

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MEL E ATIVIDADE DA
ENZIMA INVERTASE EM *Apis mellifera* L.
AFRICANIZADAS**

ELVIRA MARIA ROMERO ARAUCO

**Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Zootecnia – Área de
Concentração: Nutrição e Produção Animal,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor.**

**BOTUCATU - SP
Agosto - 2005**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MEL E ATIVIDADE DA
ENZIMA INVERTASE EM *Apis mellifera* L.
AFRICANIZADAS**

ELVIRA MARIA ROMERO ARAUCO
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. SÍLVIA REGINA CUNHA FUNARI
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ducatti
Prof. Dr. Rubens Monti

**Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Zootecnia – Área de
Concentração: Nutrição e Produção Animal,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor.**

**BOTUCATU - SP
Agosto - 2005**

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo José Carlos

e

à minha filha Lilian Hortensia

Meus eternos amores

Ao meu irmão Waldo Francisco

Meu pai

Ofereço com amor

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. **Sílvia Regina Cunha Funari**, pela orientação segura, incentivo e amizade

Ao Prof. Dr. **Carlos Ducatti**, pela orientação nas análises isotópicas, apoio e confiança oferecida.

Ao Prof. Dr. **Rubens Monti**, pela orientação na dosagem da invertase, apoio e confiança oferecida.

Ao Prof. Dr. **Alcides Amorin Ramos**, pela orientação nas análises estatísticas e pela amizade.

Ao Presidente da Confederação Brasileira de Apicultura (CBA) **Joail Humberto de Abreu**, pelas amostras de méis doadas.

AGRADECIMENTOS

À **Maria Conceição Tenore do Carmo** pela amizade, apoio e auxílio na execução deste trabalho.

Aos professores:

Profa. **Claudia Pillonzzon** pelas fotografias e medição das glândulas.

Profa. **Silvia Maria Alves Gomes Dierckx**

Prof. **Ricardo Oliveira Orsi**

Prof. **Helio Carlos Rocha**

Prof. **Ademilson Espencer E. Soares**

Prof. **Nabor Veiga**

Profa. **Augusta Carolina C. C. Moreti**

Pela leitura minuciosa desta tese e valiosas sugestões.

Aos Professores. **Carlos Alfredo Lopez de Carvalho** Universidade Federal da Bahia e **Maria de Lourdes Queiros** da Universidade Federal de Pernambuco, pelas amostras de méis.

Aos Professores **Antonio Carlos Silveira** e **José Roberto Sartori**. pelo empréstimo de material de laboratório.

Ao senhor **José Henrique Fernandes Faraldo** da empresa “A Realeira” pela cessão de amostras de méis.

Aos funcionários **Evandro Tadeu da Silva**, **Cibeli Regina de Souza**, do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais. **Luis Alquati** do Departamento de Imunologia de Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Aos colegas **Bianca Jimenes de Abreu**, **Otávio Augusto Martins** e **Pedro Brandão Marti** pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Aos funcionários **Renato Monteiro Diniz** e **Gilson de Campos** pelo apoio e auxílio na execução deste trabalho.

Às funcionárias de Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Posto de Serviço – Lageado, **Carmen Sílvia de Oliveira Pólo** e **Seila Cristina Cassineli Vieira**, pela amizade, atenção e auxílio prestados.

À **CAPES** e a todos, que direta ou indiretamente, me auxiliaram na preparação desta tese, o meu reconhecimento.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
 CAPÍTULO 2.....	 9
Variabilidade isotópica do Carbono ($\delta^{0/00}_{13}\text{C}$) e Nitrogênio ($\delta^{0/00}_{15}\text{N}$) nas proteínas presentes em méis do Brasil	
1. Resumo.....	10
2. Abstract.....	11
3. Introdução.....	12
4. Material e métodos.....	14
4.1. Metodologia isotópica do Carbono e do Nitrogênio.....	14
4.1.1. Extração e análise isotópica da proteína do mel.....	15
4.2. Origem do mel e das amostras de méis.....	16
4.3. Estudo da sensibilidade e precisão do método isotópico.....	17
4.3.1. Adulteração do mel.....	17
4.4. Variabilidade isotópica do Carbono ($\delta^{0/00}_{13}\text{C}$) de méis comercializados no Brasil.....	17
4.4.1. Análise isotópica do Carbono e da proteína do mel.....	17
4.5. Variabilidade isotópica do Carbono ($\delta^{0/00}_{13}\text{C}$) e Nitrogênio ($\delta^{0/00}_{15}\text{N}$) de méis brasileiros.....	18
4.5.1. Análise isotópica do Nitrogênio ($\delta^{0/00}_{15}\text{N}$) da proteína do mel.....	18
4.6. Métodos estatísticos.....	18
5. Resultados e discussão.....	19
5.1. Sensibilidade e precisão do método isotópico em méis brasileiros com porcentagem de adulteração conhecida, utilizando a proteína como padrão interno.....	19
5.2. Variabilidade isotópica do Carbono ($\delta^{0/00}_{13}\text{C}$) em amostra de méis do Brasil.....	22
5.2.1. Região Sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.....	22

5.2.2. Região Sudeste: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais.:.....	26
5.2.3.Região Centro-Oeste: Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.....	30
5.2.4. Região Nordeste: Alagoas, Bahia, Piauí e Pernambuco.....	31
5.2.5.Região Norte: Rondônia e Pará.....	33
5.2.6. Regiões brasileiras.....	34
5.3. Variabilidade isotópica do Nitrogênio ($\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$) nas proteínas de amostras de méis brasileiros.....	36
5.3.1. Região Sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.....	36
5.3.2. Região Sudeste: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais.:.....	38
5.3.3.Região Centro-Oeste: Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.....	40
5.3.4. Região Nordeste: Piauí, Alagoas, Pernambuco e Bahia.....	40
5.3.5.Região Norte: Rondônia.....	41
5.3.6. Regiões brasileiras.....	42
5.4. Diferenciação botânica das proteínas dos méis de flores de Eucalipto e Laranjeira em diferentes estados brasileiros (origem botânica declarada).....	47
6. Conclusões.....	52
7. Referências Bibliográficas.....	53
 CAPÍTULO 3.....	 55
Determinação do pH mais eficiente da enzima invertase das glândulas hipofaringeas em <i>Apis mellifera</i> l. (africanizadas)	
1. Resumo.....	56
2. Abstract.....	57
3. Introdução.....	58
4. Material e métodos.....	59
4.1. Colônias utilizadas.....	59
4.2. Soluções tampões utilizadas e pHs estudados.....	59
4.3. Metodologia de análise.....	59
4.3.1. Elaboração da curva de referência para determinação de açúcares redutores.....	59
4.3.2. Atividade da enzima invertase em cinco diferentes valores de pH.....	60
4.3.3. Reutilização da enzima invertase para uma nova reação enzimática	61

4.4. Análise estatística.....	61
5. Resultados e discussão.....	62
5.1. Curva de referência para determinação de açúcares redutores	62
5.2. Atividade da enzima invertase em cinco diferentes valores de pH e o tempo de ação da invertase.....	62
5.3. Reutilização da enzima invertase para uma nova reação enzimática	65
6. Conclusões.....	66
7. Referências Bibliográficas.....	67
 CAPÍTULO 4.....	 68
Desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas em <i>Apis mellifera</i> L. (africanizadas)	
1. Resumo.....	69
2. Abstract.....	70
3. Introdução.....	71
4. Material e métodos.....	73
4.1. Colônias utilizadas.....	73
4.2. Obtenção das glândulas hipofaringeanas e metodologia utilizada.....	73
4.2.1. Classificação das glândulas hipofaringeanas de abelhas com 15 dias de idade.....	73
4.2.2. Desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas em abelhas coletoras de acordo com o tipo de alimento coletado.....	74
4.3. Análise estatística.....	74
5. Resultados e discussão.....	75
5.1. Classificação das glândulas hipofaringeanas de abelhas com 15 dias de idades quanto ao volume dos ácinos.....	75
5.2. Desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas em abelhas coletoras de acordo com o tipo de alimento coletado.....	83
6. Conclusões.....	85
7. Referências Bibliográficas.....	86

CAPÍTULO 5.....	88
Atividade da enzima invertase das glândulas hipofaringeanas em abelhas <i>Apis mellifera</i> L. (africanizadas)	
1. Resumo.....	89
2. Abstract.....	90
3. Introdução.....	91
4. Material e métodos.....	93
4.1. Colônias utilizadas.....	93
4.2. Metodologia de análise.....	93
4.2.1. Elaboração da curva de referência para determinação de açúcares redutores	93
4.2.2. Atividade enzimática da invertase das glândulas hipofaringeanas (µmol/min/glândula), em abelhas operárias com idades entre 4 a 35 dias.....	94
4.2.3. Porcentagem dos diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas, de acordo com a idade das abelhas operárias.....	95
4.2.4. Atividade enzimática da invertase em diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas.....	97
4.3. Análise estatística.....	97
5. Resultados e discussão.....	98
5.1. Curva de referência para determinação de açúcares redutores.....	98
5.2. Atividade enzimática da invertase das glândulas hipofaringeanas, em abelhas operárias com idades entre 4 e 35 dias.....	98
5.3. Porcentagem dos diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas, de acordo com a idade das abelhas operárias.....	100
5.4. Atividade da enzima invertase em diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas.....	102
6. Conclusões.....	105
7. Referências Bibliográficas.....	106
CAPÍTULO 6.....	108
IMPLICAÇÕES.....	109

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As abelhas melíferas desenvolveram vários mecanismos durante sua evolução para o processamento do néctar e pólen, de forma que o alimento distribuído na colônia fosse fornecido de acordo com o grau de desenvolvimento do indivíduo e suas necessidades (Michener, 1974). O néctar floral contém de 5 a 80% de açúcar e pequenas quantidades de compostos nitrogenados, sais minerais, ácidos orgânicos, vitaminas, lipídios, pigmentos e substâncias aromáticas (White Jr, 1975). Os principais açúcares encontrados no néctar são: sacarose, glicose e frutose, os quais podem variar de acordo com a espécie vegetal (White Jr, 1975). O néctar é apanhado pelas operárias coletoras e carregado na vesícula nectarífera para a colônia, repassado a outra operária ou depositado diretamente no favo (Michener, 1974). Segundo Maurizio (1957), durante o transporte do néctar são adicionadas enzimas provenientes das glândulas hipofaríngeas, as quais atuam no seu processamento, para transformá-lo em mel.

O mel é um alimento apreciado por seu sabor característico e pelo seu considerável valor nutritivo. A sua matéria-prima é o néctar das flores ou exsudados sacarídeos das partes vivas das plantas, coletado pelas abelhas melíferas, desidratado e armazenado em alvéolos nas suas colméias.

Entre os vários alimentos presentes na dieta humana, o mel talvez seja o alvo mais freqüente de adulterações ao longo da história (Doner, 1991).

À medida que novos tipos de adulterações foram ocorrendo, métodos analíticos foram se desenvolvendo com o intuito de detectá-los, tarefa cada vez mais difícil, dado à sofisticação cada vez maior observada nessa prática.

Até 1974, as adulterações mais comuns resumiam-se à adição de açúcar comercial ou açúcar invertido, sendo que as detecções das mesmas podiam ser feitas pela quantificação de hidroximetilfurfural (HMF). Esse composto, resultante da degradação da hexose, pode ser encontrado no mel em pequena quantidade. A sua presença em níveis maiores pode ser resultado de fraude por adição de açúcar comercial ou açúcar invertido rico em HMF. A detecção qualitativa e quantitativa de HMF era, até 1974, capaz de garantir a pureza do produto contra a principal fraude realizada até então (White Jr. e Doner, 1978 a). A partir daquele ano, no entanto, um novo tipo de adulteração começou a

ser realizado nos Estados Unidos, através da adição de HFCS (High Fructose Corn Syrup) ao mel, produto com um custo muito baixo, obtido a partir de tratamento enzimático do xarope de milho, e que possui a glicose (50%) e a frutose (42%) como principais elementos de sua composição. A sua adição ao mel não pode ser detectada pela pesquisa do HMF (White Jr e Doner, 1978a).

Em resposta a esse novo tipo de adulteração, novos métodos analíticos começaram a serem pesquisados, entre eles, o estudo da análise da variabilidade natural dos isótopos estáveis do carbono, expresso por $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ (delta per mil do Carbono- 13) (vide equação (1) - Material e Métodos, capítulo 2) (Doner e White Jr, 1977). Essa técnica já havia sido anteriormente empregada para detectar baunilha sintética em extratos naturais de baunilha, bem como a presença de sacarose em suco de laranja.

Os experimentos iniciais com mel foram realizados por Doner e White Jr. (1977), que coletaram cerca de 500 amostras representativas de méis com pureza certificada. O valor médio de todas as amostras foi $-25,2 \text{ }^{0/00}$ e o coeficiente de variação 3,7%. A aparente homogeneidade dos dados relativos à composição isotópica era um indicativo para que pesquisas, tivessem continuidade, utilizando a nova técnica. Esse método foi aprovado em 1978 e começou a ser utilizado para o controle da qualidade do mel nos Estados Unidos.

Em 1980, White Jr. demonstrou que amostras, com valores $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ entre $-23,4$ e $-21,5 \text{ }^{0/00}$, deveriam ser submetidas a teste adicional para que sua pureza fosse confirmada, já que havia sido observado que amostras, dentro dessa faixa, poderiam estar adulteradas com até 20% de subprodutos das plantas do Ciclo Fotossintético C_4 (xarope de açúcar ou milho), dependendo do valor de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ da amostra do mel puro no qual havia sido realizada a adulteração (White Jr, 1980). Outro problema também detectado com a nova técnica, referia-se a méis provenientes de plantas cítricas. Amostras de tais produtos apresentariam valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ menos negativos que a média encontrada para os demais. Levantou-se então a hipótese de que as colméias produtoras pudessem ter sido alimentadas artificialmente com soluções preparadas a partir de xarope de cana ou HFCS. Outra hipótese testada era que tais méis possuíam valor de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ menos negativo, devido à presença de adulterantes, entretanto, quando submetidos a provas complementares, os resultados foram negativos para presença de adulterantes (White Jr e Robinson, 1983).

Para avaliar essa possibilidade foram colhidas amostras de méis de plantas cítricas, bem como do néctar a partir do qual as abelhas haviam elaborado o produto (White Jr e Robinson, 1983). A diferença nos valores de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ entre o mel e o néctar seria um indicativo de adulteração do produto, no entanto, resultados iguais confirmaram a hipótese de que méis de plantas cítricas realmente apresentam $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ menos negativo.

Além da questão dos méis cítricos, alguns pontos relativos à nova metodologia começaram a serem discutidos:

a) Méis provenientes de *Acacia sp* também mostraram possuir valores de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ menos negativos que a grande maioria;

b) As plantas do Ciclo CAM (Ciclo do Metabolismo Ácido das Crassuláceas) possuíam valores de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ na faixa de $-13,1$ a $-14,4$ $^{0/00}$, o que permitia sugerir que os méis dessas fontes também teriam uma composição isotópica diferenciada, com valores maiores inclusive os cítricos;

c) A ampla faixa de valores considerada normal para méis puros ($\leq -23,5^{0/00}$) permitia, por exemplo, que a adição de 12,5% de HFCS a um mel com $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ de $-25,7$ $^{0/00}$, originasse um produto dentro da faixa de normalidade ($-23,7^{0/00}$), permitindo considerar pura uma amostra adulterada.

d) A técnica recomendada (TLC = cromatografia em camada delgada) para a análise das amostras situadas dentro da faixa suspeita ($-21,5$ a $-23,4$ $^{0/00}$) possuía vários inconvenientes: não era capaz de detectar fraude por adição de xarope de açúcar; o julgamento da amostra podia ser subjetivo já que muitas vezes as bandas cromatográficas eram muito tênues, difíceis de serem observadas; o HFCS muito refinado podia não ser detectado devido ao seu teor reduzido em oligossacarídeos.

Para superar todos esses inconvenientes que podiam ser os responsáveis por erros na avaliação da pureza das amostras, procurou-se alternativas que pudessem melhorar a confiabilidade dos resultados obtidos pela análise da composição isotópica das amostras de méis. Em 1989, White Jr. e Winters propuseram a utilização de um padrão interno para cada amostra, ou seja, algum componente próprio da amostra que serviria como padrão para a mesma, de maneira que, se a amostra fosse adulterada, a composição isotópica do padrão interno não se alteraria, mas a da amostra com um todo sim.

Passou-se então ao estudo do emprego da proteína do mel como padrão interno. Com base nos resultados, estabeleceu-se como método oficial a (AOAC, 2000), que afirma que a diferença entre o valor isotópico ($\delta^{0/00}_{13}\text{C}$) da proteína e do mel for maior ou igual a $-1^{0/00}$ ($\geq -1^{0/00}$), a amostra do mel analisada deve ser considerada adulterada (vide equação (2) – Material e Método).

A diferença entre o isótopo estável de carbono do mel e a da fração protéica, fornece indicação qualitativa e quantitativa de adulteração do mel, portanto, a determinação da composição isotópica dos átomos de carbono no mel é uma ferramenta analítica de grande importância para a detecção de adulteração no produto o que a torna, hoje, fundamental para o controle de qualidade do mel oferecido ao consumidor, prática comum utilizada no mercado internacional.

No Brasil, essa técnica tem sido muito pouco empregada, inclusive por desconhecimento de seu potencial como método analítico por parte dos órgãos competentes. Como resultado, pode-se estar adquirindo produtos que mesmo inspecionados pelos órgãos oficiais apresentam-se adulterados.

Com relação aos méis brasileiros, os dados disponíveis referem-se a duas amostras da década de 70, cujos resultados foram de $-25,00^{0/00}$ e $-25,6^{0/00}$ (White Jr e Doner, 1978a). Rossi *et al.* (1999) efetuaram a análise isotópica de 61 amostras de méis, encontrando os seguintes resultados médios: $-24,6^{0/00}$ para mel de flores de laranjeira, $-25,5^{0/00}$ floral, $-25,5^{0/00}$ eucalipto, $-25,1^{0/00}$ sem origem conhecida, sendo o valor médio para todas as amostras de $-25,4^{0/00}$. Dentre essas, cinco amostras encontravam-se adulteradas.

Um único trabalho sobre a adulteração de méis no Brasil refere-se a Padovan *et al.* (2003), que avaliaram quarenta amostras de méis do Brasil e oito importados da Argentina, Canadá e Estados Unidos. Estes autores encontraram que o valor para o mel e sua fração de proteína não diferem mais que $1^{0/00}$, encontrando seis amostras de méis brasileiros adulterados.

Com relação ao estudo da variabilidade natural dos isótopos estáveis do nitrogênio ($\delta^{0/00}_{15}\text{N}$) na proteína do mel, não foi encontrada nenhuma referência na literatura científica.

Além da produção de alimento larval, em *Apis mellifera* L., as glândulas hipofaringeanas também produzem enzimas necessárias ao metabolismo da abelha, tais como a invertase e a amilase nas operárias coletoras (Kratky, 1931; Maurizio, 1957; Simpson *et al.* 1968, Takenaka *et al.*, 1990a), a α -glicosidase e glicose-oxidase nas operárias nutrízes (White Jr *et al.*, 1963; Simpson *et al.*, 1968; Takenaka *et al.*, 1990a,b).

Mesmo com muitos estudos relacionados às glândulas hipofaringeanas das abelhas operárias existe considerável carência de publicações tratando da produção enzimática diária desta glândula, bem como da relação entre a morfologia e a atividade enzimática da invertase.

O presente trabalho foi dividido em capítulos abaixo-descritos devido à complexidade dos temas abordados na avaliação da qualidade do mel e na atividade enzimática da invertase das glândulas hipofaringeanas em abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

- Capítulo 2 : **Variabilidade isotópica do carbono ($\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$) nas proteínas presentes em méis do Brasil**, que será submetido à publicação na Revista *Zeitschrift fur Naturforschung*, de acordo com suas normas.
- Capítulo 3: **Determinação do pH mais eficiente da enzima invertase das glândulas hipofaringeanas em *Apis mellifera* L. (africanizada)**, que será submetido à publicação na Revista *Zeitschrift fur Naturforschung*, de acordo com suas normas.
- Capítulo 4: **Desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas em *Apis mellifera* L. (africanizadas)**, que será submetido à publicação na Revista *Zeitschrift fur Naturforschung*, de acordo com suas normas.
- Capítulo 5: **Atividade da enzima invertase das glândulas hipofaringeanas em abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas)**, que será submetido à publicação na Revista *Zeitschrift fur Naturforschung*, de acordo com suas normas.
- Capítulo 6: **Implicações**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC Official Method of Analysis. AOAC Official Method of Analysis 998.12. C-4 Plant Sugar in Honey CH 44, p.29 – 32, 2000.
- DONER, L. W. Verifying the authenticity of plant-derived material by stable isotope ratio and chromatographic methodologies. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.74, p.14-9, 1991.
- DONER, L. W.; WHITE JR., W. Carbon-13/12- ratio is relatively uniform among honeys. *Science*, v.197, p. 891-2, 1977.
- KRATKY, E. Morphologie und physiologie der drusen in kopf und thorax der honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zeitschrift fur Vergleichende Physiologie*, v.139, p.120-200, 1931.
- MAURIZIO, A. Break down of sugar by inverting enzymes in the pharyngeal glands and midgut of honeybees. *Bee World*, v.40. p. 275-83, 1957.
- MICHENER, C. D. The social behavior of the bees. Cambridge: Harvard University, p. 12, 1974. 189p.
- PADOVAN, G. J; DE JONG, D.; RODRIGUES, L. P.; MARCHINI, J. S. Detection of adulteration of commercial honey samples by the ¹³C/¹²C isotopic ratio. *Food Chemistry*, v.82, p. 633-636, 2003.
- ROSSI, N. F.; MARTINELLI, L. A.; LACERDA, T. H. M.; CAMARGO, P. B.; VICTORIA, R. L. Análise da adulteração de méis por açucares comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, p.3-8, 1999.
- SIMPSON, J.; RIEDEL, I. B. M.; WILDING, N. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, v.7, p.29-36, 1968.

