,34	21,3	Escuro e vívido

ANEXO III – ESPECTROS DE RAIOS X DOS POLENS PROVENIENTES DOS 8 ESTADOS BRASILEIROS

3.1 – ESPECTROS DOS ESTADOS DO CEARÁ, BAHIA, MINAS GERAIS E PARANÁ



3.2 – ESPECTRO DOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO NORTE E DO SUL, SANTA CATARINA E SÃO PAULO



ANEXO IV – COMPARAÇÃO DA RAZÃO DAS INTENSIDADES DOS PICOS DO MESMO ANALITO PRESENTE NA COMPOSIÇÃO DOS POLENS APÍCOLA

(continua)

	K/K	Ca/Ca	P/P	S/S	Zn/Zn	Fe/Fe	Mn/Mn	Cu/Cu	Rb/Rb	Sr/Sr	Br/Br
RN01	0,99	0,77	0,98	1,00	0,88	0,32	0,25	1,00	0,23	ND	ND
RN02	1,00	1,07	1,00	0,92	0,83	0,33	0,40	0,77	0,31	0,55	ND
CE03	0,77	0,38	0,76	0,94	0,77	0,69	0,23	0,68	0,24	1,00	0,21
BA04	0,58	1,00	0,64	0,74	0,61	0,24	0,37	0,75	0,58	0,70	ND
BA05	0,73	0,74	0,80	0,79	0,62	0,23	0,60	0,88	0,65	ND	ND
SC06	0,81	0,77	0,86	0,87	0,69	0,23	0,61	0,79	0,81	0,67	ND
PR07	0,71	0,48	0,64	0,77	0,64	0,29	0,64	0,75	0,67	ND	0,27
CE08	0,88	0,78	0,75	0,78	0,69	0,23	0,53	0,79	0,51	ND	ND
PR09	0,78	0,39	0,71	0,73	0,59	0,70	0,52	0,92	0,62	ND	ND
RN10	0,78	0,54	0,69	0,72	1,00	0,49	0,39	0,80	0,37	ND	1,00
PR11	0,63	0,59	0,57	0,74	0,60	0,23	0,74	0,79	0,86	ND	0,22
RS12	0,86	0,38	0,74	0,83	0,67	0,45	0,18	0,71	0,27	ND	ND
SC13	0,72	0,33	0,74	0,74	0,63	0,42	0,47	0,91	0,50	ND	ND
PR14	0,71	0,63	0,79	0,84	0,68	0,31	1,00	0,97	0,86	ND	ND

	(conclusão)										
	K/K	Ca/Ca	P/P	S/S	Zn/Zn	Fe/Fe	Mn/Mn	Cu/Cu	Rb/Rb	Sr/Sr	Br/Br
PR15	0,68	0,67	0,64	0,74	0,61	0,65	0,24	0,80	0,42	0,67	ND
SC16	0,65	0,39	0,52	0,62	0,58	0,97	0,11	0,79	0,21	0,90	ND
RS17	0,62	0,42	0,48	0,62	0,58	0,90	0,10	0,87	0,18	0,86	ND
SP18	0,58	0,35	0,50	0,66	0,61	0,66	0,08	0,86	0,17	0,78	ND
MG19	0,53	0,40	0,47	0,69	0,57	0,54	0,13	0,91	0,20	0,93	ND
PR20	0,53	0,48	0,55	0,67	0,58	0,28	0,30	0,91	0,74	ND	0,24
SP21	0,63	0,39	0,48	0,62	0,60	0,71	0,09	0,83	0,21	0,89	ND
SP22	0,76	0,30	0,68	0,90	0,94	0,52	0,20	0,89	0,00	ND	ND
MG23	0,79	0,86	0,78	0,80	0,74	0,32	0,70	0,89	0,40	ND	0,22
NI24	0,80	0,68	0,70	0,80	0,64	0,26	0,78	0,84	1,00	ND	0,22
PR25	0,58	0,43	0,63	0,68	0,57	0,32	0,60	0,84	0,00	ND	ND
PR26	0,69	0,49	0,62	0,67	0,61	0,49	0,12	0,82	0,22	0,65	ND
MG27	0,50	0,42	0,41	0,61	0,60	0,52	0,13	0,90	0,15	0,76	0,21
SP28	0,69	0,53	0,71	0,81	0,71	0,30	0,65	0,91	0,82	0,93	ND
SP29	0,59	0,20	0,37	0,47	0,47	0,25	0,15	0,72	0,17	ND	ND
SP30	0,59	0,39	0,48	0,59	0,55	0,78	0,12	0,78	0,18	0,85	ND
SP31	0,88	0,64	0,71	0,79	0,65	0,29	0,20	0,84	0,24	ND	0,19
SP32	0,59	0,37	0,48	0,64	0,59	0,53	0,15	0,90	0,17	0,71	ND
MG33	0,67	0,76	0,72	0,76	0,61	0,22	0,41	0,78	0,42	0,63	ND
PR34	0,57	0,43	0,54	0,69	0,54	0,60	0,42	0,81	0,38	ND	ND
PR35	0,66	0,41	0,61	0,72	0,54	0,52	0,28	0,81	0,46	ND	0,27
PR36	0,63	0,32	0,51	0,65	0,64	0,65	0,14	0,56	0,50	ND	0,30
NI37	0,63	0,33	0,49	0,56	0,59	0,54	0,09	0,78	0,20	0,77	0,16
PR38	0,78	0,26	0,78	0,80	0,61	0,46	0,35	0,66	0,35	ND	ND
PR39	0,61	0,41	0,55	0,68	0,55	0,86	0,47	0,78	0,41	ND	ND
PR40	0,70	0,45	0,62	0,72	0,79	1,00	0,23	0,84	0,32	0,64	ND