- TAKENAKA, T.; MIWA, S.; ECHIGO, T. Changes of protein content and enzyme activity in hypopharyngeal glands during lifespan of honeybees workers (*Apis mellifera* L.). *Bulletin of the Faculty of Agriculture*, Tamagawa University, n.30, p.1-8, 1990a.
- TAKENAKA, T.; ITO, H.; YATSUNAMI, K.; ECHIGO, T. Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands during lifespan of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, p. 2133-4, 1990b.
- WHITE, JR. W. Composition of honey. In: *Honey: a comprehensive survey*. Ed. Crane, London: Heinemann. Ed., 1975, p.1157-206.
- WHITE, JR. W. High-fructose corn syrup adulteration of honey: confirmatory testing required with certain isotope ratio values. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.63, p.1168, 1980.
- WHITE, JR. W.; DONER L. W. Mass spectrometric detection of high-fructose corn syrup in honey by use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 61, p. 746-50, 1978a.
- WHITE, JR.; W. e ROBINSON, F. A. $\text{C}^{13}/\text{C}^{12}$ ratios of citrus honey and nectars and their regulatory implications. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.66, p.1-3, 1983.
- WHITE, JR. W.; WINTERS, K. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope detection of adulteration of honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.72, p.907-011, 1989.
- WHITE, JR. W.; SUBERS, M. H.; SCHEPARTZ, A. I. Identification of inhibine, the antibacterial factor in honey glucose oxidase system. *Biochimica et Biophysica. Acta*, Amsterdam, v.73, p.57-70, 1963.

VARIABILIDADE ISOTÓPICA DO CARBONO ($\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$) E NITROGÊNIO ($\delta^{0/00} {}^{15}\text{N}$) NAS PROTEÍNAS PRESENTES EM MÉIS DO BRASIL

1. Resumo

O mel é um alimento apreciado por seu sabor característico e pelo seu considerável valor nutritivo, no entanto, é alvo de freqüentes adulterações. A determinação da composição isotópica dos átomos de carbono no mel é uma ferramenta analítica de grande importância para a detecção de adulteração do produto, que a torna fundamental para o controle da qualidade do mel oferecido ao mercado consumidor internacional. Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho são analisar a sensibilidade e precisão do método isotópico com porcentagem de adulteração conhecida em méis brasileiros, utilizando a proteína como padrão interno, a variabilidade isotópica do Carbono ($\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$) de méis comercializados no Brasil e a variabilidade isotópica do Nitrogênio ($\delta^{0/00} {}^{15}\text{N}$). Para a análise isotópica do Carbono utilizou-se a metodologia da AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2000) e para a análise isotópica do Nitrogênio utilizou-se a metodologia modificada por Ducatti (2000). Diante dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a utilização da metodologia de determinação isotópica mostrou-se plenamente adequada na identificação de adulteração. A variação isotópica do $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ dos méis brasileiros esteve entre -23,82 a -28,29 ‰, de sua proteína entre -23,08 a -28,0 ‰ e do $\delta^{0/00} {}^{15}\text{N}$ de 1,8 a 15,4 ‰. A metodologia da determinação da razão isotópica do Carbono -13 e Nitrogênio -15 na proteína do mel poderia ser útil na identificação da origem botânica do mel, em alguns casos uniflorais, e a diferenciação de alguns Estados do Brasil na Região Nordeste. Constatou-se que das 211 amostras de méis puros dos Estados Brasileiros amostrados 92% foram considerados puros pelo critério de $\leq 7\%$ C₄, revelando um ótimo desempenho dos apiários nacionais.

Palavras-chave: mel, adulteração, análise isotópica, carbono -13, nitrogênio -15.

CARBON ($\delta^{0/00}^{13}\text{C}$) AND NITROGEN ($\delta^{0/00}^{15}\text{N}$) ISOTOPIC VARIABILITY IN THE PRESENT PROTEINS IN HONEYS OF BRAZIL.

2. Abstract

The honey is an appreciated food by its characteristic flavor and considerable nutritional value. However, it suffers frequent adulterations. The determination of carbon atoms isotopic composition in honey is an analytic option of great importance for the detection of adulteration in the product that makes it basic for the quality control of the offered honey in the consuming market. At this way, the aims of the present work had been to study the isotopic method sensitivity and precision in Brazilian honeys with known adulteration percentage, using the protein as internal standard; the carbon $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ isotopic variability of honeys commercialized in Brazil; and the nitrogen $\delta^{0/00}^{15}\text{N}$ isotopic variability of Brazilian honeys. For the carbon isotopic analysis it had been used AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2000) methodology and for the nitrogen isotopic analysis it had been used the methodology modified by Ducatti (2000). With the gotten results, it can be concluded that the use of isotopic determination methodology had been totally adequate in the identification of adulteration, consisting in a trustworthy analytical method. The variation isotopic of the $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ of the Brazilian honeys were among -23,82 to -28,29 ‰, of his/her protein -23,08 to -28,0 ‰ and of the nitrogen -15 from 1,80 to 15,40 ‰. The methodology of the determination of the ratio isotopic of the carbon -13 and nitrogen -15 in the protein of the honey could be useful in the identification of the botanical origin of the honey in some cases uniflorais, and the differentiation of some States of Brazil in the Northeast Area. It was verified that were considered of the 211 samples of pure honeys of States Brazilians 92% pure for the criterion of $\leq 7\% \text{ C}_4$, revealing a great acting of the national apiaries.

Key words: honey, adulteration, isotopic analysis, carbon -13, nitrogen -15.

3. Introdução

O mel é um alimento apreciado por seu sabor característico e pelo seu considerável valor nutritivo. Entre os vários alimentos constantes na dieta humana o mel talvez seja o alvo mais freqüente de adulterações ao longo da história (Doner, 1991).

Na medida em que novos tipos de adulterações ocorreram e se desenvolveram métodos analíticos com o intuito de detectá-las, tarefa difícil dado à sofisticação cada vez maior observada nessa prática. Até 1974 as adulterações mais comuns resumiam-se a adição de açúcar comercial ou açúcar invertido, sendo que as detecções das mesmas podiam ser feitas pela quantificação de hidroximetilfulfural (HMF). Esse composto resultante da degradação da hexose pode ser encontrado no mel, mas em pequena quantidade. A sua presença em níveis maiores pode ser resultado de três causas: superaquecimento do produto, estocagem prolongada e fraude por adição de açúcar comercial ou açúcar invertido rico em HMF. Nos dois primeiros casos, o aumento, embora exista, é menor quando comparado ao resultado da fraude pela adição dos compostos anteriores citados. Portanto, a detecção de HMF feita qualitativamente ou quantitativamente era, até 1974, capaz de garantir a pureza do produto contra a principal fraude realizada até então (White Jr. e Doner, 1978a). A partir daquele ano, um novo tipo de adulteração começou a ser realizado nos Estados Unidos através da adição de HFCS (High Fructose Corn Syrup) ao mel, produto com um custo de produção muito baixo, obtido a partir de tratamento enzimático do xarope de milho e que possui a glicose (50%) e a frutose (42%) como principais elementos de sua composição. A adição de HFCS ao mel não pôde ser detectada pela análise do hidroximetilfulfural (HMF) (White Jr. e Doner, 1978a).

Como resposta a esse novo tipo de adulteração, novos métodos analíticos começaram a ser pesquisados. Após algumas tentativas sem sucesso, iniciou-se o estudo do uso da análise da relação de isótopos estáveis de carbono como técnica analítica para detecção da adulteração em questão (Doner e White Jr, 1977). A aparente homogeneidade dos dados relativos à composição isotópica do mel era um indicativo para que as pesquisas tivessem continuidade e a nova técnica fosse aprovada. Em 1989 foi estabelecida a utilização de um padrão interno (proteína) para cada amostra, de maneira que se a amostra fosse adulterada a composição isotópica do padrão interno não se alteraria, mas a da amostra como um todo sim (White Jr. e Winters, 1989; White Jr., 1992), tornando-se,

portanto, uma ferramenta analítica de grande importância para a detecção de adulteração no mel.

No Brasil essa técnica tem sido muito pouco empregada, inclusive por desconhecimento de seu potencial como método analítico por parte dos órgãos competentes. Com relação aos méis brasileiros, os dados disponíveis referem-se a duas amostras da década de 70 cujos resultados do Carbono -13 foram de $-25,00\text{‰}$ e $-25,6\text{‰}$ (White Jr. e Doner, 1978a). Em outro trabalho, Rossi *et al.* (1999), efetuaram a análise isotópica de 61 amostras de méis encontrando os seguintes resultados médios: $-24,6\text{‰}$ para mel de flores de laranjeira, $-25,5\text{‰}$ floral, $-25,5\text{‰}$ flores de eucalipto e $-25,1\text{‰}$ sem origem conhecida, sendo o valor médio para todas as amostras de $-25,4\text{‰}$. Dentre estes, cinco amostras encontravam-se adulteradas. O único trabalho referente à adulteração de méis no Brasil é o de Padovan *et al.* (2003), que avaliaram quarenta amostras de méis do Brasil e oito importadas da Argentina, Canadá e Estados Unidos. Estes autores encontraram seis amostras de méis brasileiros adulteradas.

Mesmo com muitos estudos sobre a qualidade do mel, somente três publicações tratam do uso dos isótopos estáveis de carbono em méis exclusivamente do Brasil (White Jr. e Doner, 1978a, Rossi *et al.* 1999 e Padovan *et al.*, 2003).

Com relação ao estudo da variabilidade natural dos isótopos estáveis do nitrogênio ($\delta^{0/15}\text{N}$) na proteína do mel e no próprio mel, não se verificou nenhuma referência na literatura científica.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivos determinar:

- A sensibilidade e a precisão do método isotópico em méis brasileiros com porcentagem de adulteração conhecida, utilizando a proteína como padrão interno;
- A variabilidade isotópica do Carbono -13 de méis (proteínas) comercializados no Brasil;
- A variabilidade isotópica do Nitrogênio -15 nas proteínas dos méis brasileiros;
- A variabilidade isotópica do Carbono -13 e Nitrogênio -15 em méis de flores de Laranjeira e Eucalipto.

4. Material e Métodos

4.1. Metodologia Isotópica do Carbono e do Nitrogênio

As análises isotópicas do carbono e nitrogênio foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Unidade Auxiliar do Instituto de Biociências, UNESP, Campus Botucatu.

Os isótopos estáveis do carbono são o Carbono -12 (^{12}C) e o Carbono -13 (^{13}C), os quais apresentam abundância natural de 98,98 e 1,11 átomos ‰, respectivamente. A variabilidade natural é mensurada na terminologia delta per mil ($\delta^{0}_{\text{‰}}$) e determinada por espectrometria de massa, através da expressão (1):

$$\delta^{0}_{\text{‰}} \text{ } ^{13}\text{C} = [(\text{R}_{\text{am}}/\text{R}_{\text{pad}}) - 1] 1000 \quad (1)$$

Na expressão (1), R é a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e do padrão, respectivamente. O padrão internacional para o carbono é o PDB (*Bellemnitella americana* do período cretáceo da formação PeeBee da Carolina do Sul, EUA) (AOAC, 1984).

Os isótopos estáveis de nitrogênio são, nitrogênio -14 (^{14}N) e o nitrogênio -15 (^{15}N), os quais apresentam abundância natural de 99,63 e 0,37 átomos ‰, respectivamente. A variabilidade natural é mensurada e determinada pela expressão (1), na qual, R refere-se a razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ da amostra e do padrão, respectivamente. O padrão para o nitrogênio é o ar atmosférico, no qual é considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre (Ducatti, 2000).

O valor isotópico do Carbono -13 encontrado nos méis, é reflexo primário da alimentação das abelhas em plantas do Ciclo Fotossintético C_3 , C_4 e CAM.

As plantas ao absorver o CO_2 da atmosfera discriminam átomos de ^{13}C e, portanto, terão mais átomos de ^{12}C que o ar atmosférico. As plantas que seguem o Ciclo Fotossintético C_3 fazem essa discriminação isotópica diferenciada (o primeiro composto orgânico sintetizado durante a fotossíntese possui três átomos de carbono) das plantas que seguem o Ciclo Fotossintético C_4 (o primeiro composto orgânico formado durante a fotossíntese possui quatro átomos de carbono). Assim sendo, os valores de $\delta^{0}_{\text{‰}} \text{ } ^{13}\text{C}$ desses

dois tipos de plantas são distintos. Tipicamente, os valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ das plantas do Ciclo Fotossintético C_3 variam entre -34 a -25‰ , sendo os valores médios mais comuns de -29 a -26‰ . A variação isotópica nas plantas do tipo do Ciclo Fotossintético C_4 é menor, variando de -15 a -11‰ , sendo os valores mais comumente encontrados de -13 a -12‰ . Já as variações isotópicas nas plantas do Ciclo Fotossintético CAM, variam de -12‰ a -15‰ , dependendo das condições ambientais (White Jr. e Doner, 1978a).

Não se observam na literatura, dados referentes à variabilidade isotópica do nitrogênio ($\delta^{0/00}^{15}\text{N}$) em méis e proteínas, mas em princípio, a variabilidade será reflexo das plantas do Ciclo Fotossintético C_3 , C_4 e CAM.

4.1.1. Extração e análise isotópica da proteína do mel

Utilizou-se a metodologia oficial da AOAC, 2000 para a extração da proteína, análise e interpretações isotópicas.

Nessa extração utilizou-se 10 a 12 gramas de mel. Diluiu-se em 4ml de água, para posteriormente peneirar em malha de 100 – 150 mesh (fibra sintética).

Nessa diluição limpa de impurezas, adicionou-se 2ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) na concentração de 0,335M e 2ml de ácido Tungstico (Tungstato de sódio – $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 10% em tubo de 50ml. Homogeneizou-se esta solução no agitador Vortex para tubos, durante aproximadamente 1 minuto.

Na sequência, colocou-se em banho-maria no agitador à temperatura de 80°C por três a quatro horas. Após a retirada do banho-maria, acrescentou-se água destilada em cada tubo, até completar 40ml. Posteriormente centrifugou-se a 3000rpm, durante 5 minutos. Retirou-se em seguida o sobrenadante e completou-se com água destilada para agitar no Vortex. Repetiu-se o processo de lavagem por 4 vezes ou até obter uma solução cristalina. O precipitado formado (proteína) foi transferido para tubos *ependorf* e seco em estufa a 55°C por aproximadamente 24 horas.

Nas análises isotópicas foram utilizadas alíquotas de méis (0,06mg) e de proteínas (0,1 – 0,3mg) para Carbono – 13 e alíquotas de proteínas (0,5 – 0,8mg) para Nitrogênio – 15. As análises foram efetuadas no espectrômetro de massa (DELTA S – Finnigam Mat.)

acoplado ao Analisador Elemental (EA 1108 – CHN, Fisons), com erro analítico da ordem de 0,2‰.

4.2. Origem do mel e das amostras de méis

O mel foi elaborado pela *Apis mellifera* L. descartando qualquer outro tipo de mel, produzido por outras abelhas. Para as análises das diluições isotópicas (construção da curva de adulteração) o mel de flores de Laranjeira foi adquirido de um apicultor do município de Botucatu, Estado de São Paulo.

Para as análises isotópicas da variabilidade do Carbono -13 e Nitrogênio -15, as amostras de méis foram obtidas de apicultores de diversos Estados do Brasil, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Número de amostras de méis das Regiões Brasileiras

Região	Estado	Número de amostras
SUL	Rio Grande do Sul (RS)	40
	Santa Catarina (SC)	42
	Paraná (PR)	8
SUDESTE	São Paulo (SP)	31
	Minas Gerais (MG)	5
	Rio de Janeiro (RJ)	44
CENTRO-OESTE	Mato Grosso do Sul (MS)	5
	Mato Grosso (MT)	3
	Goiás (GO)	1
NORTE	Rondônia (RO)	8
	Pará (PA)	1
NORDESTE	Bahia (BA)	12
	Alagoas (AL)	3
	Pernambuco (PE)	7
	Piauí (PI)	1

Não foram conseguidas amostras provenientes dos demais estados.

4.3. Estudo da sensibilidade e precisão do método isotópico

Nas análises isotópicas do carbono utilizou-se a proteína como padrão interno e a porcentagem de adulteração foi determinada pela expressão (2):

$$\% \text{ Adulteração} = [(\delta^{0/00} \text{ } ^{13}\text{C} \text{ proteína} - \delta^{0/00} \text{ } ^{13}\text{C} \text{ mel})] / [(\delta^{0/00} \text{ } ^{13}\text{C} \text{ proteína} - \delta^{0/00} \text{ } ^{13}\text{C} \text{ adulterante})] 100 \quad (2)$$

Na expressão (2), a diferença no valor isotópico ($\delta^{0/00} \text{ } ^{13}\text{C}$) entre a proteína e o mel, com valor de $-1^{0/00}$ corresponde à inclusão de 7% de subprodutos das plantas de Ciclo Fotossintético C_4 . Nesse limite e abaixo desse valor ($\leq -1^{0/00}$) ou ($\leq 7\% \text{ C}_4$), o método oficial da AOAC (2000) considera o mel puro, conseqüentemente valores acima desses ($\geq -1^{0/00}$) ou ($\geq 7\% \text{ C}_4$) são considerados méis adulterados. São considerados como 0% valores finais negativos obtidos no cálculo porcentual da adulteração (% C_4).

4.3.1. Adulteração do mel

Os adulterantes utilizados foram: glicose de milho adquirida em supermercados no comércio de Botucatu, Estado de São Paulo e xarope de açúcar invertido (5 kg de açúcar em 1,8L de água e 10 gramas de ácido tartárico).

As adulterações foram efetuadas pelo acréscimo de glicose de milho ou xarope de açúcar invertido ao mel, nas seguintes proporções: 1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 20%, 30%, 40%, 60% e 100%, tanto para o açúcar invertido como para a glicose de milho.

4.4. Variabilidade isotópica do carbono ($\delta^{0/00} \text{ } ^{13}\text{C}$) de méis comercializados no Brasil

4.4.1. Análise isotópica do carbono e da proteína do mel

Para a análise isotópica do carbono do mel e da proteína utilizou-se a metodologia da AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2000). As porcentagens de adulterações das amostras foram determinadas pela expressão (3):

$$\%C_4 = \{[\delta^{13}C_{\text{proteína}} - \delta^{13}C_{\text{Mel}}]/[\delta^{13}C_{\text{proteína}} - (-9,7)]\} \times 100 \quad (3)$$

Na expressão (3) o $\delta^{13}C_p$ e o $\delta^{13}C_M$ são os valores de $\delta^{13}C$ da proteína e do mel, respectivamente e $-9,7\text{‰}$ é o valor medido do HFSC (High Fructose Corn Syrup).

4.5. Variabilidade isotópica do Carbono ($\delta^{13}C$) e Nitrogênio ($\delta^{15}N$) de méis brasileiros

4.5.1. Análise isotópica do Nitrogênio ($\delta^{15}N$) da proteína do mel

Para estudar a variabilidade isotópica do Nitrogênio $\delta^{15}N$ nas proteínas dos méis de alguns estados do Brasil, utilizou-se o mesmo método do Carbono, com adaptações para o Nitrogênio (Ducatti, 2000).

4.6. Métodos estatísticos

Os dados do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ foram submetidos à análise de variância, pelo método dos quadrados mínimos, utilizando-se o procedimento GLM, descrito no SAS (1999), tendo como causa de variação os estados ($i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$ e 12) (com exceção de Goiás, Pará e Piauí por apresentar uma única amostra), e as regiões ($j = 1, 2, 3, 4$ e 5). As diferenças entre as médias foram submetidas ao teste de Tukey, com 5% de significância.

5. Resultados e Discussão

5.1. Sensibilidade e precisão do método isotópico em méis brasileiros com porcentagem de adulteração conhecida utilizando a proteína como padrão interno

A Tabela 2 e a Figura 1 mostram os valores de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ das diferentes porcentagens do adulterante xarope de açúcar invertido.

Tabela 2. Valores de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ obtidos pela adição de quantidades crescentes para xarope de açúcar invertido em mel de flores de Laranjeira.

% adicionada de xarope de açúcar invertido	Mel $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$	Proteína $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$	Diferença entre o $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ da proteína e do mel	% calculada de xarope de açúcar invertido
0	-24,24	-24,23	0,01	0,0
1	-24,18	-24,08	0,10	0,8
3	-24,04	-24,62	-0,58	4,6
5	-23,67	-24,68	-1,01	8,0
7	-23,36	-24,71	-1,35	10,7
10	-23,02	-24,66	-1,64	13,0
20	-21,86	-24,75	-2,89	22,7
30	-21,01	-24,85	-3,84	30,0
40	-19,04	-23,82	-4,78	40,6
60	-16,47	-23,19	-6,72	60,3
100	-12,04	0,00	-12,04	100,0

Os resultados da Tabela 2 (colunas 4 e 5) mostram diferença de $-0,58^{0}_{00}$ a partir de 3% de adulteração, entretanto pelo método oficial é considerado mel puro. O percentual de adulteração (Coluna 5) foi obtido através da expressão (3), item 4.3.1, onde foi utilizado o valor de $-12,04^{0}_{00}$ para o adulterante.

A Figura 1, ilustra as diluições efetuadas, obtendo-se a expressão (4):

$$Y = -24,29868 + 0,124448(X); \quad R^2 = 0,9985 \quad (4)$$

Na expressão (4), (X) refere-se ao percentual de adulteração e (Y) ao valor de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$, colunas 1 e 2 respectivamente da Tabela 2.

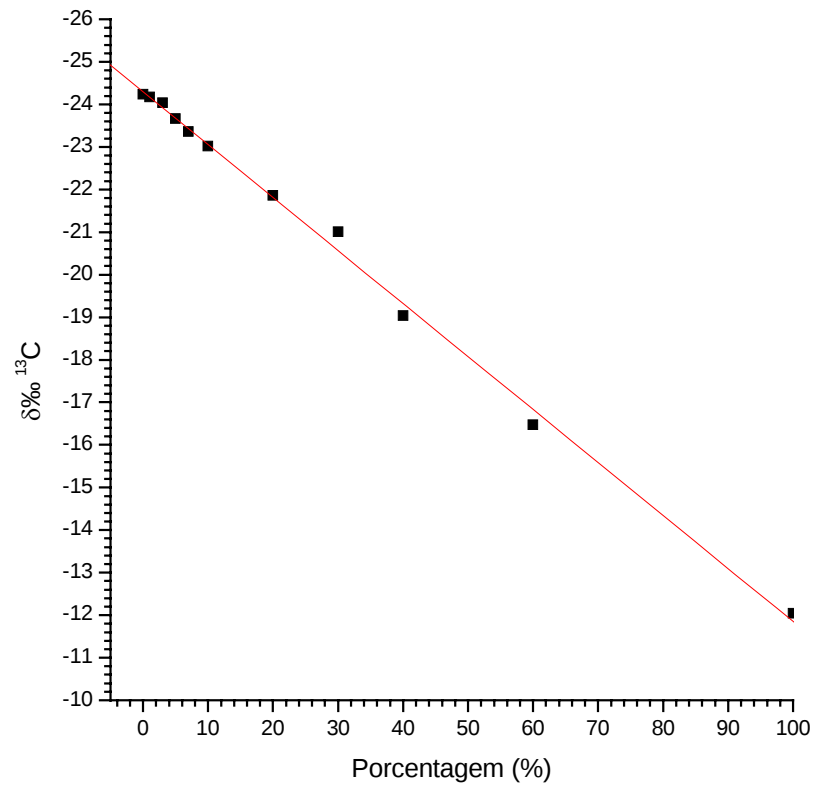


Figura 1. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos pela adição de quantidades crescentes para xarope de açúcar invertido em mel de flores de Laranjeira.

Tabela 3: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos pela adição de quantidades crescentes para glicose de milho em mel de Laranjeira.

% adicionado de glicose de milho	Mel	Proteína	Diferença entre o $\delta^{13}\text{C}$ da proteína e do mel	% calculado de glicose de milho
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$		
0	-24,24	-24,09	0,15	0,0
1	-24,10	-24,23	-0,13	1,0
3	-23,83	-24,42	-0,59	4,4
5	-23,73	-24,82	-1,09	7,8
7	-23,54	-24,90	-1,36	9,7
10	-22,99	-24,67	-1,68	12,2
20	-21,69	-24,82	-3,13	22,4
30	-20,22	-24,64	-4,42	32,1
40	-19,21	-24,08	-4,87	36,8
60	-16,14	-23,54	-7,40	58,4
100	-10,86	00,00	-10,86	100,0

A Tabela 3 e a Figura 2, mostram os valores de $\delta^{0}_{00} {}^{13}\text{C}$ das diferentes porcentagens do adulterante glicose de milho. Também demonstra diferenças de $-0,13\text{‰}$ a partir de 1% de adulteração, cujo valor é considerado puro pela metodologia oficial. O percentual de adulteração (coluna 5) foi obtido através da expressão (3), item 4.3.1, onde foi utilizado o valor de $-10,86\text{‰}$ para o adulterante glicose de milho.

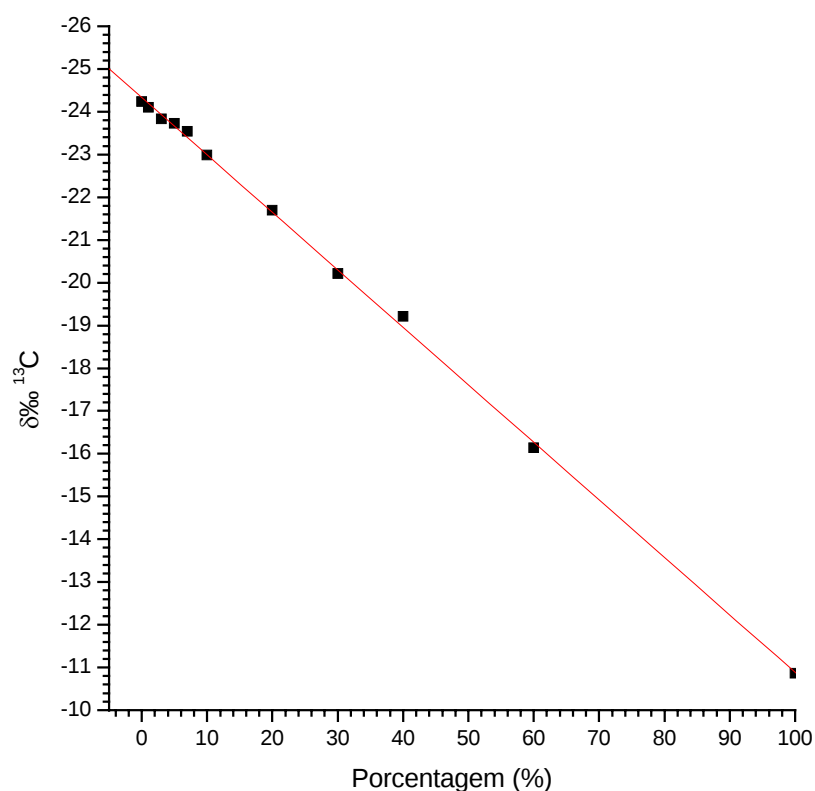


Figura 2. Valores de $\delta^{0}_{00} {}^{13}\text{C}$ obtidos da adição de quantidades crescentes para glicose de milho, em amostra do mel de flores de Laranjeira.

A Figura 2 ilustra as diluições efetuadas, obtendo-se a expressão (5):

$$Y = -24,33386 + 0,1345(X); R^2 = 0,9996 \quad (5)$$

Na expressão (5), X representa o percentual de adulteração (coluna 1) e (Y) refere-se ao valor de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ (coluna 2) da Tabela 3.

A metodologia oficial (AOAC, 2000) expressa as diluições efetuadas no intervalo de $-0,3^{0/00}$ a $-1,9^{0/00}$, corresponde ao intervalo de 2,1 a 13,65 de percentual de adulteração (%C₄). Semelhante intervalo foi observado nas diluições (Tabela 2), com intervalo de $0,01^{0/00}$ a $-1,64^{0/00}$, correspondente ao intervalo de 0% a 13% de xarope de açúcar invertido. As mesmas observações foram constatadas com as diluições de glicose de milho (Tabela 3) com intervalo de $-0,13^{0/00}$ a $-1,68^{0/00}$ e com correspondência de 1,0% a 12,2%. Estes resultados atestaram a sensibilidade e a precisão do método em relação ao método oficial.

5.2. Variabilidade isotópica do Carbono ($\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$) em amostra de méis do Brasil

O valor isotópico do adulterante empregado poderia ser o açúcar invertido ($12,04^{0/00}$), glicose de milho ($-10,86^{0/00}$) ou o valor do HFCS do método oficial ($-9,7^{0/00}$).

No estudo da variabilidade isotópica do Carbono -13 nos méis do Brasil, optou-se pelo valor oficial do adulterante HFCS ($-9,7^{0/00}$) expressa na expressão (3) do item 4.3.1 a qual permite detectar o percentual de adulteração.

No entanto, resultados que apresentam diferenças entre o valor isotópico ($\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$) da proteína e do mel respectivamente, expresso por $\geq -1^{0/00}$ são considerados amostras adulteradas. Os valores isotópicos negativos e inferiores a esse intervalo ($\leq -1^{0/00}$) indicam contaminações e/ou adulterações por subprodutos das plantas do Ciclo Fotossintético C₄, entretanto, pelo método oficial são considerados méis puros.

5.2.1. Região Sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul

Os resultados da variabilidade isotópica dos méis dos Estados da Região Sul encontram-se nas Tabelas 4, 5, 6 e os valores médios na Tabela 7.

Tabela 4. Valores de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ das amostras do Estado do Paraná.

Amostra	$\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$		Diferença	% adulteração
	Mel	Proteína		
1	-27,14	-27,54	-0,40	2,2
2	-26,05	-26,34	-0,29	1,7
3	-26,34	-26,80	-0,46	2,7
4	-26,75	-26,59	0,16	0
5	-26,88	-26,96	-0,08	0,5
6	-25,83	-26,66	-0,83	4,5
7	-24,05	-25,27	-1,22	7,8
8	-26,64	-26,97	-0,33	1,9
Média	-26,21±0,91	-26,64±0,62		

Valores em vermelho ($\geq -1^{0}_{00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0}_{00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito).

Tabela 5. Valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ das amostras do Estado de Santa Catarina.

Amostras	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$			% adulteração
	Mel	Proteína	Diferença	
1	-25,65	-25,67	-0,02	0
2	-24,77	-25,36	-0,59	3,8
3	-25,66	-25,70	-0,04	0,3
4	-26,15	-25,47	0,68	0
5	-26,01	-25,53	0,48	0
6	-26,27	-25,70	0,57	0
7	-26,43	-25,41	1,02	0
8	-25,65	-26,14	-0,49	3,0
9	-26,58	-27,45	-0,87	4,9
10	-27,03	-27,79	-0,76	4,2
11	-26,89	-27,33	-0,44	2,5
12	-27,48	-27,07	0,41	0
13	-26,90	-27,12	-0,22	1,3
14	-26,75	-26,99	-0,24	1,4
15	-26,99	-26,71	0,28	0
16	-26,28	-25,56	0,72	0
17	-26,31	-25,97	0,34	0
18	-26,35	-26,04	0,31	0
19	-26,28	-25,47	0,81	0
20	-26,25	-26,30	-0,05	0,3
21	-26,25	-26,26	-0,01	0,1
23	-24,50	-25,97	-1,47	9,0
24	-26,32	-26,23	0,09	0
26	-26,26	-26,26	0,00	0
27	-26,18	-26,34	-0,16	1,0
28	-24,63	-26,31	-1,68	10,1
29	-26,39	-26,27	0,12	0
30	-26,38	-26,48	-0,10	0,6
31	-26,19	-26,19	0,00	0
32	-26,33	-26,23	0,10	0
33	-26,23	-26,11	0,12	0
34	-25,95	-25,66	0,29	0
35	-26,25	-26,01	0,24	0
37	-26,10	-25,93	0,17	0
38	-26,32	-26,37	-0,05	0,3
39	-26,02	-25,72	0,30	0
40	-26,23	-26,42	-0,19	1,1
41	-26,03	-25,94	0,09	0
42	-26,05	-26,18	-0,13	0,8
Média	-26,19±0,58	-26,22±0,59		

Valores em vermelho ($\geq -1^{0/00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0/00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito)

Tabela 6. Valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ das amostras do Estado de Rio Grande do Sul.

Amostra	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$			% adulteração
	Mel	Proteína	Diferença	
1	-27,70	-27,47	0,23	0
2	-27,54	-26,90	0,64	0
3	-27,19	-26,59	0,60	0
4	-27,52	-27,15	0,37	0
5	-27,39	-27,23	0,16	0
6	-25,75	-26,60	-0,85	5,0
7	-27,92	-27,55	0,37	0
8	-26,28	-26,20	0,08	0
9	-25,94	-26,12	-0,18	1,1
10	-27,28	-26,54	0,74	0
11	-27,02	-26,88	0,14	0
12	-26,83	-27,10	-0,27	1,6
13	-26,97	-26,50	0,47	0
14	-22,95	-25,03	-2,08	13,6
15	-27,23	-26,42	0,81	0
16	-25,73	-25,38	0,35	0
17	-26,49	-26,00	0,49	0
18	-23,00	-25,04	-2,04	13,3
19	-26,49	-25,45	1,04	0
20	-26,86	-26,12	0,74	0
21	-26,38	-26,02	0,36	0
22	-25,12	-25,44	-0,36	2,0
23	-26,95	-27,15	-0,20	1,2
24	-26,65	-25,30	1,35	0
25	-26,62	-25,50	1,12	0
26	-26,17	-25,24	0,93	0
27	-26,51	-25,24	1,27	0
28	-26,74	-25,51	1,23	0
29	-26,64	-25,72	0,92	0
30	-26,46	-25,14	1,32	0
31	-26,59	-25,22	1,37	0
32	-26,09	-24,83	1,26	0
33	-26,67	-25,64	1,03	0
34	-27,11	-26,65	0,46	0
35	-26,53	-25,40	1,13	0
36	-26,11	-25,09	1,02	0
37	-26,22	-25,22	1,00	0
38	-26,22	-25,20	1,02	0
39	-26,63	-25,44	1,19	0
40	-26,27	-25,51	0,76	0
Média	26,47±0,98	25,97±0,78		

Valores em vermelho ($\geq -1^{0/00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0/00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito).

Das amostras do Estado do Paraná, foram encontradas 1 amostra pura (amostra 4), 1 com 7,8% de adulteração (amostra 7) e 6 amostras apresentaram pequena quantidade de “contaminação” por plantas do Ciclo Fotossintético C_4 (açúcar de cana ou glicose de milho) (Tabela 4), as quais também são consideradas puras pelo método oficial. O valor mínimo apresentado foi de $-25,83^{0}_{00}$ (amostra 6) e o máximo de $-27,14^{0}_{00}$ (amostra 1).

Nas amostras do Estado de Santa Catarina foram encontradas duas amostras adulteradas (amostras 23 e 28) e 13 com contaminação de adulterante em pequenas quantidades (Tabela 5), também consideradas puras pelo método oficial.

No Estado do Rio Grande do Sul foram verificadas duas amostras adulteradas (amostras 14 e 18) com 13,6% e 13,3% respectivamente, e 6 amostras com pequena quantidade de adulterante (Tabela 6), também consideradas puras pelo método oficial.

Tabela 7. Valores médios em $\delta^{0}_{00}^{13}C$ das amostras dos méis por Estados da Região Sul

Estado	$\delta^{0}_{00}^{13}C$		
	Mel	Proteína	
Paraná	$-26,21 \pm 0,91$	$-26,64 \pm 0,62$	A
Santa Catarina	$-26,19 \pm 0,58$	$-26,22 \pm 0,59$	A
Rio Grande do Sul	$-26,47 \pm 0,98$	$-25,97 \pm 0,78$	A
Média	$-26,29 \pm 0,13$	$-26,27 \pm 0,28$	

Letras maiúsculas iguais na coluna, indicam que não houve diferenças significativas na proteína pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Comparando-se as médias dos três Estados da Região Sul (Tabela 7), observou-se que não diferem significativamente. O valor máximo do mel ($\delta^{0}_{00}^{13}C$) verificado em toda a Região Sul foi de $-24,77^{0}_{00}$ e o mínimo de $-27,92^{0}_{00}$ (Tabelas 4, 5 e 6).

5.2.2. Região Sudeste: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais

Os resultados da variabilidade isotópica dos méis nos Estados da Região Sudeste encontram-se nas Tabelas 8, 9, 10 e valores médios na Tabela 11.

Tabela 8. Valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ das amostras do Estado de Rio de Janeiro.

Amostras	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$			% adulteração
	Mel	Proteína	Diferença	
1	-28,32	-25,96	2,36	0
2	-28,26	-26,02	2,24	0
3	-28,28	-26,09	2,19	0
4	-28,29	-26,10	2,19	0
5	-25,07	-24,66	0,41	0
6	-25,02	-24,63	0,39	0
7	-26,81	-27,39	-0,58	3,3
8	-26,41	-26,80	-0,39	2,3
9	-26,71	-27,02	-0,31	1,8
10	-26,05	-25,40	0,65	0
11	-27,16	-26,13	1,03	0
12	-26,57	-26,60	-0,03	0,2
13	-26,36	-26,50	-0,14	0,8
14	-25,49	-25,46	0,03	0
15	-27,62	-27,31	0,31	0
16	-26,86	-26,95	-0,09	0,5
17	-26,89	-25,90	0,99	0
18	-25,26	-26,10	-0,84	5,1
19	-26,41	-25,84	0,57	0
20	-26,77	-25,91	0,86	0
21	-27,76	-28,00	-0,24	1,3
22	-26,23	-26,28	-0,05	0,3
23	-27,39	-26,95	0,44	0
24	-28,55	-26,06	2,49	0
25	-26,67	-27,43	-0,76	4,3
26	-26,88	-26,01	0,87	0
27	-26,08	-26,67	-0,59	3,5
28	-26,22	-26,56	-0,34	2,0
29	-26,86	-26,81	0,05	0
30	-26,78	-27,16	-0,38	2,2
31	-26,63	-25,67	0,96	0
32	-26,58	-25,67	0,91	0
33	-26,20	-26,30	-0,10	0,6
34	-26,48	-26,27	0,21	0
35	-26,24	-26,33	-0,09	0,6
36	-26,25	-24,98	1,27	0
37	-26,62	-25,98	0,64	0
38	-27,30	-26,84	0,46	0
39	-12,37	-26,92	-14,55	84,5
40	-26,70	-26,80	-0,10	1,0
41	-28,59	-26,80	1,79	0
42	-26,84	-25,85	0,99	0
43	-28,24	-26,42	1,82	0
44	-26,87	-26,22	0,65	0
Média	-26,50±2,32	-26,31±0,70		

Valores em vermelho ($\geq -1^{0/00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0/00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito)

No Estado de Rio de Janeiro foram observadas 1 amostra (amostra 39) com alta porcentagem de adulteração (84,5%) e 16 amostras com pequena quantidade de adulterante. O maior valor observado para o mel foi de $-25,02^{0}_{00}$ (amostra 6) e o menor de $-28,59^{0}_{00}$ (amostra 41) (Tabela 8).

Tabela 9. Valores de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ das amostras do Estado de São Paulo.

Amostras	$\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$			% adulteração
	Mel	Proteína	Diferença	
1	-26,25	-25,24	1,01	0
2	-23,82	-24,26	-0,44	3,0
3	-18,69	-24,48	-5,79	39,2
4	-25,13	-24,97	0,16	0
5	-24,90	-25,38	-0,48	3,1
6	-27,14	-26,72	0,42	0
7	-26,95	-24,86	2,09	0
8	-27,16	-26,38	0,78	0
9	-24,34	-24,66	-0,32	2,1
10	-24,37	-24,86	-0,49	3,2
11	-24,23	-24,74	-0,51	3,4
12	-24,41	-25,16	-0,75	4,9
13	-24,17	-25,19	-1,02	6,6
14	-24,40	-24,74	-0,34	2,3
15	-24,37	-25,56	-1,19	7,5
16	-24,36	-25,49	-1,13	7,2
17	-24,22	-24,88	-0,66	4,4
18	-24,15	-24,95	-0,80	5,3
19	-24,24	-25,65	-1,41	8,8
20	-24,05	-25,37	-1,32	8,4
21	-24,11	-25,36	-1,25	8,0
22	-24,23	-25,27	-1,04	6,7
23	-24,64	-25,25	-0,61	3,9
24	-24,23	-24,83	-0,60	4,0
25	-24,21	-24,54	-0,33	2,2
26	-26,30	-26,65	-0,35	2,1
27	-25,46	-25,49	-0,03	0,2
28	-24,37	-25,00	-0,63	4,1
29	-25,13	-24,90	0,23	0
30	-26,01	-25,73	0,28	0
31	-26,31	-26,71	-0,40	2,4
Média	24,72±1,48	25,26±0,62		

Valores em vermelho ($\geq -1^{0}_{00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0}_{00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito).

A Tabela 9 ilustra os resultados das análises de méis do Estado de São Paulo onde foram encontradas uma amostra com 39,2% (amostra 3), sete amostras abaixo de 8,8% de adulteração e 16 amostras com pequenas adulterações. Contudo, o valor máximo para o mel foi de $-23,82^{0}_{00}$ (amostra 2) e o mínimo de $-27,16^{0}_{00}$ (amostra 8).

Tabela 10. Valores de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ das amostras do Estado de Minas Gerais.

Amostras	$\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$			% adulteração
	Mel	Proteína	Diferença	
1	-28,07	-27,16	0,91	0
2	-23,96	-23,81	0,15	0
3	-24,07	-24,64	-0,57	3,8
4	-21,92	-24,24	-2,32	16,0
5	-25,45	-24,86	0,60	4,0
Média	-24,69±2,03	-24,95±1,16		

Valores em vermelho ($\geq -1^{0}_{00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0}_{00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito)

Das amostras analisadas do Estado de Minas Gerais, uma apresentou 16% de adulteração (amostra 4) e uma com pequena quantidade de contaminação (amostra 3) (Tabela 10). Foram verificados o valor máximo do mel de $-23,96^{0}_{00}$ (amostra 2) e o valor mínimo de $-28,07^{0}_{00}$ (amostra 1).

Tabela 11. Valores médios em $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ das amostras de méis por Estados da Região Sudeste.

Estado	$\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$		
	Mel	Proteína	
Rio Janeiro	-26,50±2,32	-26,31±0,70	B
São Paulo	-24,72±1,48	-25,26±0,62	AB
Minas Gerais	-24,69±2,03	-24,95±1,16	A
Média	-25,30±0,84	-25,51±0,58	

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas na proteína pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Comparando-se as médias dos três Estados da Região Sudeste (Tabela 11), observou-se que o Estado do Rio de Janeiro diferiu significativamente de Minas Gerais, mas não do Estado de São Paulo. A média do Estado de São Paulo não apresentou diferença significativa em relação aos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro.