**ANEXO V – RAZÃO INTER ELEMENTO DA INTENSIDADE DOS PICOS DE
RAIOS X EM UMA MESMA AMOSTRA**

	Ca/K	Mn/Fe	P/S	Fe/Zn	Mn/Rb
RN01	0,60	0,73	0,82	0,39	0,82
RN02	0,82	1,13	0,92	0,42	0,98
CE03	0,38	0,31	0,68	0,96	0,73
BA04	1,32	1,45	0,74	0,41	0,47
BA05	0,77	2,47	0,84	0,39	0,69
SC06	0,73	2,47	0,83	0,36	0,57
PR07	0,52	2,10	0,70	0,47	0,72
CE08	0,68	2,14	0,81	0,36	0,79
PR09	0,39	0,70	0,83	1,25	0,63
RN10	0,53	0,75	0,81	0,52	0,79
PR11	0,72	3,00	0,65	0,41	0,65
RS12	0,34	0,38	0,75	0,71	0,51

(continua)

(conclusão)

	Ca/K	Mn/Fe	P/S	Fe/Zn	Mn/Rb
SC13	0,35	1,05	0,84	0,70	0,70
PR14	0,68	3,05	0,80	0,48	0,88
PR15	0,76	0,35	0,73	1,13	0,43
SC16	0,46	0,11	0,71	1,76	0,39
RS17	0,52	0,10	0,65	1,63	0,42
SP18	0,47	0,12	0,64	1,13	0,38
MG19	0,58	0,22	0,58	1,01	0,49
PR20	0,70	1,00	0,69	0,52	0,30
SP21	0,47	0,12	0,66	1,26	0,31
SP22	0,31	0,37	0,64	0,59	ND
MG23	0,84	2,07	0,83	0,45	1,31
NI24	0,65	2,86	0,74	0,43	0,59
PR25	0,57	1,78	0,79	0,59	ND
PR26	0,54	0,24	0,78	0,85	0,43
MG27	0,64	0,24	0,57	0,91	0,65
SP28	0,58	2,01	0,75	0,45	0,59
SP29	0,26	0,56	0,66	0,56	0,65
SP30	0,51	0,14	0,68	1,50	0,49
SP31	0,56	0,65	0,76	0,48	0,62
SP32	0,49	0,27	0,64	0,95	0,69
MG33	0,87	1,72	0,79	0,39	0,74
PR34	0,58	0,66	0,66	1,17	0,84
PR35	0,48	0,51	0,71	1,01	0,46
PR36	0,39	0,20	0,66	1,07	0,21
NI37	0,40	0,16	0,74	0,98	0,35
PR38	0,25	0,71	0,82	0,80	0,75
PR39	0,52	0,51	0,69	1,65	0,86
PR40	0,49	0,22	0,72	1,34	0,54