O valor máximo $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ dos méis puros encontrados em toda a Região Sudeste foi de $-23,82^{0/00}$ e o mínimo de $-28,59^{0/00}$ (Tabelas 8, 9 e 10).

5.2.3. Região Centro-Oeste: Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás

Os resultados da variabilidade isotópica dos méis dos Estados da Região Centro-Oeste (excetuando-se o Distrito Federal) encontram-se na Tabelas 12 e os valores médios na Tabela 13.

Tabela 12. Valores de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ das amostras dos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.

Estado	Amostras	$\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$			% adulteração
		Mel	Proteína	Diferença	
Mato Grosso do Sul	1	-25,86	-26,46	-0,60	3,6
	2	-25,96	-26,00	-0,04	0,3
	3	-26,06	-25,33	0,73	0
	4	-25,05	-25,38	-0,33	2,1
	5	-26,34	-26,71	-0,37	2,2
Média		-25,85±0,43	-25,97±0,56		
Mato Grosso	1	-25,84	-25,91	-0,07	0,4
	2	-25,96	-26,59	-0,63	3,7
	3	-26,81	-26,15	0,66	0
Média		-26,20±0,43	-26,21±0,28		
Goiás	1	-25,95	-25,52	0,43	0

Diferenças negativas ($\leq -1^{0/00}$) indicam pequenas quantidades de adulteração (em negrito).

Os resultados de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ dos Estados Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, não indicaram valores com grandes adulterações, apenas pequenos indícios de contaminações, possivelmente originados na alimentação das abelhas com açúcares de plantas de ciclo fotossintético C_4 como a cana de açúcar (Tabela 12).

Tabela 13. Valores médios em $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ das amostras de méis dos Estados da Região Centro-Oeste.

Estado	$\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$		
	Mel	Proteína	
Mato Grosso do Sul	-25,85±0,43	-25,97±0,56	A
Mato Grosso	-26,20±0,43	-26,21±0,28	A
Goiás	-25,95	-25,52	
Média	-26,00±0,15	-25,90±0,29	

Letras maiúsculas iguais na coluna, indicam que não houve diferenças significativas na proteína pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Pela análise da Tabela 13, não se constatou diferença significativa entre o Estado de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, quanto à variabilidade isotópica de carbono -13.

O valor máximo de Carbono-13 encontrado nos méis puros foi de -25,05 ‰ no Estado do Mato Grosso do Sul (amostra 4) e o mínimo de -26,81 ‰ no Estado do Mato Grosso (amostra 3) (Tabela 12).

5.2.4. Região Nordeste: Alagoas, Bahia, Piauí e Pernambuco

Os resultados da variabilidade isotópica dos méis dos Estados de Alagoas, Bahia, Piauí e Pernambuco, Região Nordeste, encontram-se nas Tabelas 14 e 15 e os valores médios na Tabela 16.

Tabela 14. Valores de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ das amostras do Estado da Bahia.

Amostra	$\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$			% adulteração
	Mel	Proteína	Diferença	
1	-24,51	-24,01	0,50	0
2	-26,17	-24,60	1,57	0
3	-26,13	-26,68	-0,55	3,2
4	-27,12	-26,63	0,49	0
5	-27,28	-26,24	1,04	0
6	-27,66	-26,91	0,75	0
7	-25,42	-25,15	0,27	0
8	-24,84	-25,02	-0,18	1,2
9	-26,05	-25,79	0,26	0
10	-25,21	-25,03	0,18	0
11	-26,63	-25,99	0,64	0
12	-24,75	-24,69	0,06	0
Média	-25,98±1,01	-25,56±0,90		

Diferenças negativas ($\leq -1\text{‰}$) indicam pequenas quantidades de adulteração (em negrito).

Duas amostras do Estado da Bahia (Tabela 14), apresentaram valores de pequenas contaminações (amostra 3 e 8), provavelmente, de plantas do Ciclo Fotossintético C₄.

O valor máximo do mel verificado no Estado da Bahia foi de -24,51‰ (amostra 1) e o valor mínimo -27,66‰ (amostra 6).

Tabela 15. Valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ das amostras dos Estados de Alagoas, Pernambuco e Piauí.

Estado	Amostras	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$			% adulteração
		Mel	Proteína	Diferença	
Alagoas	1	-21,25	-23,93	-2,68	18,8
	2	-23,79	-24,54	-0,75	5,1
	3	-26,65	-25,95	0,70	0
Média		-23,90±2,21	-24,80±0,85		
Pernambuco	1	-26,14	-26,58	-0,44	2,6
	2	-26,13	-25,19	0,94	0
	3	-25,78	-25,04	0,74	0
	4	-25,52	-25,18	0,34	0
	5	-24,77	-24,73	0,04	0
	6	-25,38	-24,58	0,80	0
	7	-24,78	-24,84	-0,06	0,4
Média		-25,50±0,53	-25,16±0,62		
Piauí	1	-25,02	-25,80	-0,78	4,9

Valores em vermelho ($\geq -1^{0/00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0/00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito).

A amostra 1 do Estado de Alagoas (Tabela 15) apresentou alto índice de adulteração (18,8%), possivelmente por estar próxima à cultura de cana de açúcar, predominante nessa região. As amostras 1 e 7 do Estado de Pernambuco (Tabela 15), apresentaram pequena quantidade de adulterante, porém não consideradas puras pelo método oficial.

A amostra do Estado do Piauí apresenta uma pequena contaminação, entretanto é considerada pura pelo método oficial. Vinte e seis outras amostras, obtidas de empresas do Estado de São Paulo foram descartadas por apresentarem adulterações que variaram de 8 a 20%. Tal resultado parece ser proveniente de amostra viciadas face a qualidade internacional conhecida do mel produzido nesse Estado. São necessárias avaliações de novas amostras de méis provenientes daquele Estado para que a dúvida levantada seja elucidada.

Tabela 16. Valores médios em $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ das amostras de méis por Estados da Região Nordeste.

Estado	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$		
	Mel	Proteína	
Alagoas	-23,90±2,21	-24,80±0,85	A
Pernambuco	-25,50±0,53	-25,16±0,62	A
Bahia	-25,98±1,01	-25,56±0,90	A
Piauí	-25,02	-25,80	
Média	-25,1±0,77	-25,33±0,38	

Letras maiúsculas iguais na coluna, indicam médias iguais não significativas na proteína pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Pela análise da Tabela 16, verifica-se que não houve diferença significativa entre os méis dos Estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia, quanto a variabilidade isotópica do carbono -13. O valor mínimo do mel, encontrado de toda a Região Nordeste foi de -27,66 $^{0/00}$ na Bahia e o valor máximo -23,79 $^{0/00}$ em Alagoas (Tabelas 14 e 15).

5.2.5. Região Norte: Rondônia e Pará

Os resultados da variabilidade isotópica dos méis dos Estados de Rondônia e Pará, Região Norte, encontram-se nas Tabelas 17 e os valores médios na Tabela 18.

Tabela 17. Valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ das amostras dos Estados de Rondônia e Pará.

Estado	Amostras	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$			% adulteração
		Mel	Proteína	Diferença	
Rondônia	1	-24,91	-24,96	-0,05	0,3
	2	-26,58	-26,27	0,31	0
	3	-25,24	-25,07	0,17	0
	4	-24,50	-24,32	0,18	0
	5	-26,69	-26,41	0,28	0
	6	-23,32	-24,76	-1,44	9,7
	7	-24,83	-25,16	-0,33	2,1
	8	-25,31	24,26	1,05	0
Média		-25,17±1,02	-25,15±0,75		
Pará	1	-26,78	-25,92	0,86	0

Valores em vermelho ($\geq -1^{0/00}$) indicam amostras adulteradas.

Diferenças negativas ($\leq -1^{0/00}$) indicam presença de pequenas quantidades de adulterante (em negrito).

No Estado de Rondônia observaram-se somente duas amostras (1 e 7) com baixas quantidades de contaminação proveniente de plantas do ciclo fotossintético C_4 e uma adulterada com 9,7% (amostra 6) (Tabela 17).

Tabela 18. Valores médios em $\delta^{0/00}_{13}C$ das amostras de méis por Estados da região Norte.

Estado	$\delta^{0/00}_{13}C$	
	Mel	Proteína
Rondônia	-25,17±1,02	-25,15±0,75
Pará	-26,78	-25,92
Média	-25,97±0,09	-25,53±0,38

Nas amostras de méis da Região Norte, observou-se o valor mínimo do mel de -26,78 $^{0/00}$ e o valor máximo -24,50 $^{0/00}$ (Tabela 17). Não foi efetuada análise estatística dos dados, pois o Estado do Pará esteve representado apenas por uma amostra (Tabela 18).

5.2.6. Regiões brasileiras

Os valores médios dos méis das Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Valores médios em $\delta^{0/00}_{13}C$ das amostras dos méis por Região.

Estado	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$		
	Mel	Proteína	
Sul	-26,29±0,13	-26,27±0,28	A
Sudeste	-25,30±0,84	-25,51±0,58	BC
Centro-Oeste	-26,00±0,15	-25,90±0,29	AB
Nordeste	-25,10±0,77	-25,33±0,38	C
Norte	-25,97±0,80	-25,53±0,38	BC
Média	-25,73±0,33	-25,71±0,11	

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas na proteína pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Verificaram-se diferenças significativas entre os valores isotópicos de carbono -13 nas Regiões. Assim procedendo, nota-se que: a) a Região Sul difere das Regiões Sudeste, Nordeste e Norte, mas é semelhante à Região Centro-Oeste; b) a Região Sudeste difere das Regiões Sul e Nordeste, mas é semelhante à Região Centro-Oeste e Norte e c) a Região

Nordeste difere das Regiões Sul e Centro-Oeste, mas é semelhante à Região Sudeste e Norte (Tabela 19).

Pelas diferenças isotópicas no Carbono -13 entre a proteína e o mel pode-se dizer que os méis analisados são adulterados ou não, mas não é possível indicar com segurança a provável região em que o mel foi elaborado. Isto, possivelmente é reflexo da variabilidade das espécies botânicas existentes, tornando-se difícil a discriminação por Regiões com o uso do $\delta^{0}_{00} \text{ }^{13}\text{C}$.

As amostras de méis analisadas nos estados brasileiros indicam percentual variável de adulteração. Aquelas com pequena porcentagem de adulteração podem ser reflexo de: localização inadequada do apiário (próximo à cultura de cana de açúcar), manejo incorreto com alimentação artificial nos períodos que antecedem o fluxo maior de néctar na região e por adulteração deliberada. Entretanto, esta subjetividade é detectada pela análise isotópica do carbono -13.

A variação do carbono dos méis brasileiros esteve entre -23,79 a -28,59 $^{0}_{00}$ e da proteína variou de -23,81 a -28,09 $^{0}_{00}$.

Os resultados gerais em porcentagens de méis puros nos Estados e por Regiões estão explícitos na Tabela 20. A média ponderada geral de 92% de méis puros indicam um ótimo desempenho dos apiários nacionais.

Contudo, adulterações provavelmente deliberadas foram observadas em uma amostra no Estado de Rio Grande do Sul com 13,6% de adulteração, no Estado do Rio de Janeiro com 84,5%, no Estado de São Paulo com 39%, no Estado de Minas Gerais com 16,2% e no Estado de Alagoas com 18,8%. Essas 5 amostras representam o percentual de 2,4% de méis adulterados no universo de 211 amostras de méis analisadas (Tabela 20).

Tabela 20. Percentual de méis puros nos Estados e por Regiões através do critério ($\leq -1^0_{00}$) ou 7% C₄

Região	Estados	Percentual	
Sul	Rio Grande do Sul (n = 40)	95	
	Santa Catarina (n = 42)	95,2	94,1
	Paraná (n = 8)	87,5	
Sudeste	São Paulo (n = 31)	74,2	
	Minas Gerais (n = 5)	80,0	87,5
	Rio de Janeiro (n = 44)	97,7	
Centro-Oeste	Mato Grosso do sul (n = 5)	100	
	Mato Grosso (n = 3)	100	100
	Goiás (n = 1)	100	
Nordeste	Bahia (n = 12)	100	
	Alagoas (n = 3)	66,7	95,7
	Pernambuco (n = 7)	100	
	Piauí (n = 1)	100	
Norte	Rondônia (n = 8)	87,5	
	Pará (n = 1)	100	88,9
Media Ponderada Geral (n = 211)			91,9

5.3. Variabilidade isotópica do Nitrogênio ($\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$) nas proteínas de amostras de méis brasileiros

5.3.1. Região Sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul

Os resultados da variabilidade isotópica do $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de $\delta^{0/00}_{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00}_{15}\text{N}$ das proteínas dos méis dos Estados: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul

Estado	Amostras	$\delta^{0/00}_{13}\text{C}$	$\delta^{0/00}_{15}\text{N}$
Paraná	1	-26,34	3,03
	2	-26,80	4,91
	3	-26,59	3,92
	4	-26,96	3,18
	5	-26,66	4,66
Média		-26,67±0,21	3,94±0,76
Santa Catarina	1	-25,67	4,23
	2	-25,36	4,51
	3	-25,70	4,48
	4	-25,47	4,63
	5	-25,70	4,99
	6	-25,47	3,95
	7	-26,30	3,57
	8	-26,26	3,94
	9	-26,23	3,74
	10	-26,26	3,95
	11	-26,34	3,66
	12	-26,48	3,57
	13	-26,19	3,44
	14	-26,23	4,05
	15	-26,11	3,80
	16	-25,66	5,15
	17	-26,01	3,79
	18	-25,93	3,76
	19	-26,37	3,67
	20	-25,72	4,96
	21	-26,42	4,11
	22	-25,94	4,79
	23	-26,18	4,19
Média		-26,00±0,33	4,13±0,49
Rio Grande do Sul	1	-26,59	4,18
	2	-26,20	3,43
	3	-26,12	3,82
	4	-26,88	4,19
	5	-25,38	4,68
	6	-25,30	5,29
	7	-25,50	5,31
	8	-25,24	5,40
	9	-25,24	5,13
	10	-25,51	4,96
	11	-25,72	4,66
	12	-25,14	5,24
	13	-25,22	4,61
Média		-25,69±0,55	4,68±0,60

Os resultados da variabilidade isotópica do Nitrogênio -15 da Região Sul foram de 3,03‰ (amostra 1, do Estado do Paraná) a 5,24‰ (amostra 12, do Estado de Rio Grande do Sul) (Tabela 21).

5.3.2. Região Sudeste: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais

Os resultados da variabilidade isotópica do $\delta^{0/00}_{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00}_{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis dos Estados de Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22. Valores de $\delta \text{‰}^{13}\text{C}$ e $\delta \text{‰}^{15}\text{N}$ das proteínas nos méis dos Estados: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais

Estado	Amostras	$\delta \text{‰}^{13}\text{C}$	$\delta \text{‰}^{15}\text{N}$
Rio de Janeiro	1	-26,02	2,15
	2	-26,09	2,03
	3	-26,10	2,03
	4	-27,39	4,86
	5	-26,50	3,68
	6	-25,46	4,40
	7	-26,95	2,71
	8	-26,10	3,22
	9	-25,84	3,96
	10	-25,91	4,27
	11	-28,00	2,93
	12	-26,95	2,55
	13	-26,01	4,88
	14	-26,67	3,52
	15	-26,56	3,86
	16	-26,81	4,85
	17	-25,67	4,28
	18	-26,30	3,88
	19	-26,27	2,58
	20	-26,33	3,79
	21	-25,98	4,37
	22	-25,85	4,52
	23	-26,42	5,08
	24	-26,22	2,82
Média		-26,35±0,56	3,08±0,86
São Paulo	1	-25,24	3,43
	2	-24,26	4,02
	3	-24,48	3,76
	4	-24,97	2,77
	5	-25,38	4,32
	6	-24,86	3,79
	7	-26,38	3,94
	8	-24,66	3,74
	9	-24,86	3,75
	10	-24,74	4,32
	11	-25,16	4,67
	12	-25,19	3,81
	13	-24,74	3,78
	14	-25,49	3,38
	15	-25,65	5,54
	16	-25,37	5,40
	17	-25,36	5,03
	18	-25,25	5,23
	19	-24,83	5,96
	20	-24,54	5,74
	21	-25,49	4,28
	22	-26,71	2,92
Média		-25,16±0,57	4,48±0,85
Minas Gerais	1	-23,81	4,43
	2	-24,64	3,40
	3	-24,28	4,46
	4	-24,86	5,37
Média		-24,39±0,40	4,67±0,41

Os resultados da variabilidade isotópica do Nitrogênio -15 da Região Sudeste, foram de $2,03^{0}_{00}$ (amostra 2 do Estado do Rio de Janeiro) a $5,96^{0}_{00}$ (amostra 19 do Estado de São Paulo) (Tabela 22).

5.3.3. Região Centro-Oeste: Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás

Os resultados da variabilidade isotópica do $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis dos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23. Valores de $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis dos Estados: Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, Região Centro-Oeste

Estado	Amostras	$\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$	$\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$
Mato Grosso do Sul	1	-26,46	3,61
	2	-26,00	4,39
	3	-25,33	3,16
	4	-25,38	3,59
	5	-26,71	2,46
Média		-25,97 $\pm$ 0,56	3,44 $\pm$ 0,63
Mato Grosso	1	-25,91	4,08
	2	-26,59	2,91
	3	-26,15	3,79
Média		-26,21 $\pm$ 0,28	3,59 $\pm$ 0,50
Goiás	1	-25,52	2,48

Os resultados da variabilidade isotópica do Nitrogênio -15 da Região Centro-Oeste, foram de $2,46^{0}_{00}$ (amostra 5 do Estado Mato Grosso do Sul) a $4,39^{0}_{00}$ (amostra 2 do Estado Mato Grosso do Sul) (Tabela 23).

5.3.4. Região Nordeste: Piauí, Alagoas, Pernambuco e Bahia

Os resultados da variabilidade isotópica do $\delta^{0}_{00}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0}_{00}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis dos Estados do Piauí, Alagoas, Pernambuco e Bahia encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24. Valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00}^{15}\text{N}$ das proteínas em méis dos Estados: Piauí, Alagoas, Pernambuco e Bahia

Estado	Amostras	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$	$\delta^{0/00}^{15}\text{N}$
Piauí	1	-25,91	5,14
Alagoas	1	-24,54	5,59
	2	-25,95	6,30
Média		-25,24±0,70	5,95±0,35
Pernambuco	1	-25,19	14,07
	2	-25,04	15,08
	3	-25,18	15,40
	4	-24,73	13,78
	5	-24,84	13,94
Média		-25,00±0,18	14,45±0,66
Bahia	1	-24,60	9,96
	2	-26,68	10,18
	3	-26,63	10,74
	4	-26,91	9,99
	5	-25,15	9,60
	6	-24,69	9,43
	7	-25,79	9,48
Média		-25,78±0,91	9,91±0,43

As amostras apresentaram grande variabilidade nos diferentes estados. Os Estados do Piauí e Alagoas tiveram variabilidades semelhantes, onde o Nitrogênio -15 foi de 5,14^{0/00} (Piauí) e 6,30^{0/00} (Alagoas). Nas amostras analisadas do Estado da Bahia foram encontradas variabilidades de 9,43^{0/00} (amostra 6) a 10,74^{0/00} (amostra 3), todavia, as amostras de méis do Estado do Pernambuco apresentaram valores de 13,78^{0/00} (amostra 4) a 15,40^{0/00} (amostra 3), os maiores valores de Nitrogênio -15 da Região Nordeste.

5.3.5. Região Norte: Rondônia

Os resultados da variabilidade isotópica do $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis do Estado de Rondônia encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25. Valores de $\delta^{0/00}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00}^{15}\text{N}$ das proteínas dos méis no Estado de Rondônia

Estado	Amostras	$\delta^{0/00}^{13}\text{C}$	$\delta^{0/00}^{15}\text{N}$
Rondônia	1	-25,07	4,00
	2	-24,32	2,89
	3	-26,41	3,19
	4	-25,16	3,88
	5	-24,26	4,32
Média		-25,04±0,78	3,66±0,53

Os resultados da variabilidade isotópica do Nitrogênio -15 da Região Norte estão representados somente por amostras de méis do Estado de Rondônia (Tabela 24). A variabilidade foi de $2,89^{0}_{00}$ (amostra 2) a $4,00^{0}_{00}$ (amostra 1).

5.3.6. Regiões brasileiras

Os valores médios das Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26. Valores médios $\delta^{0}_{00} {}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0}_{00} {}^{15}\text{N}$ das proteínas dos méis por Regiões.

Estado	$\delta^{0}_{00} {}^{13}\text{C}$	$\delta^{0}_{00} {}^{15}\text{N}$
Sul	$-26,12 \pm 0,41$	$4,25 \pm 0,32$ B
Sudeste	$-25,30 \pm 0,80$	$4,07 \pm 0,71$ B
Centro-Oeste	$-25,90 \pm 0,29$	$3,17 \pm 0,49$ C
Nordeste	$-25,45 \pm 0,35$	$9,14 \pm 3,44$ A
Norte	$-25,04 \pm 0,37$	$3,66 \pm 0,53$ C
Media	$-25,56 \pm 0,39$	$4,86 \pm 2,17$

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em relação às médias da variabilidade isotópica do $\delta^{0}_{00} {}^{15}\text{N}$ na proteína dos méis puros brasileiros nas diferentes Regiões, verificou-se que a Região Nordeste diferiu das demais Regiões, as Regiões Sul e Sudeste foram semelhantes entre si e a Região Norte foi semelhante à Região Centro-Oeste (Tabela 26) .

Quanto às médias da variabilidade isotópica de $\delta^{0}_{00} {}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis puros por Estados (Figura 3), verificou-se a diferenciação dos Estados da Bahia e Pernambuco em relação aos demais Estados do País. Semelhantes resultados foram observados na Região Nordeste (Figura 4), diferenciando-a das demais Regiões. Em particular destacou-se novamente os Estados da Bahia e de Pernambuco para a Região Nordeste (Figura 5).

Os mais altos níveis de enriquecimento isotópico do Nitrogênio -15 nos Estados Nordestinos (Bahia e Pernambuco) podem ser devido às condições ambientais (quente e seco) típicas dessa Região. Esta suposição não se aplica ao Estado de Rondônia (único

estado analisado da Região Norte) por estar próximo à Região Centro-Oeste e divisa com a Região Amazônica.

Em contraste com a variabilidade isotópica do Carbono -13, pouco tem sido publicado sobre a variabilidade isotópica do nitrogênio -15, entre o organismo e a sua dieta. Na maioria das observações, o animal como um todo é mais rico em Nitrogênio -15 em relação a sua dieta.

Quando o enriquecimento isotópico ocorre é reflexo da excreção preferencial de Nitrogênio -14 na forma de uréia e amônia. A diferenciação na retenção do Nitrogênio -15 varia de acordo com espécie, dieta e condições nutricionais. A diferenciação do enriquecimento nos tecidos, pode ser devido ao fracionamento isotópico durante a transaminação dos aminoácidos. Invariavelmente os isótopos de Nitrogênio -15 mostram um enriquecimento de 3 a 4‰ por nível trófico.

Observa-se que os valores isotópicos de $\delta^{0/15}\text{N}$ nas proteínas dos méis puros são da ordem de 4 a 5‰ na maioria dos Estados brasileiros. No entanto, foram observados valores isotópicos muito altos da ordem de 10‰ e 14,5‰ nas proteínas dos méis puros dos Estados da Bahia e Pernambuco, respectivamente.

Neste comportamento diferenciado, três hipóteses podem ser exploradas: a) fracionamento isotópico entre o néctar e o pólen metabolizados em proteína pelas abelhas; b) dieta rica em Nitrogênio -15 via solo e planta e c) ou ambas premissas sob as condições quente e seca.

Shearer *et al* (1983) observaram em ecossistemas do deserto de Sonoram (na África), plantas com valores de 4,4 a 7,1‰ em um local e variação de 7,2 a 12,1‰ em outro local. Possivelmente esses valores sejam reflexo da variabilidade de compostos nitrogenados no solo de diferenças no metabolismo das plantas e ou profundidade do sistema radicular, combinado com dieta rica em Nitrogênio -15.

Por outro lado, Ambros e Aeniro (1986) argumentam que o aumento no $\delta^{0/15}\text{N}$ seja reflexo dos efeitos isotópicos induzindo na concentração da uréia em animais com baixa disponibilidade de água em regiões áridas e que podem reciclar compostos nitrogenados, enriquecendo o Nitrogênio -15.

No caso das abelhas em condições áridas, cada vez que a proteína é metabolizada e adicionada ao mel, pode haver um enriquecimento de Nitrogênio -15 aumentando o valor de $\delta^{0/00}_{15}\text{N}$ no *pool* do Nitrogênio. Nas condições estratégicas de eliminação dos fluidos corporais ocorrem eliminações de Nitrogênio -14.

Talvez, a terceira hipótese seja reflexo da dieta rica em $\delta^{0/00}_{15}\text{N}$ via solo e planta, associada ao efeito metabólico do processamento do néctar sob condições áridas.

Estudos posteriores devem ser conduzidos para elucidar os altos valores de Nitrogênio -15 nas proteínas dos méis puros dos Estados da Bahia e Pernambuco, analisando a variabilidade isotópica ($\delta^{0/00}_{15}\text{N}$) no solo, planta, pólen, néctar, abelhas, mel e a sua respectiva proteína.

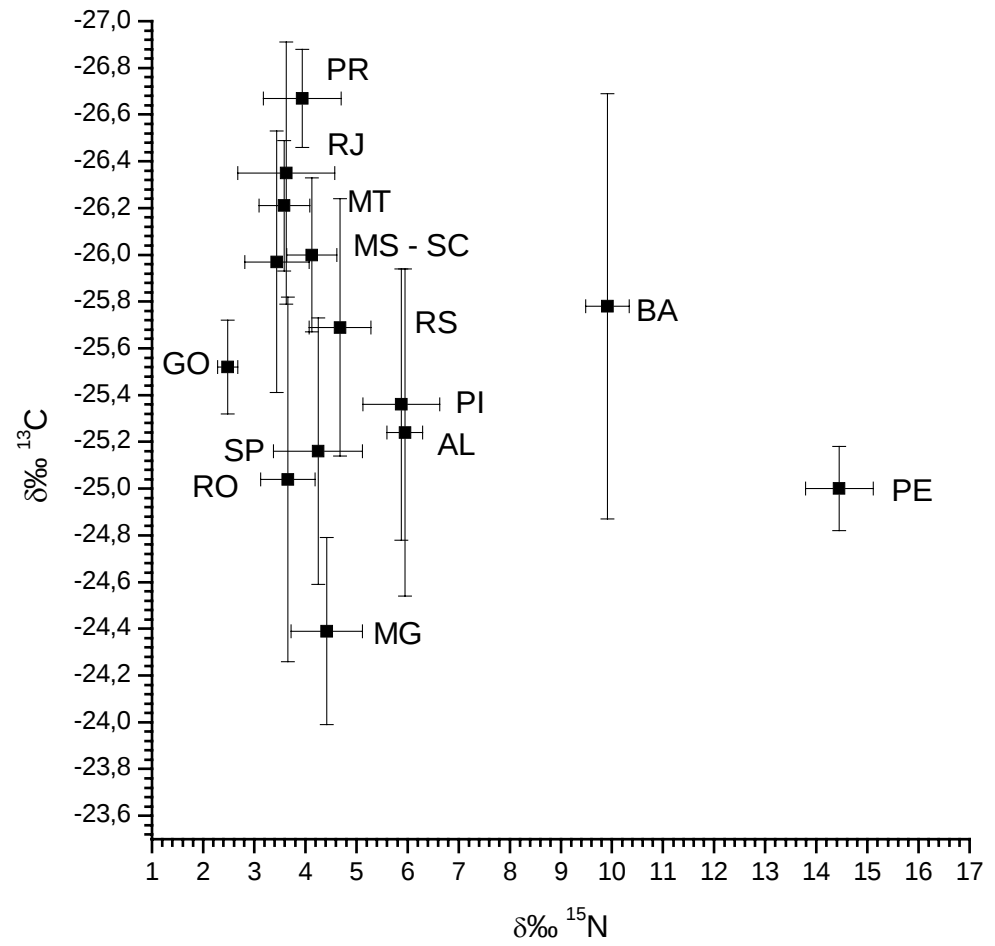


Figura 3. Valores médios (mínimo e máximo) de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nas proteínas no mel oriundo de diferentes estados do Brasil.

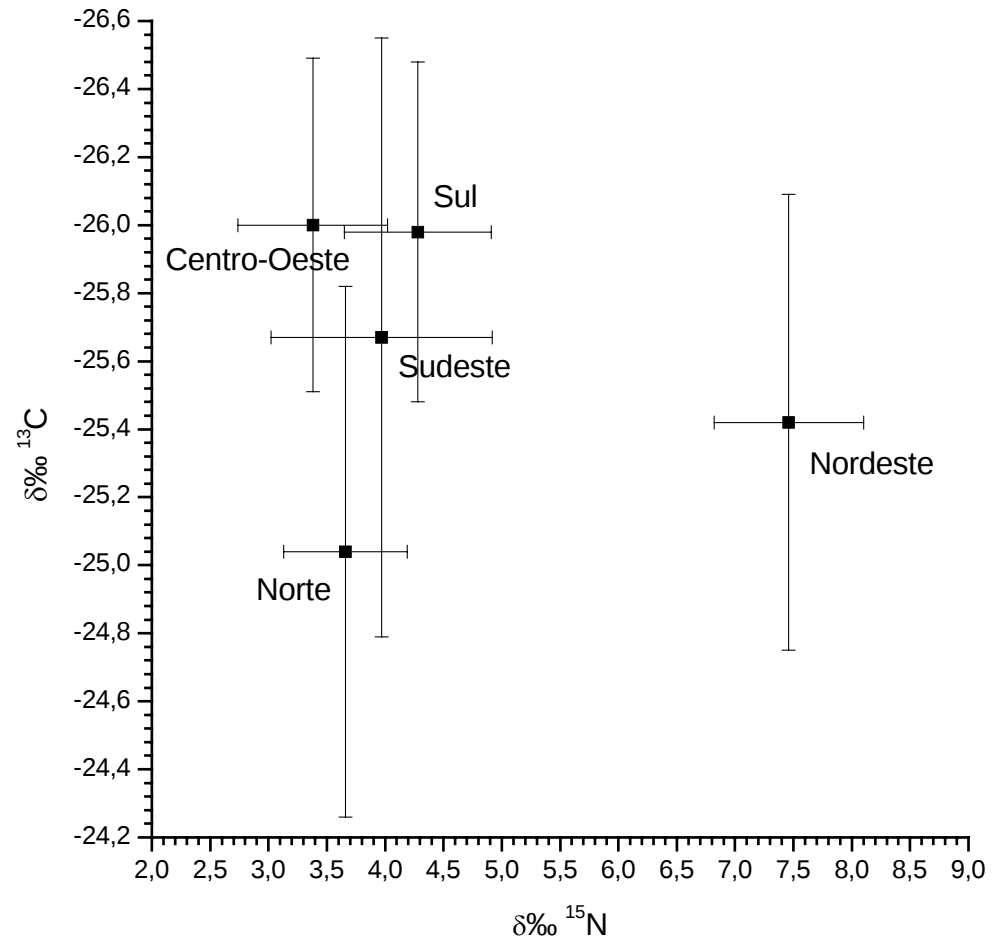


Figura 4. Valores médios (mínimo e máximo) de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis das diferentes regiões brasileiras.

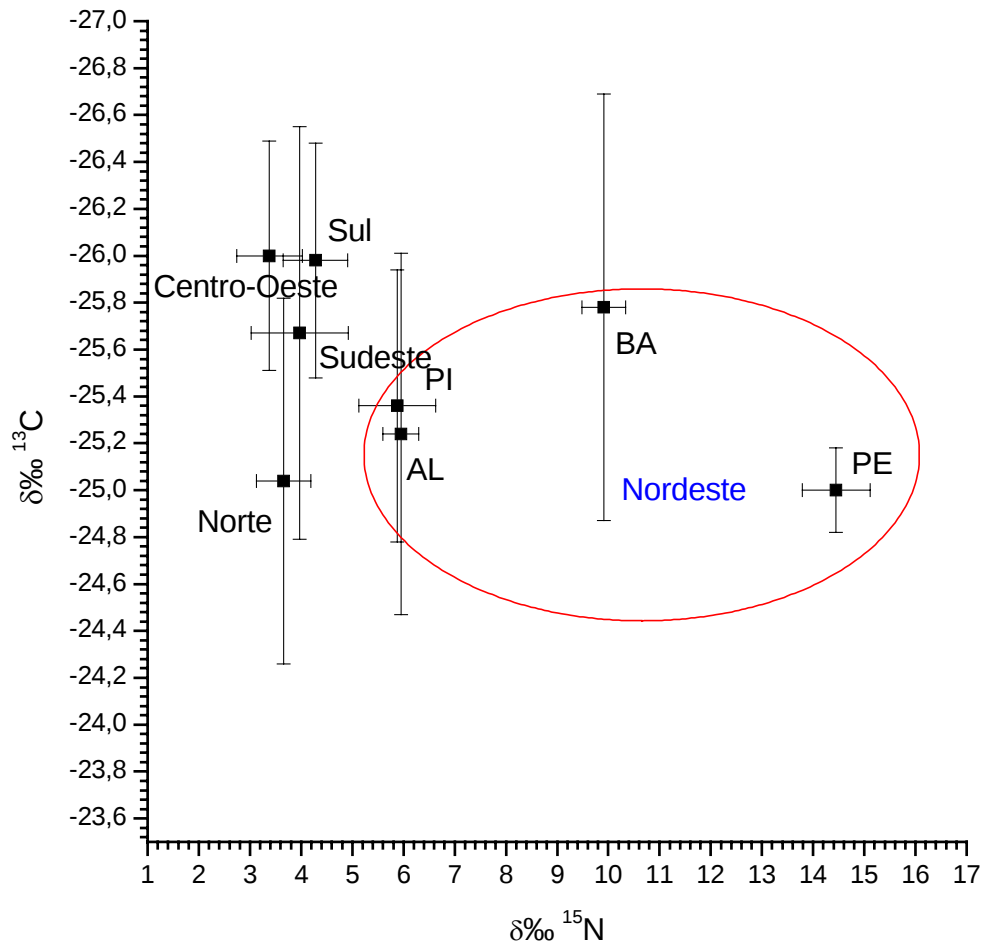


Figura 5. Valores médios (mínimo e máximo) de $\delta^{0/00}\text{C}^{13}$ e $\delta^{0/00}\text{N}^{15}$ nas proteínas dos méis das diferentes regiões e dos Estados da Bahia e Pernambuco.

5.4. Diferenciação botânica das proteínas dos méis de flores de Eucalipto e Laranjeira em diferentes estados brasileiros (origem botânica declarada).

Dados preliminares sobre os resultados de diferenciação botânica das proteínas dos méis de flores de Eucalipto dos Estados de Rio de Janeiro e São Paulo, e das proteínas dos méis de flores de Laranjeira dos Estados de Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, encontram-se na Tabela 27 e Figuras 6, 7 e 8.

Tabela 27. Valores de $\delta^{0/00}_{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00}_{15}\text{N}$ das proteínas de méis de flores de Laranjeira e Eucalipto em diferentes Estados.

Estado	Florada	$\delta^{0/00}_{13}\text{C}$ do mel	$\delta^{0/00}_{13}\text{C}$ da Proteína	$\delta^{0/00}_{15}\text{N}$ Proteína
Rio de Janeiro (RJ)	Eucalipto	-28,32	-25,96	1,99
Rio de Janeiro (RJ)	Eucalipto	-28,26	-26,02	2,15
Rio de Janeiro (RJ)	Eucalipto	-28,28	-26,09	2,03
São Paulo (SP)	Eucalipto	-28,29	-26,10	2,03
São Paulo (SP)	Eucalipto	-27,14	-26,72	1,80
Média			-26,18±0,31	2,00±0,13
Paraná (PR)	Laranjeira	-24,05	-25,27	4,27
Paraná (PR)	Laranjeira	-26,34	-26,80	4,91
Rio de Janeiro (RJ)	Laranjeira	-25,07	-24,66	5,68
Rio de Janeiro (RJ)	Laranjeira	-25,02	-24,63	5,58
São Paulo (SP)	Laranjeira	-24,90	-25,38	4,32
São Paulo (SP)	Laranjeira	-24,23	-24,74	4,32
São Paulo (SP)	Laranjeira	-24,41	-25,16	4,67
Média			-25,23±0,75	4,82±0,60

A possibilidade de detectar o manejo inadequado da coleta do mel de flores de Laranjeira e de Eucalipto dos apicultores dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná é possível pelo uso de duplo eixo isotópico ($\delta^{0/00}_{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00}_{15}\text{N}$) e sistemas de equações nas proteínas (Figuras 7, 8 e 9), em virtude da florada de Eucalipto anteceder a florada de Laranjeira.

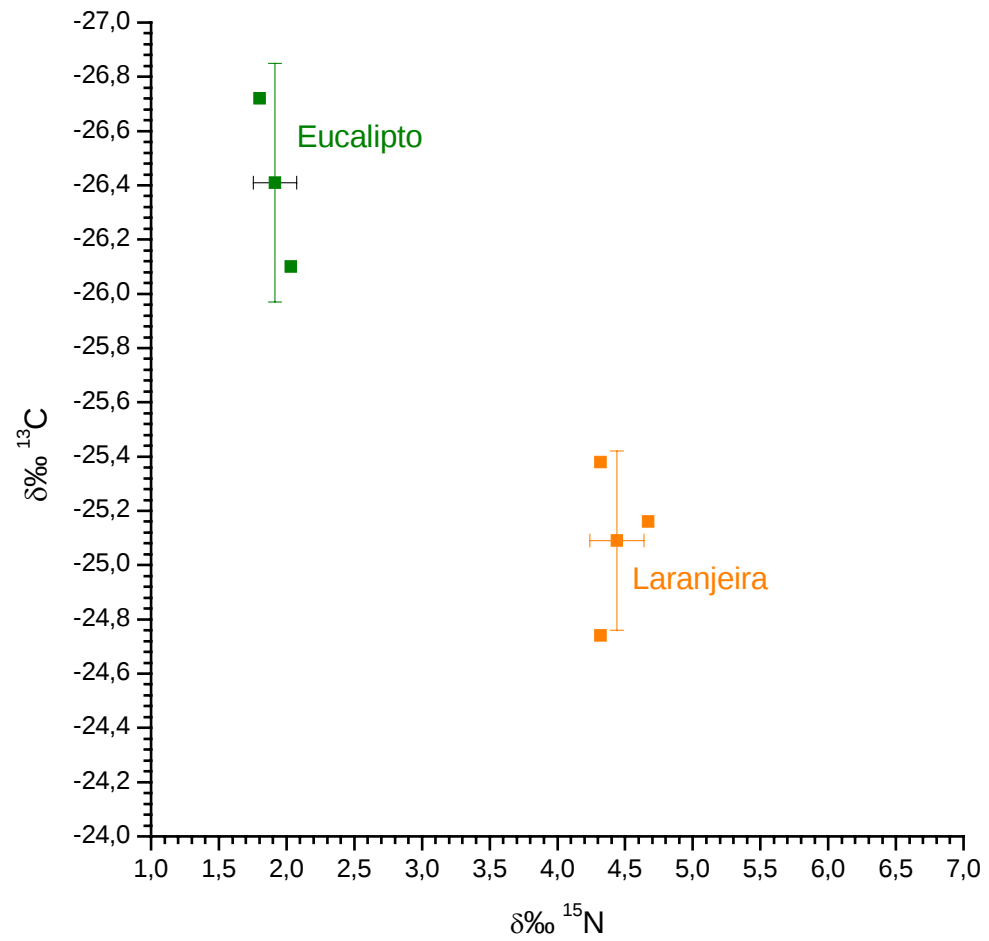


Figura 6. Valores médios (mínimo e máximo), preliminares, de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis de flores de Eucalypto e Laranjeira para o Estado de São Paulo.

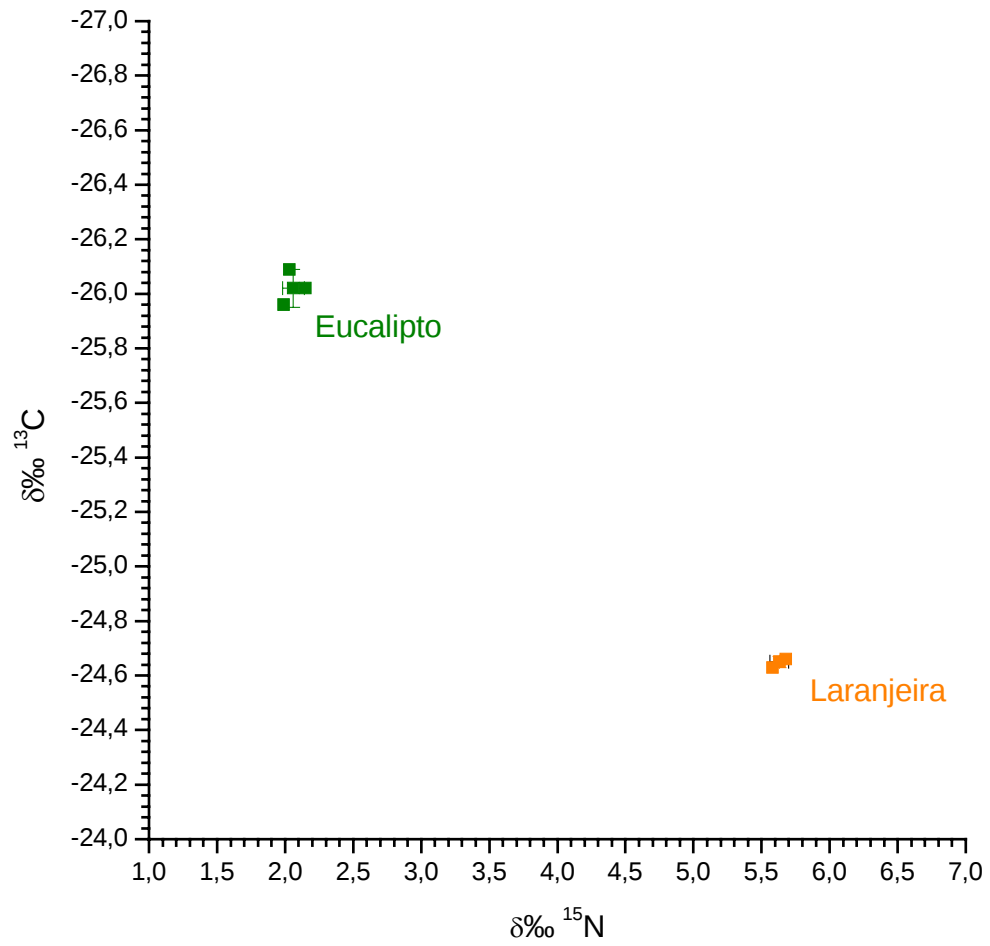


Figura 7. Valores médios (mínimo e máximo), preliminares, de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis de flores de Eucalipto e Laranjeira para o Estado de Rio de Janeiro.

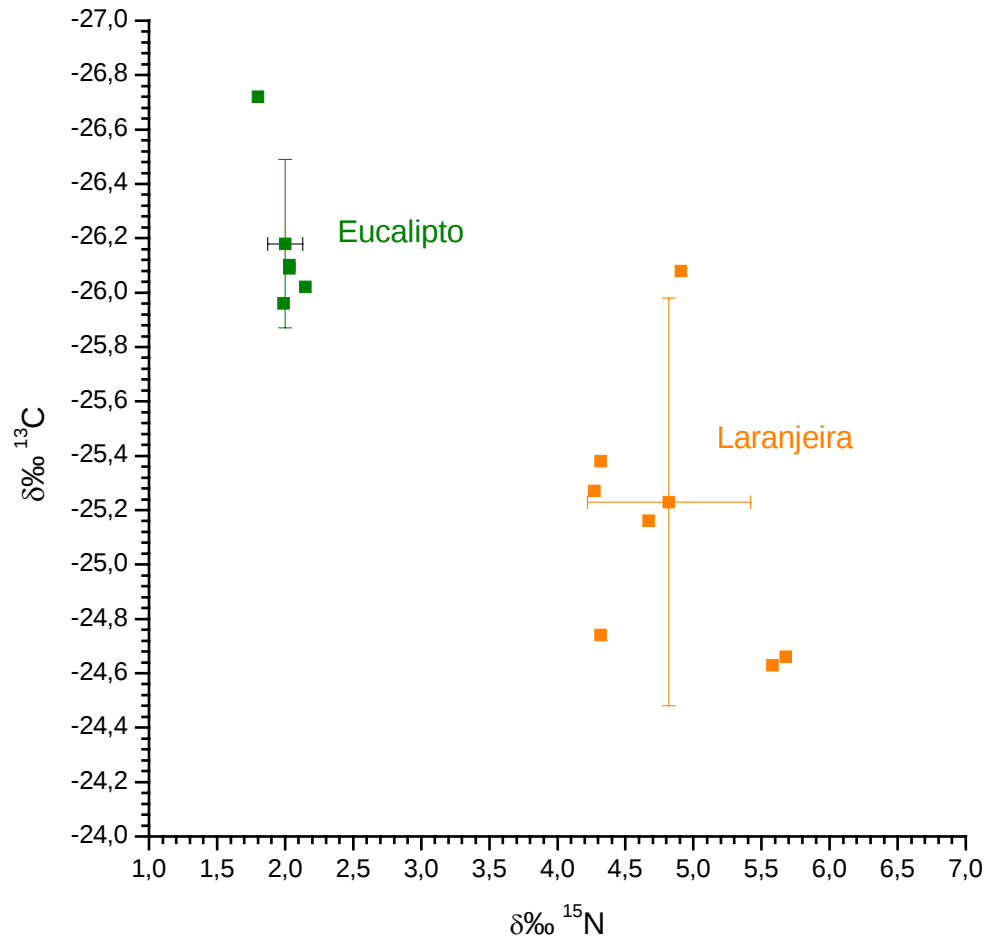


Figura 8. Valores médios (mínimo e máximo), preliminares, de $\delta^{0/00}\text{C}^{13}$ e $\delta^{0/00}\text{N}^{15}$ nas proteínas dos méis de flores de Eucalypto e Laranjeira para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná.

O enriquecimento sistemático do Nitrogênio -15 nas proteínas dos méis de flores de Laranjeira nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná pode ser um reflexo, em princípio, dos solos naturais ricos em compostos nitrogenados. O uso de fertilizantes como trato agrônômico, faria, em princípio, com que o solo dos pomares apresentasse valores próximo ao intervalo de +1 a -1‰ em $\delta^{0/00}\text{N}^{15}$, uma vez que os adubos nacionais, utilizam o nitrogênio do ar atmosférico como matéria prima. Os dados preliminares sugerem que novas pesquisas sejam realizadas.

6. Conclusões

Os resultados obtidos permitem formular as seguintes conclusões:

- A utilização da metodologia da determinação isotópica do carbono ($\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$) no mel é plenamente adequada na identificação de adulteração.
- A metodologia isotópica do Carbono ($\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$) permite monitorar apiários idôneos com pequenas contaminações de subprodutos das plantas do Ciclo Fotossintético C_4 .
- Observou-se que 92% dos méis dos estados brasileiros analisados são puros pelo critério de $\leq -1^{0/00}$, indicando um ótimo desempenho dos apiários nacionais.
- A variabilidade isotópica do $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ dos méis puros brasileiros esteve entre -23,8 a -28,6 $^{0/00}$ e de sua proteína -23,8 a -28,0 $^{0/00}$.
- A variação isotópica do $\delta^{0/00} {}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis puros brasileiros esteve entre 1,8 a 15,4 $^{0/00}$.
- Na amostragem das proteínas dos méis puros de flores de Eucalipto e de Laranjeira, o uso do duplo eixo isotópico de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00} {}^{15}\text{N}$ permite, em princípio, a identificação botânica de méis uniflorais nos estados de São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro.
- Na amostragem dos méis puros das regiões e estados brasileiros, o uso do duplo eixo isotópico de $\delta^{0/00} {}^{13}\text{C}$ e $\delta^{0/00} {}^{15}\text{N}$ nas proteínas dos méis dos Estados da Bahia e Pernambuco permite diferenciá-los do Nitrogênio -15 dos demais méis puros de outros estados.

7. Referências Bibliográficas

- AMBROSE S.H. DENIRO M.J. (1986). The isotopic ecology of east african mammals. *Oecologia*, **69**, p.395-406.
- AOAC (2000) Official Method 998.12.C₄ Plant Sugar in Honey. CH44, p.29-32.
- DONER L. W. (1991) Verifying the authenticity of plant-derived material by stable isotope ratio and chromatographic methodologies. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **74**, p.14-9.
- DONER L. W., WHITE JR. W. (1977) Carbon-13/12- ratio is relatively uniform among honeys. *Science*, **197**, p.891-2.
- DUCATTI C. (2000). Curso de Pós- graduação isótopos estáveis ambientais. Centro de Isótopos Estáveis Ambientais. Depto. de Física e Biofísica – IB. UNESP – Campus de Botucatu, 138p.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (1984) 14th Ed., AOAC, Arlington, VA, secs **31.158-31.161**.
- PADOVAN G. J, DE JONG D., RODRIGUES L. P., MARCHINI J.S. (2003) Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotopic ratio. *Food Chemistry*, **82**, p. 633-636.
- ROSSI N. F., MARTINELLI L. A. LACERDA T. H. M. CAMARGO P.B., VICTORIA R. L. (1999) Análise da adulteração de méis por açúcares comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **19**, p.3-8.
- SAS User's procedures guide. Version 6. 4ed. Vol.1-2, Cary, NC:SAS Institute, Inc, 1999. 1686p.
- SHEARER G., KOHL A. H., VIRGINIA R.A. (1983). Estimates of N₂ fixation from variation in the natural abundance of ¹⁵N in Sonoran Desert ecosystems. *Oecologia*, **56n**, p.365-373.
- WHITE JR. W. (1992) Internal standard stable carbon isotopic ratio method for determination of C₄ plant surges in honey: collaborative study, and evaluation of improved protein preparation procedure. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **75**, p. 543-8.

- WHITE JR.W., DONER L. W. (1978a). Mass spectrometric detection of high-fructose corn syrup in honey by use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio: collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, **61**, p. 746-50.
- WHITE JR. W., WINTERS K. (1989) Honey protein as internal standard for stable carbon isotope detection of adulteration of honey. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, **72**, p.907-011.

DETERMINAÇÃO DO pH MAIS EFICIENTE DA ENZIMA INVERTASE DAS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS EM *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADA)

1. Resumo

O néctar é coletado pelas operárias coletoras e transportado em sua vesícula nectarífera para a colméia. Durante a sua transformação em mel, o néctar recebe enzimas provenientes das glândulas hipofaringeanas, as quais atuam em seu processamento. A invertase é uma das enzimas adicionadas ao néctar e promove a inversão da sacarose em frutose e glicose. Com o objetivo de se conhecer o pH ideal dessa enzima nas abelhas operárias foram extraídas as glândulas hipofaringeanas de abelhas com oito dias de idade. O método utilizado para a dosagem da invertase foi o do ácido 3-5´ dinitrosalicílico (DNS) para determinação de açúcares redutores, utilizando-se medida de leitura espectrofotométrica em absorbância da glicose em comprimento de onda (λ) igual a 540nm. De acordo com os resultados, verificou-se que a atividade catalítica da enzima foi mais eficiente no pH 5,0 e em 40 minutos de reação em comparação com outros valores de pH e tempos de reação. Não foi possível a reutilização das glândulas. Desta forma, concluiu-se que a enzima invertase aumentou sua eficiência em função do tempo de reação de forma linear e significativa em pH 5,0.

Palavras-chaves: enzima, invertase, glândulas hipofaringeanas, abelhas *Apis mellifera*

DETERMINATION OF THE EFFICIENT pH INVERTASE ENZYME OF HYPOPHARYNGEAL GLANDS IN *Apis mellifera* L. (AFRICANIZED)

2.- Abstract

The nectar is collected by the collecting workers that carry it in its nectar gallbladder to the beehive. During its transformation in honey, the nectar receives enzymes proceeding from the hypopharyngeal glands, which act in its processing. Invertase is one of enzymes added to the nectar and promotes the inversion of sacarose in fructose and glucose. With the aim of knowing the ideal pH, in the worker bees, the bee's hypopharyngeal glands with eight days of age had been extracted. The used method, for the dosage of invertase, had been the 3-5 ' dinitrosalisilic acid for determination of reducing sugars, using absorbance spectrophotometry data from the glucose in λ equal to 540nm. According to the results, it had been verified that the enzyme catalytic activity had been more efficient in pH 5,0 and in 40 minutes of reaction, comparing to other pH values and times of reaction. The glands reuse had not been possible. At this way, it was concluded that the invertase enzyme had increased its efficiency by the reaction time at linear and significant way in pH 5,0.

Key words: enzyme, invertase, hypopharyngeal glands, *Apis mellifera* bees

3. Introdução

As abelhas melíferas desenvolveram vários mecanismos para o processamento do néctar e pólen durante a sua evolução, de forma que o alimento fosse distribuído na colônia e fornecido de acordo com o grau de desenvolvimento do indivíduo e suas necessidades (Michener, 1972). O néctar é apanhado pelas operárias coletoras e transportado na vesícula nectarífera para a colônia onde é passado para outra operária ou depositado diretamente no favo (Michener, 1972). Segundo Maurizio (1957), durante o transporte do néctar são adicionadas enzimas provenientes das glândulas hipofaríngeas, as quais atuam em seu processamento para transformá-lo em mel. Entre essas enzimas está a invertase que quebra a sacarose do néctar em glicose e frutose (Simpson *et al.*, 1968; Takenaka *et al.*, 1990), e a glicose-oxidase (White Jr *et al.*, 1963).

Pequenas quantidades de invertase estão presentes no mel maduro. Para verificar a qualidade do mel, White Jr *et al.* (1963) demonstraram que a invertase é melhor que a diastase, uma vez que possui maior sensibilidade ao aquecimento e, Dustmann (1993), afirmou que a invertase, em combinação com outros critérios analíticos, é capaz de detectar os danos causados na qualidade do mel pelo aquecimento ou estocagem durante um longo período de tempo.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram:

- Determinar o pH onde a invertase tem atividade mais eficiente;
- Verificar se após a reação enzimática ainda é possível reutilizar a enzima para uma nova reação.

4. Material e Métodos

4.1. Colônias utilizadas

Quadros de cria operculada foram retirados de colméias de abelhas africanizadas com alta densidade populacional e transferidos para estufas com temperatura controlada (34°C), para o nascimento das abelhas. Após o nascimento, as abelhas foram marcadas no tórax com tinta atóxica, objetivando a identificação de sua idade. Essas abelhas foram então introduzidas em quatro colméias experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, contendo cinco quadros.

4.2. Soluções tampões utilizadas e pHs estudados

Para a análise da atividade da enzima invertase em diferentes valores de pHs foram utilizados o tampão acetato de sódio 0,1M para os valores de pHs 4 e 5 e o tampão fosfato de sódio 0,1M (Sörense) para os valores de pHs 6, 7 e 8.

4.3. Metodologia de análise

4.3.1. Elaboração da curva de referência para determinação de açúcares redutores

Para análise da atividade da enzima invertase se fez necessária à determinação da curva de referência de açúcar redutor, na qual utilizamos a glicose (determinação do coeficiente de extinção molar), conforme metodologia de Miller (1959), citado por Villela *et al.* (1973).

Em diferentes tubos de ensaio foram colocados 0,1; 0,15; 0,20; 0,30; 0,40 e 0,50mL de glicose, completando-se o volume para 0,5mL com água destilada. Adicionou-se, em seguida, 0,5mL de ácido 3-5'dinitrosalicílico (DNS) em cada tubo. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por cinco minutos, sendo em seguida resfriados e adicionados 5mL de água destilada em cada tubo. As leituras foram realizadas em

espectrofotômetro em λ igual a 540nm. O coeficiente de extinção molar (ε) foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$\varepsilon = [A_2 - A_1] / [C_2 - C_1]$, onde:

ε = coeficiente de extinção molar ($\mu\text{mol}/0,5\text{mL}$)

A = Absorbância

C = Concentração de glicose

4.3.2. Atividade da enzima invertase em cinco diferentes valores de pH.

Foram estudadas 75 amostras e cada amostra foi constituída de 20 glândulas, retiradas de 10 abelhas operárias com oito dias de idade. Esta idade foi determinada tomando-se como base estudos previamente realizados (experimento piloto).

A dosagem da enzima está baseada no fato de que a invertase, por sua ação de β -fructofuranosidase, catalisa a quebra da molécula da sacarose em α -glicose e β -frutose. Ambas as hexoses estão combinadas pelo grupo redutor respectivo, mas a sacarose não possui propriedades redutoras. Por esta razão é possível medir a ação da invertase determinando-se a formação de açúcar redutor. Assim, a sua atividade foi determinada conforme metodologia de Miller (1959), citado por Villela *et al.* (1973), com medida de leitura espectrofotométrica em absorbância da glicose e frutose em λ igual a 540nm. No caso de métodos baseados na oxidação ou na redução, cuja medida é espectrofotométrica, a unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de produzir 01 $\mu\text{mol}/0,5\text{mL}$ de açúcares redutores em 1 minuto de reação.

Foram colocados 5mL de sacarose a 1% em solução tampão (em seu respectivo pH), fosfato de sódio ou acetato de sódio com 0,5mL de amostra extraída das glândulas hipofaríngeas maceradas de 10 abelhas. Nos momentos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos retirou-se uma amostra de 0,5mL e parou-se a reação com 0,5mL de DNS. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por cinco minutos, sendo em seguida resfriados e adicionados 5mL de água destilada em cada tubo. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro em λ igual a 540nm.

4.3.3. Reutilização da enzima invertase para uma nova reação enzimática

Foram estudadas nove amostras, sendo que cada uma foi constituída de 20 glândulas retiradas de 10 abelhas operárias com oito dias de idade.

Foram colocados 5mL de sacarose a 1% em solução tampão de acetato de sódio em 0,5mL de amostra extraída das glândulas hipofaríngeas sem macerar de 10 abelhas. Nos momentos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos retirou-se uma amostra de 0,5mL e parou-se a reação com 0,5mL de DNS sendo, em seguida, colocadas em banho-maria a 100°C por 5 minutos. A seguir foram resfriadas e adicionadas 5mL de água destilada em cada amostra. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro em λ igual a 540nm. As glândulas que ficaram no tubo, em repouso por 4 horas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e lavadas novamente com água destilada por duas vezes. Em seguida, repetiu-se todo este procedimento.

4.4. Análise estatística

Os dados de absorbância foram submetidos à análise de variância, pelo método dos quadrados mínimos, utilizando-se o procedimento GLM, descrito no SAS (1999), tendo como causa de variação os valores de pH ($i = 4,0; 5,0; 6,0; 7,0$ e $8,0\text{pH}$), os momentos ($j = 0, 10, 20, 30$ e 40 minutos) e a interação entre pH e momento. As diferenças entre as médias foram submetidas ao teste de Tukey, com 5% de significância.

5. Resultados e discussão

5.1. Curva de referência para determinação de açúcares redutores

Na análise da atividade da enzima invertase em diferentes pHs, se fez necessária a determinação da curva de referência da glicose (determinação do coeficiente de extinção molar). O resultado é apresentado na Figura 1

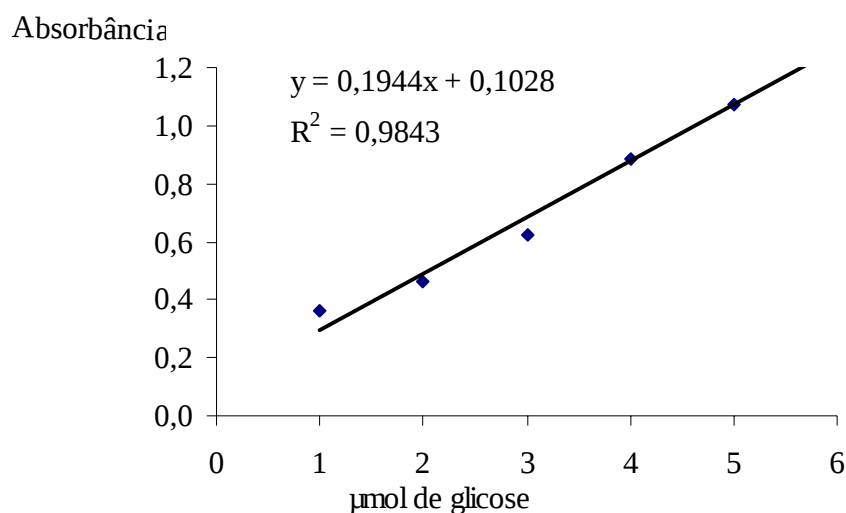


Figura 1. Curva de referência da glicose para determinação da atividade da invertase

O coeficiente de extinção molar (ϵ) da glicose foi de $0,1944 \text{ (}\mu\text{mol/0,5mL}^{-1}\text{)}$, com coeficiente de determinação de $R^2 = 98,43\%$, mostrando assim, a precisão da dosagem.

5.2. Atividade da enzima invertase em cinco diferentes valores de pH.

Os resultados médios de absorbância nos diferentes valores de pHs são encontrados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios de absorvância da enzima invertase das glândulas hipofaringeanas de abelhas operárias *Apis mellifera* L. (africanizada) com oito dias de idade, nos cinco valores de pH (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0).

Absorvância Média	Níveis de pHs				
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
	0,110 B	0,247 A	0,114 B	0,021 D	0,059 C

Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey, com 5% de significância

Na análise dos resultados a ação da invertase na redução da glicose, observou-se diferença significativa entre os diferentes valores de pHs (Tabela 1). A enzima invertase apresentou maior atividade catalítica em pH 5,0 (0,247A_{540nm}) nas glândulas hipofaringeanas de abelhas operárias com oito dias de idade. Já no pH 7,0 (0,021A_{540nm}) teve menor atividade catalítica. Os valores médios da absorvância foram iguais para os pHs 4,0 e 6,0 (Tabela 1).

Quanto à ação da enzima em função dos momentos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos, verificou-se que o valor médio aumenta em função do tempo (momento) de modo significativo, atingindo 0,223 A_{540nm} aos 40 minutos de sua ação, como mostra a Tabela 2 .

Tabela 2. Valores médios de absorvância da enzima invertase das glândulas hipofaringeanas de abelhas operárias *Apis mellifera* L. (africanizada) com oito dias de idade, nos cinco momentos (0, 10, 20, 30, e 40 minutos).

Absorvância Média	Momentos (minutos)				
	0	10	20	30	40
	0,000E	0,055D	0,113C	0,161B	0,223A

Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey, com 5% de significância

Os resultados da interação entre os valores de pH e os momentos, estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 3.

Tabela 3: Valores médios de absorvância da enzima invertase das glândulas hipofaringeanas de abelhas operárias *Apis mellifera* L. (africanizada) com oito dias de idade.

pHs	Momentos (minutos)				
	0	10	20	30	40
4,0	0,000 Ea	0,090 Db	0,110 Cb	0,148 Bc	0,203 Ac
5,0	0,000 Ea	0,103 Da	0,264 Ca	0,362 Ba	0,504 Aa
6,0	0,000 Ea	0,049 Db	0,114 Cb	0,178 Bb	0,231 Ab
7,0	0,000 Ea	0,007 Dd	0,020 Cd	0,031 Be	0,049 Ae
8,0	0,000 Ea	0,025 Dc	0,057 Cc	0,089 Bd	0,125 Ad

Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferenças significativas entre os momentos, através do teste de Tukey, com 5% de significância

Letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas entre os valores de pH, através do teste de Tukey, com 5% de significância

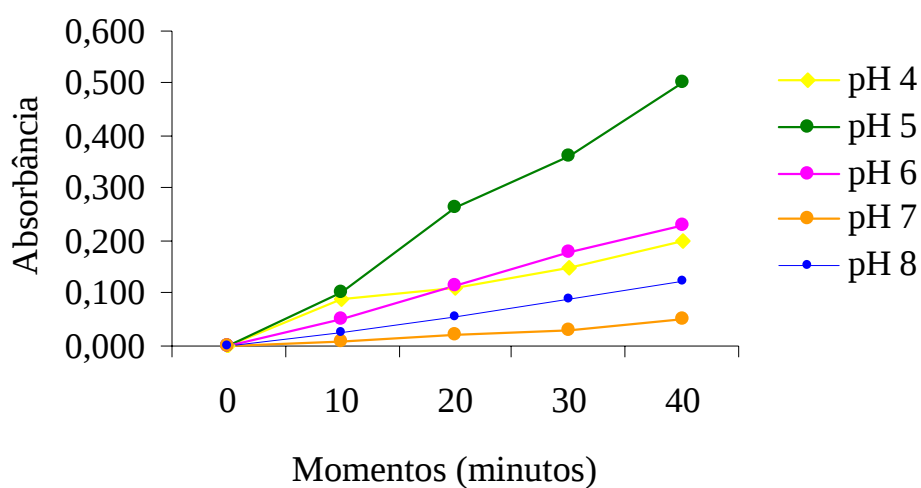


Figura 3. Valores médios de absorvância da enzima invertase das glândulas hipofaringeanas de abelhas operárias *Apis mellifera* L. (africanizada) com oito dias de idade, nos diferentes valores de pH e nos diferentes momentos.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 3 e na Figura 3 e através dos valores médios de absorbância nos diferentes pHs em função dos diferentes tempos verificou-se que, a ação da invertase foi crescente e linear em função dos tempos de reação. No entanto, aos 10 minutos de reação, a invertase se comportou similarmente nos pHs 4 e 5; da mesma forma aos 20 minutos os pHs 4 e 6, porém, em as outras interações agiu diferentemente como se observa na Figura 3. Este fato mostra que a enzima se comporta diferentemente em cada um dos pHs estudados.

5.3. Reutilização da enzima invertase para uma nova reação enzimática

Em todas as análises realizadas, não foi possível a reutilização da invertase para uma nova reação enzimática, pois a enzima quando colocada na presença de sacarose foi liberada para a solução.

6. Conclusões

Pelos resultados apresentados pôde-se concluir que:

- A enzima invertase tem maior atividade catalítica em pH 5,0 em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias com oito dias de idade;
- A invertase aumentou sua eficiência em função do tempo de reação, de forma linear e significativa, mostrando que os ensaios enzimáticos foram bem delineados;
- Em todas as análises realizadas não foi possível a reutilização da invertase.

7. Referências Bibliográficas

- DUSTMANN J.H. (1993) Honey quality and its control. American Bee Journal, **133**, 648-51.
- MAURIZIO A. (1957) Break down of sugar by inverting enzymes in the pharyngeal glands and midgut of honeybees. Bee World, **40**, 275-83.
- MICHENER C.D. (1972) The social behavior of the bees. Cambridge: Harvard University. 189p.
- SAS User's procedures guide. Version 6. 4ed. Vol.1-2, Cary, NC:SAS Institute, Inc, 1999. 1686p.
- SIMPSON J., RIEDEL I.B.M., WILDING N. (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. Journal of Apicultural Research, **7**, 29-36.
- TAKENAKA T., MIWA S., ECHIGO T. (1990) Changes of protein content and enzyme activity in hypopharyngeal glands during lifespan of honeybees workers (*Apis mellifera* L.). Bulletin of the Faculty of Agriculture Tamagawa University, **30**, 1-8.
- VILLELA G.G., BACILA M., TASTALDI H. (1973) Técnicas e Experimentos de Bioquímica. Rio de Janeiro. Guanabara - Koogan. 398p.
- WHITE JR W., SUBERS M.H., SCHEPARTZ A.I. (1963) Identification of inhibine, the antibacterial factor in honey glucose oxidase system. Biochimica et Biophysica Acta, **73**, 57-70.

DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS EM *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADAS)

1. Resumo

As glândulas hipofaringeanas são estruturas pares em forma de cachos longos que recobrem a porção médio-anterior do cérebro. Cada cacho consta de um canal excretor axial, ao qual encontram-se ligadas numerosas unidades secretoras presas a ele por seus canalículos excretores. Os objetivos deste trabalho foram classificar as glândulas hipofaringeanas de abelhas com 15 dias de idade e determinar o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas em abelhas coletoras, segundo o tipo de alimento coletado. Foram encontrados quatro tipos de glândulas, classificadas como tipos G1, G2, G3 e G4, de acordo com o volume dos ácinos, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Observou-se que o tipo G2 apresentou maior volume em comparação com os demais tipos. Verificou-se também, que os tipos de glândulas foram dependentes da atividade de coleta, sendo que o tipo G1 apareceu na abelha coletora de néctar e néctar/pólen; o tipo G2 não foi encontrado em nenhuma abelha coletora; o tipo G3 em coletoras tanto de néctar como de pólen e o tipo G4 na coletora de água. Pode-se concluir que as glândulas hipofaringeanas em abelhas *Apis mellifera* africanizadas mostram diferentes graus de desenvolvimento na idade de 15 dias e que o tipo de glândula hipofaringeana da abelha coletora pode indicar a atividade desempenhada.

Palavras chaves: abelhas *Apis mellifera*, glândula hipofaringeana

HYPOPHARYNGEAL GLANDS DEVELOPMENT IN BEES *Apis mellifera* L. (AFRICANIZED)

2. Abstract

The hypopharyngeal glands are pair structures in form of long clusters that recover the medium-previous portion of the brain. Each cluster consists of an axial excreting duct, in which there are several secretion units held on it by its excreting small ducts. The aims of this work had been to classify the hypopharyngeal glands of bees with 15 days and to determine the development of the hypopharyngeal glands in collecting bees according to the type of food collected. It had been found four types of glands, classified as G1, G2, G3 and G4 types, according to the size of acinars. It had been observed that G1 type had shown the greatest volume, compared to the other types. It had been also verified that the types of glands had been dependent on the collecting activity developed by the collecting worker bee, and G1 type had been found in the nectar collection and nectar/pollen; G2 type had not been found; G3 type had been found in nectar and pollen collection; and G4 type in the water collection. It can be concluded that the hypopharyngeal glands in Africanized *Apis mellifera* bees present different degrees of development in the age of 15 days and that the hypopharyngeal gland can indicate a differentiation in the activity developed in bees with the same age.

Key words: *Apis mellifera* bees, hypopharyngeal gland

3. Introdução

As glândulas são muito importantes para os insetos sociais. Várias tarefas são realizadas na colônia graças às glândulas exócrinas (Cruz-Landim, 1992). O ciclo secretor das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* L. está intimamente ligado à função de nutriz, realizada na colônia pelas operárias de 5 a 20 dias de idade (Lindauer, 1952; Silva de Moraes *et al.* 1985).

As glândulas hipofaríngeas são estruturas pares em forma de cachos longos que recobrem a porção médio-anterior do cérebro. Cada cacho consta de um canal excretor axial ao qual se encontram ligadas numerosas unidades secretoras presas a ele por seus canalículos excretores. As unidades secretoras são esferoidais, e por isso denominadas ácinos ou alvéolos. Os canais excretores de cada uma destas unidades desembocam no canal axial ou ducto excretor final, que por sua vez termina no assoalho da cavidade bucal, perfurando a placa hipofaríngea (Costa e Cruz-Landim, 1999b).

Em *Apis mellifera* L., as glândulas hipofaríngeas das operárias nutrizas produzem a maior parte dos constituintes da geléia real, principalmente os de natureza protéica (Patel *et al.*, 1964; Takenaka e Kaatz, 1987). Diferenças entre os tipos anatômicos das glândulas estão relacionadas com o local onde os canalículos, provenientes da unidade secretora, desembocam distinguindo-se, desta forma, quatro tipos principais (Cruz-Landim e Costa, 1998). Além da produção de alimento larval, também produzem enzimas necessárias ao metabolismo da abelha, tais como a invertase (Kratky, 1931; Maurizio, 1957; Simpson *et al.*, 1968) e as amilases (Takenaka *et al.*, 1990a) nas operárias coletoras e a α -glicosídeses (Takenaka *et al.*, 1990a) e glicose-oxídeses nas operárias nutrizas (White *et al.*, 1963; Simpson *et al.*, 1968; Takenaka *et al.*, 1990 a,b).

Maurizio (1957), investigando abelhas nascidas no verão e em colônias com rainhas engaioladas e sem cria presente, notou que as abelhas aumentaram suas glândulas hipofaríngeas como faziam durante o inverno. Dreischer (1956) retirou a rainha de uma colméia de observação e verificou mudanças no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas das operárias, tais como glândulas pouco desenvolvidas em operárias com idade de abelha nutriz e glândulas bem desenvolvidas em abelhas coletoras.

A relação entre a atividade proteolítica e o tamanho das glândulas foi observada por Moriz e Crailsheim (1987) e Crailsheim e Stolberg (1989), mostrando que as abelhas recém emergidas apresentavam ácidos com tamanhos de $81,7 \pm 1,3$ micrometros e, com oito dias, $149,0 \pm 2,8$ micrômetros acompanhados de um aumento da atividade proteolítica e que ambos diminuíram quando as abelhas tornaram-se coletoras. Afirmaram ainda, que a atividade proteolítica está correlacionada com a função dentro da colônia e com o estado fisiológico das abelhas do que com a idade.

Huang *et al.* (1989), demonstrou que o desenvolvimento da glândula hipofaríngea em abelhas operárias é muito flexível. Como as operárias de mesma idade desempenham atividades diferentes na colméia, também apresentariam diferentes desenvolvimentos de suas glândulas.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram:

- Determinar a classificação das glândulas hipofaríngeas de abelhas com 15 dias de idade quanto ao volume dos ácidos.
- Verificar o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas em abelhas coletoras, de acordo com o tipo de alimento coletado.

4. Material e métodos

4.1. Colônias utilizadas

Quadros de cria operculada foram retirados de colméias de abelhas africanizadas com alta densidade populacional e transferidos para estufas com temperatura controlada (34°C), para a emergência de abelhas. Após o nascimento, as abelhas foram marcadas no tórax com tinta atóxica para identificação de sua idade. Estas abelhas foram então introduzidas em quatro colméias experimentais de abelhas *Apis mellifera* L.(africanizadas), contendo cinco quadros.

4.2. Obtenção das glândulas hipofaríngeas e metodologia utilizada

4.2.1. Classificação das glândulas hipofaríngeas de abelhas com 15 dias de idade

As glândulas de abelhas com 15 dias de idades foram classificadas em G1, G2, G3 e G4 pela mensuração dos diâmetros dos ácinos. Após alguns experimentos piloto determinamos que o décimo quinto dia seria o mais indicado para se avaliar os diferentes tipos de glândula, por apresentarem os quatro tipos de glândulas nesta idade.

Para a determinação do volume dos ácinos utilizou-se a metodologia de Hrassningg e Crailsheim (1998).

As glândulas extraídas foram misturadas a uma solução conservante denominada Ringer. A solução de Ringer foi elaborada com 5,0g de NaCl; 0,42g KCL e 0,25g de CaCl₂ em q.s.p. 100mL. A partir da adição de 1mL dessa solução concentrada em 10mL de água destilada obteve-se o Ringer diluído - metodologia de Rocha (1999). As glândulas foram fotografadas em escala com auxílio de microscópio estereoscópico. Foram estudadas 10 repetições (40 glândulas) de cada tipo de glândula.

4.2.2. Desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas em abelhas coletoras de acordo com o tipo de alimento coletado

A amostragem de 106 abelhas coletoras foi colhida na entrada da colméia (alvado), a qual foi fechada com espuma plástica. Após 2 minutos foram recolhidas em um frasco plástico as abelhas marcadas que retornaram do campo, geralmente de 10 a 20 abelhas. Em seguida, foram levadas ao congelador, à temperatura de - 7°C. O congelamento fez-se necessário para não haver perda de néctar por regurgitação ou pela passagem do néctar da vesícula nectarífera para o ventrículo e conseqüentemente perda do material, além de facilitar a manipulação das abelhas durante as análises. As abelhas recolhidas foram separadas em coletoras de néctar, de pólen, de pólen e néctar e de água. Após a classificação das abelhas pelo tipo de coleta, extraíram-se suas glândulas hipofaringeanas que foram classificadas pelo volume dos ácinos.

4.3. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento GLM descrito no SAS (1999) e as diferenças entre as médias submetidas ao teste de Tukey, com 5% de significância.

5. Resultados e discussão

5.1. Classificação das glândulas hipofaríngeas de abelhas com 15 dias de idades, quanto ao volume dos ácinos

Os volumes médios dos ácinos nos diferentes tipos de glândulas hipofaríngeas de operárias com 15 dias de idade encontram-se na Tabela 1. Nas Fotos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 observam-se os diferentes tipos de glândulas.

Tabela 1. Valor médio dos volumes (mm^3) dos ácinos em glândulas de diferentes tipos, em abelhas com 15 dias de idade.

	Tipos de glândulas				
	G1	G2	G3	G4	Média
Volume médio dos ácinos (mm^3)	0,0029 $\pm$ 0,0005 B	0,0045 $\pm$ 0,0004 A	0,0013 $\pm$ 0,0005 C	0,0021 $\pm$ 0,0005 BC	0,003 $\pm$ 0,001

Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey, a 5% de significância

O volume médio dos ácinos nos quatro tipos de glândulas G1, G2, G3 e G4 foi de $0,003\pm 0,001\text{mm}^3$; coeficiente de determinação $R^2 = 0,622$ e coeficiente de variação de 44,52% (Tabela 1).

Na análise dos resultados verificou-se que, o volume dos ácinos na glândula do tipo G1 é igual a do tipo G4, mas diferente significativamente dos outros tipos. A glândula do tipo G2 apresenta ácinos com maior volume e difere estatisticamente dos outros tipos G1, G3 e G4. O tipo G3 apresenta volume semelhante ao do tipo G4, mas difere estatisticamente dos outros tipos (Tabela 1).

Na Foto 1, a glândula hipofaríngea do tipo G1 foi fotografada: A - em aumento de foco 1,25 e B - em foco 4 (1 mm de régua na fotografia é igual a 1,5 cm no foco 1,25; 4,8 cm no foco 4). Nesse tipo de glândula, os ácinos parecem distribuídos de uma forma uniforme, além de serem mais esféricos do que ovóides.

Na Foto 2, a glândula hipofaríngea do tipo G2 foi fotografada em: A e B - no aumento de foco 2,5; C - no foco 5 e D - no foco 1,25 (1 mm de régua na fotografia é igual a 2,9 cm no foco 2,5; 6,2 cm no foco 5). Essa glândula apresenta um grande número de

ácinos grandes e de forma ovóides. Esse tipo (G2) apresenta pequenas variações, que são mostradas na Foto 2, sendo uma glândula com ácinos maiores e outra com ácinos menores.

Na Foto 3, a glândula do tipo G3 foi fotografada em aumento: A - no foco 6,3; B - no foco 5 (1 mm de régua na fotografia é igual a 7,2 cm no foco 6,3; 1 cm no foco 0,8 e 6,2 cm no foco 5) e C - no foco 0,8. Essa glândula apresenta-se delgada, comprida e com os ácinos menores.

Na Foto 4, a glândula hipofaringeana do tipo G4 foi fotografada em aumento: A - foco 6,3 (1 mm de régua na fotografia é igual a 7,2 cm no foco 6,3). Essa glândula é semelhante à do tipo G1, diferindo principalmente por apresentar ácinos sem distribuição uniforme.

Na Foto 5 a glândula G4 é mostrada em detalhes: A - no foco 5; B - no foco 3,2 e C - no foco 0,8.

Na Foto 6 são mostradas as glândulas dos quatro tipos: G1, G2, G3 e G4, fotografadas no foco 1,25 (1 mm de régua na fotografia é igual a 1,5 cm no foco 1,25).



Foto 1. Glândula hipofaringeana do tipo G1 em abelhas de 15 dias de idade. Fotografia: A em aumento de foco 1,25 e B em foco 4 (1 mm de régua na fotografia é igual a 1,5 cm no foco 1,25; 4,8 cm no foco 4).

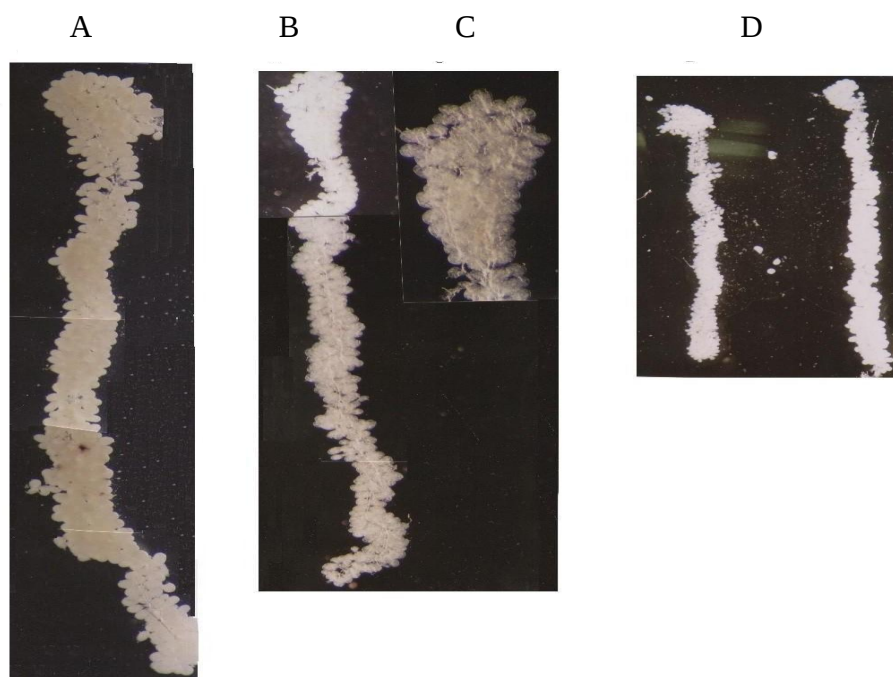


Foto 2. Glândula hipofaringeana do tipo G2 em abelhas de 15 dias de idade. Fotografia em: A e B no aumento de foco 2,5; C no foco 5 e D no foco 1,25 (1 mm de régua na fotografia é igual a 2,9 cm no foco 2,5; 6,2 cm no foco 5).

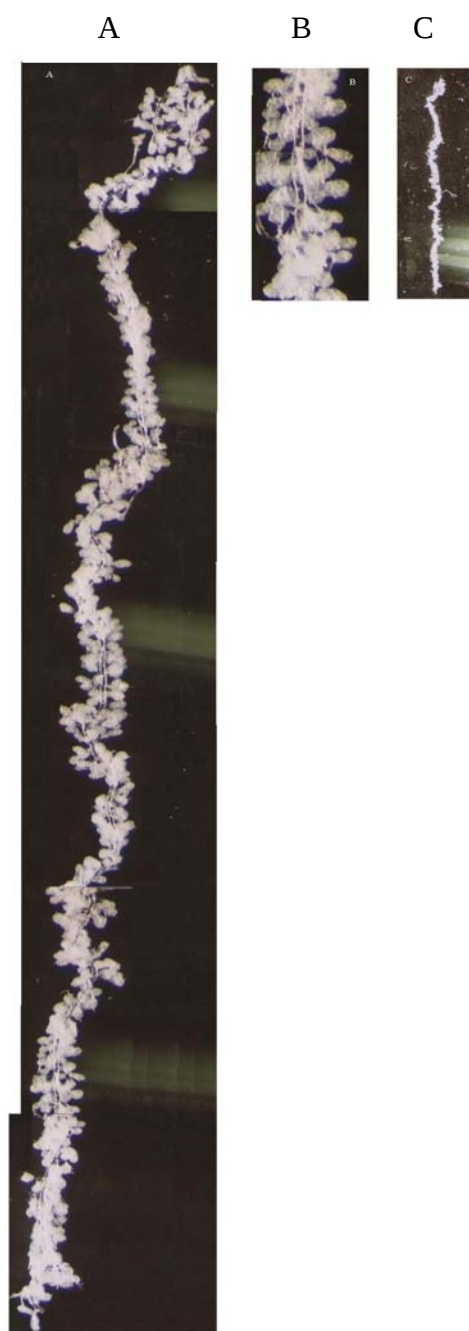


Foto 3. Glândula hipofaríngeana do tipo G3 em abelhas de 15 dias de idade. Fotografia em aumento: A no foco 6,3; B no foco 5 (1 mm de régua na fotografia é igual a 7,2 cm no foco 6,3; 1 cm no foco 0,8 e 6,2 cm no foco 5) e C no foco 0,8.

A

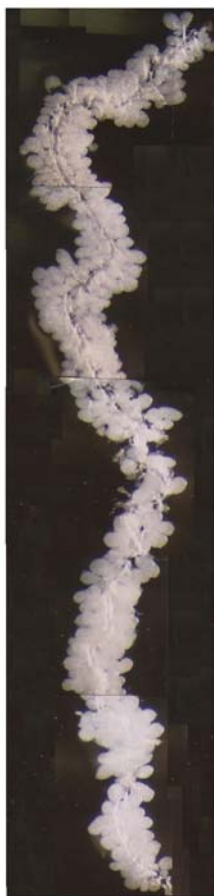


Foto 4. Glândula hipofaringeana do tipo G4 em abelhas de 15 dias de idade. Fotografia em aumento: A foco 6,3 (1 mm de régua na fotografia é igual a 7,2 cm no foco 6,3).

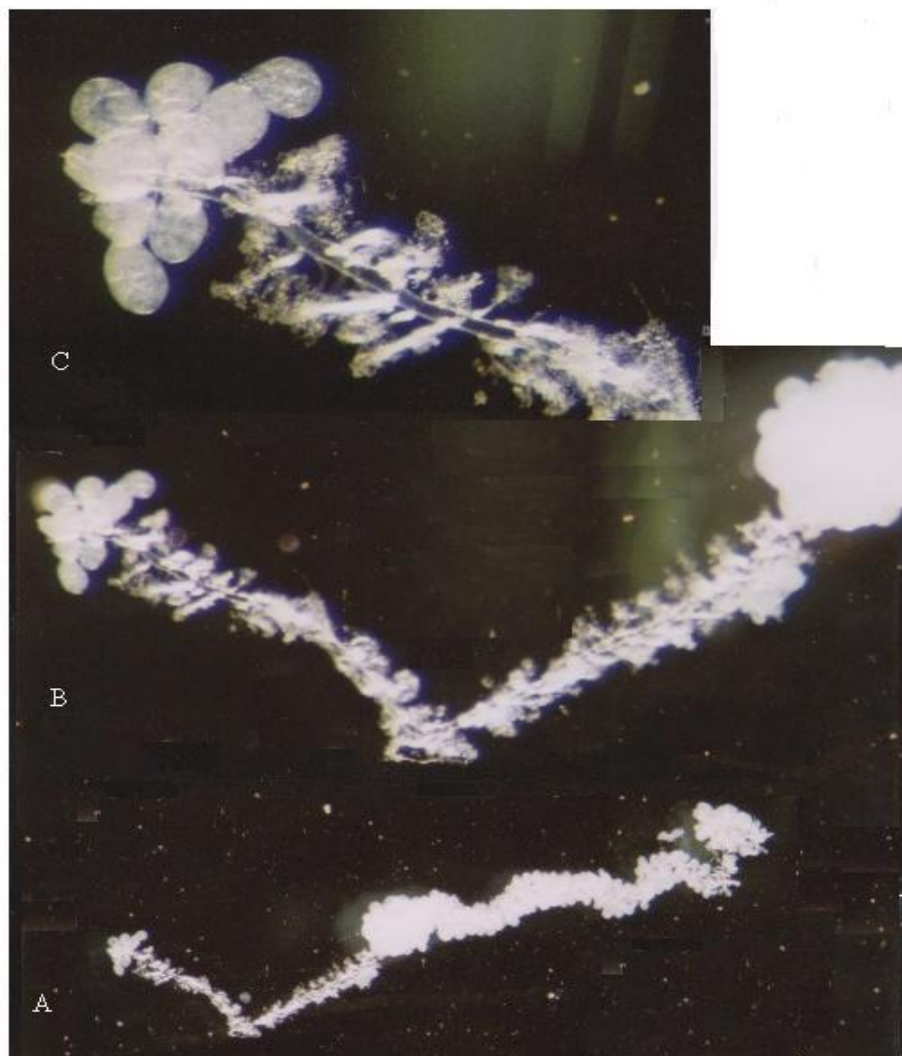


Foto 5. Glândula hipofaringeana do tipo G4 em abelhas de 15 dias de idade. A no foco 5; B no foco 3,2 e C no foco 0,8.



Foto 6. Tipos de glândula hipofaringeana em abelhas de 15 dias de idade: G1, G2, G3 G4. fotografadas no foco 1,25 (1 mm de régua na fotografia é igual a 1,5 cm no foco 1,25).

5.2. Desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas em abelhas coletoras de acordo com o tipo de alimento coletado

Os resultados de 106 abelhas coletoras classificadas pelo tipo de coleta realizada e tipo de glândula encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Número de abelhas coletoras e número de glândulas (entre parêntesis), segundo os tipos de coleta e de glândulas hipofaringeanas (G1, G2, G3 e G4).

	Tipo de glândula	Néctar	Pólen	Néctar/Pólen	Água
	G1	28 (56)		5,5 (11)*	
	G3	39 (78)	22 (44)	5,5 (11)*	
Total	106 (212)	67 (134)	22 (44)	11 (22)*	6 (12)

* abelhas apresentando dois tipos de glândula

Os resultados da Tabela 2 mostram que as 67 abelhas coletoras de néctar apresentaram as duas glândulas com desenvolvimento semelhante, sendo que destas, 28 abelhas apresentaram glândulas do tipo G1 e, 39 do tipo G3. As 22 coletoras de pólen apresentavam as duas glândulas do tipo G3. As 6 coletoras de água apresentaram as duas glândulas do tipo G4. No entanto, as 11 coletoras de néctar e pólen apresentaram dois tipos de glândulas por abelha, sendo uma do tipo G1 e outra do G3. Aparentemente, a atividade da abelha na colônia está correlacionada com o desenvolvimento glandular.

Maurizio (1957), investigando abelhas nascidas no verão e de colméias com rainhas engaioladas e sem cria presente, verificou que as glândulas hipofaringeanas das abelhas aumentaram de volume como nas abelhas nascidas durante o inverno. Dreischer (1956), retirando a rainha de uma colméia de observação, verificou mudanças no desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas das operárias encontrando abelhas nutrízes com essas glândulas pouco desenvolvidas e abelhas velhas com glândulas bem desenvolvidas.

Os resultados encontrados na Tabela 2 concordam com os verificados por Free (1980), onde a atividade a ser desenvolvida determina o desenvolvimento das glândulas envolvidas. Entretanto, o inverso parece ser verdadeiro, pois por exemplo, se abelhas novas forem mantidas durante uma semana com uma dieta de carboidratos, suas glândulas hipofaringeanas não se desenvolveriam normalmente e elas sairiam para as coletas mais precocemente ao padrão normal, não desempenhando a atividade de alimentar a cria.

Segundo Huang *et al.* (1989), o desenvolvimento da glândula hipofaringeana em abelhas operárias é muito flexível, já que abelhas operárias de mesma idade desempenham atividades diferentes na sua colônia e também apresentariam diferentes desenvolvimentos das glândulas hipofaíngenas. Simpson *et al.* (1968), analisando abelhas com diferentes ocupações na colméia, encontraram diferenças no tamanho da glândula sendo que as abelhas mais jovens apresentavam maior tamanho das glândulas hipofaringeanas.

6. Conclusões

Os resultados permitem concluir que as glândulas hipofaringeanas em abelhas *Apis mellifera* africanizadas mostram diferença no seu desenvolvimento, apresentando diferentes graus de desenvolvimento na mesma idade, o que pode indicar uma diferenciação nas atividades que desempenham dentro e fora da colméia.

7. Referências Bibliográficas

- COSTA R.C. e CRUZ-LANDIM C. (1999) Occurrence and morphometry of the hypopharyngeal glands in *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Journal of Biosciences, Bangalore, **24**, p.101-06.
- CRAILSHEIM K.e STOLBERG E. (1989) Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybees (*Apis mellifera* L.). Journal of . Insect Physiology, **35**, p. 595-602.
- CRUZ-LANDIM, C. (1992) Glândulas exócrinas presentes nos adultos das abelhas sociais. Naturalia, São Paulo, n. esp., p. 79-84, 1992. (Trabalho apresentado no Encontro Brasileiro de Biologia de Abelhas e Outros Insetos Sociais em Rio Claro).
- CRUZ-LANDIM C. e COSTA R.A.C. (1998) Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. Journal of Comparative Biology, Ribeirão Preto, **3**, p.151-63.
- DREISCHER H. (1956) Untersuchungen ‘uber die Arbeitst’atigkeit und Dr’usenentwicklung altersbestimmter Bienen im weisellosen Volk. Zoologisches Jahrbuchi, **66**, p.429-72.
- FREE J.B. (1980) Organização social das abelhas (Apis) Editora Pedagógica e Universitária Ltda. EDUSP. p.79.
- HRASSNINGG N. e CRAILSHEIM K. (1998) Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honey (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of Physiology, **44**, p.929-39.
- HUANG Z.Y., OTIS G.W., TEAL P.E.A. (1989) Nature of broad signal activity the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honeybee *Apis mellifera* (Apidae:Hymenoptera). Apidologie, **20**, 455-64.
- KRATKY E. (1931) Morphologie und physiologie der drusen in kopf und thorax der honigbiene (*Apis mellifera* L.) Zeitschrifft fur Vergleichende Physiologie, **139**, p. 120-200.
- LINDAUER M. (1952) Ein beitraf zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat. Zeitschrift fur Vergleichende Physiologiem, **34**, p. 299-345.

- MAURIZIO A. (1957) Break down of sugar by inverting enzymes in the pharyngeal glands and midgut of honeybees. *Bee World*, **40**, p. 275-83.
- MORIZ B. e CRAILSHEIM K. (1987) Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee *Apis mellifera* L. *Journal of Insect Physiology*, **33**, p.923-931.
- PATEL N.G., HADAYDAK M.H., GOCHNAUER, T.A. (1964) Eletrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature*, **186**, p. 633-634.
- ROCHA H. C. (1999) Curva de crescimento de operárias e relações protéicas em abelhas *Apis mellifera* L. submetidas à produção de geléia real. 1999. 56p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Botucatu, SP.
- SAS User's procedures guide. Version 6. 4ed. Vol.1-2, Cary, NC:SAS Institute, Inc, 1999. 1686p.
- SILVA DE MORAES R.L.M., CARMELLO K.A., FEDDERSEN Jr.A.. (1985) Estudo citofotométrico das glândulas hipofaríngeas de operárias de *Scaptotrigona postica* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia*, **9**, p. 147-55.
- SIMPSON J., RIEDEL I.B.M., WILDING N. (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, **7**, n. 1, p. 29-36.
- TAKENAKA T. e KAATZ H.H. (1987) Protein synthesis by hypopharyngeal glands of worker honey bees. In: EDER J.; Rembold, H. (Eds). *Chemistry and biology of social insects*. Munich: Verlag j. Peperny,. p. 166-67.
- TAKENAKA T., MIWA S., ECHIGO T. (1990a) Changes of protein content and enzyme activity in hypopharyngeal glands during lifespan of honeybees workers (*Apis mellifera* L.). *Bulletin of Faculty of Agriculture/ Tamagawa University, Tokiyo*, n.30, p.1-8.
- TAKENAKA T., ITO H., YASUNAMI K., ECHIGO T. (1990b) Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands during lifespan of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo*, **54**, n.8, p.2133-2134.
- WHITE JR. W., SUBERS M. H., SCHEPARTZ A. I. (1963) Identification of inhibine, the antibacterial factor in honey glucose oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, **73**, p. 57-70.

ATIVIDADE DA ENZIMA INVERTASE DAS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS EM ABELHAS *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADAS)

1. Resumo

As enzimas estão entre os componentes mais interessantes e importantes do mel, não porque elas tenham importância nutricional na dieta humana, mas porque elas apresentam um papel vital na produção do mel. A conversão do néctar em mel é alcançada pela ação de certas enzimas das glândulas hipofaringeanas das abelhas, tal como a invertase que promove a inversão da sacarose do néctar em frutose e glicose. Desta forma, o objetivo foi estudar a atividade da enzima invertase nas diferentes idades e tipos de glândulas hipofaringeanas de abelhas africanizadas. O método utilizado para a dosagem enzimática foi o do ácido 3-5´dinitrosalicílico (DNS). De acordo com os resultados, concluiu-se que a atividade enzimática da invertase aumenta com a idade da abelha, atingindo um pico máximo de atividade entre 20 a 27 dias de idade, declinando em seguida; a porcentagem dos tipos de glândulas hipofaringeanas varia de acordo com a idade das abelhas operárias; e os tipos de glândulas hipofaringeanas apresentam diferenças na atividade enzimática, dependente da idade da abelha operária.

Palavras-chaves: enzima, invertase, abelhas africanizadas, glândulas hipofaringeanas

INVERTASE ENZYME ACTIVITY IN HYPOPHARYNGEAL GLANDS IN BEES
***Apis mellifera* L. (AFRICANIZED)**

2. Abstract

The enzymes are among the most important and interesting components of honey, not because they have nutritional importance in the human diet, but because they present a vital role in the production of honey. The conversion of nectar in honey is gotten by the action of some enzymes of the bees' hypopharyngeal glands, such as invertase that promotes the inversion of nectar saccharose in fructose and glucose. At this way, the aim of this work had been to study the invertase enzyme activity at different ages and types of africanized bees' hypopharyngeal glands. The method used for the enzymatic dosage had been the 3-5' dinitrosalisilic acid and, for the determination of the glands types, the measure of the diameter of acinars by stereoscopic microscope. According to the results, it had been concluded that the invertase enzymatic activity increases with the bee age, getting a maximum peak of activity between 20 and 27 days of age, declining after that; the hypopharyngeal glands types percentage varies according to the worker bees age; and the hypopharyngeal glands types present differences in the enzymatic activity, dependent on the worker bee age.

Key words: enzyme, invertase, africanized bees, hypopharyngeal glands

3. Introdução

Em *Apis mellifera* L., as glândulas hipofaringeas das operárias nutrízes produzem a maior parte dos constituintes da geléia real, principalmente os de natureza protéica (Patel *et al.*, 1964; Takenaka e Kaatz, 1987). Diferenças entre os tipos anatômicos das glândulas estão relacionadas com o local onde os canalículos provenientes da unidade secretora desembocam, distinguindo-se desta forma quatro tipos principais (Cruz-Landim e Costa, 1998). Além da produção de alimento larval, essas glândulas também produzem enzimas necessárias ao metabolismo da abelha, tais como as sacarases ou invertases (Kratky, 1931; Maurizio, 1957; Simpson *et al.*, 1968), as amilases nas operárias coletoras (Takenaka *et al.*, 1990a), as α -glicosidases (Takenaka *et al.*, 1990a) e as glicose-oxidades nas operárias nutrízes (White Jr. *et al.*, 1963; Simpson *et al.*, 1968; Takenaka *et al.*, 1990 a,b).

As enzimas estão entre os componentes mais interessantes e importantes do mel porque têm um papel vital em sua produção. A conversão do néctar em mel é alcançada pela ação de certas enzimas das glândulas hipofaringeas das abelhas. A invertase é a enzima responsável pela hidrólise da sacarose, um dissacarídeo que consiste de uma molécula de glicose e uma de frutose, unidos por ligação glicosídica. A hidrólise desta ligação produz uma solução equimolar de monossacarídeos. A quantidade de enzimas nas abelhas depende da idade (Browsers, 1982), do estado da colônia (Huang *et al.*, 1989), do fluxo de néctar, das condições ambientais (White Jr., 1975) e das condições da prática de manejo apícola (Laude *et al.*, 1991).

Simpson *et al.* (1968), analisando a produção de invertase em abelhas *Apis mellifera* em colméias de observação com rainhas engaioladas, encontraram abelhas com cinco dias de idade que não apresentaram invertase e abelhas com 20 dias que tinham grande quantidade da mesma.

Browsers (1982) encontrou que a síntese de proteínas aumenta na primavera quando se inicia a criação de larvas, mas não encontrou nenhuma correlação entre a taxa de síntese protéica e o tamanho dos ácinos nas glândulas hipofaringeas.

White Jr. *et al.* (1963) demonstraram que a invertase é melhor que a diastase para demonstrar qualidade do mel, uma vez que possui maior sensibilidade ao aquecimento e, Dustmann (1993) afirmou que a invertase, em combinação com outros critérios analíticos, é

capaz de detectar os danos causados na qualidade do mel pelo aquecimento ou estocagem durante um longo período de tempo.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram determinar:

- A atividade enzimática da invertase das glândulas hipofaringeanas em abelhas operárias com idade entre 4 a 35 dias.
- A atividade enzimática da invertase de diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas.
- A porcentagem dos diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas, de acordo com a idade das abelhas operárias.

4. Material e métodos

4.1. Colônias utilizadas

Quadros de cria operculada foram retirados de colméias populosas de abelhas africanizadas e transferidos para estufas com temperatura controlada (34°C), para a emergência das abelhas. Em seguida, as abelhas foram marcadas no tórax com tinta atóxica, sendo cada dia uma cor diferente para identificação de sua idade. Essas abelhas foram então introduzidas em quatro colméias experimentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, contendo cinco quadros.

4.2. Metodologia de análise

4.2.1. Elaboração da curva de referência para determinação de açúcares redutores

Para análise da atividade da enzima invertase foi necessária a determinação da curva de referência da glicose (determinação do coeficiente de extinção molar,) conforme metodologia de Miller (1959), citado por Villela *et al.* (1973).

Em diferentes tubos de ensaio foram colocados 0,1; 0,15; 0,20; 0,30; 0,40 e 0,50mL de glicose, completando-se o volume para 0,5mL com água destilada. Adicionou-se, em seguida, 0,5mL de ácido 3-5'dinitrosalicílico (DNS) em cada tubo. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 5 minutos, sendo em seguida resfriados e adicionados 5 mL de água destilada em cada tubo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em λ igual a 540nm. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\epsilon = [A_2 - A_1] / [C_2 - C_1], \text{ onde:}$$

ϵ = coeficiente de extinção molar ($\mu\text{mol}/0,5\text{mL}$)

A = absorbância

C = concentração de glicose

4.2.2. Atividade enzimática da invertase das glândulas hipofaringeanas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$), em abelhas operárias com idades entre 4 a 35 dias

Foram amostradas 30 abelhas distribuídas em três grupos (repetições) de 10 abelhas cada uma (20 glândulas sem separação do tipo de glândula). Em seguida foram colocadas em *ependorf* contendo 0,5 mL de solução tampão acetato de sódio em pH 5,0. Essas glândulas foram maceradas antes da determinação da atividade da invertase. A coleta das amostras foi realizada diariamente, até completar 35 dias de idade.

A dosagem da enzima está baseada no fato de que a invertase, por sua ação de β -fructofuranosidase, catalisa a quebra da molécula da sacarose em α -glicose e β -frutose. Ambas hexoses estão combinadas pelo grupo redutor respectivo, mas a sacarose não possui propriedades redutoras. Por esta razão, é possível medir a ação da invertase determinando-se a formação de açúcar redutor. Assim, a sua atividade foi determinada conforme metodologia de Miller (1959), citado por Villela *et al.* (1973), com medida de leitura espectrofotométrica em absorbância da glicose e frutose em λ igual a 540nm. No caso de métodos baseados na oxidação ou na redução, cuja medida é espectrofotométrica, a unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de produzir $1\mu\text{mol}/0,5\text{mL}$ de açúcares redutores em 1 minuto de reação.

Foram colocados 5mL de sacarose a 1% em solução tampão acetato de sódio em 0,5mL de amostra extraída das glândulas hipofaringeanas maceradas de 10 abelhas. Nos momentos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos retirou-se uma amostra de 0,5mL e parou-se a reação com 0,5mL de DNS. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por cinco minutos, sendo em seguida resfriados e adicionados 5mL de água destilada em cada tubo. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro em λ igual a 540nm.

Cada ensaio enzimático foi constituído de 5mL de sacarose com solução tampão + 0,5mL de solução tampão com 20 glândulas (10 abelhas) = 5,5mL = volume total (vt), sendo os cálculos descritos abaixo:

$$\Sigma \text{ Absorbância} / \Sigma \text{ tempo} = A/\text{min} / \varepsilon = \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{vt} / 0,5\text{mL} (\text{volume da solução tampão com as glândulas}) = \mu\text{mol}/\text{ml} / \text{min}$$

$$\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{vt} / 10 (\text{número de abelhas}) = \mu\text{mol}/\text{abelha}/\text{min}.$$

4.2.3. Porcentagem dos diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas de acordo com a idade das abelhas operárias de *Apis mellifera* L. (Africanizadas).

Foram realizadas coletas diárias de 30 abelhas (10 abelhas por repetição), onde cada amostra estava composta de 20 glândulas hipofaringeanas de abelhas com idade de 4 a 35 dias. Essas glândulas foram separadas em quatro tipos (G1, G2, G3 e G4), segundo seu formato e através do volume médio dos ácinos (mm^3), com o auxílio de microscópio estereoscópio, como mostra a Foto 1. A classificação dos tipos de glândulas hipofaringeanas foi: G1: $0,0029. \text{mm}^3$; G2: $0,0045 \text{mm}^3$; G3: $0,0013 \text{mm}^3$ e G4: $0,0021 \text{mm}^3$. Diariamente foram estabelecidas as porcentagens dos diferentes tipos.



Foto 1. Tipos de glândula hipofaringeana em abelhas de 15 dias de idade (G1, G2, G3 e G4) fotografadas no foco 1,25 (1 mm de régua na fotografia é igual a 1,5 cm no foco 1,25).

4.2.4. Atividade enzimática da invertase em diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas

Para a determinação da atividade enzimática dos diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas foram coletadas abelhas com 8, 9, 15, 16, 22, 26, 29 e 34 dias de idade, que correspondem aos grupos de idades: 8 e 9 (grupo 4-11 dias), 15 e 16 (grupo 12-19 dias), 22 e 26 (grupo 20-27 dias) e as idades 29 e 34 (grupo 28-35 dias); para análise, avaliando-se três repetições de cada tipo de glândula.

Cada amostra dos diversos tipos de glândula (G1, G2, G3 e G4) foi constituída de 20 glândulas separadas em tubos diferentes por tipologia. A enzima foi dosada de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.2.

4.3. Análise estatística

Para determinar a atividade enzimática da invertase das glândulas hipofaringeanas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$) em abelhas operárias com idades entre 4 a 35 dias, os dados foram submetidos à análise de variância pelo método dos quadrados mínimos, tendo como causa de variação os grupos de idades ($i = 4$ a 11, 12 a 19, 20 a 27 e 28 a 35 dias).

Para a porcentagem dos diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas, de acordo com a idade das abelhas operárias, os dados foram analisados pela análise de variância, tendo como causa de variação os quatro grupos de idades (4 a 11, 12 a 19, 20 a 27 e 28 a 35) e quatro tipos de glândulas (G1, G2, G3 e G4).

Para determinar a atividade enzimática da invertase em diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas, os dados foram submetidos à análise de variância pelo método dos quadrados mínimos, tendo como causa de variação os quatro tipos de glândulas (G1, G2, G3 e G4).

As análises foram efetuadas utilizando-se o procedimento GLM descrito no SAS (1999) e as diferenças entre as médias foram submetidas ao teste de Tukey, com 5% de significância.

5. Resultados e discussão

5.1. Curva de referência para determinação de açúcares redutores

A curva de referência, para determinação dos açúcares redutores da enzima invertase, é mostrada na Figura 1.

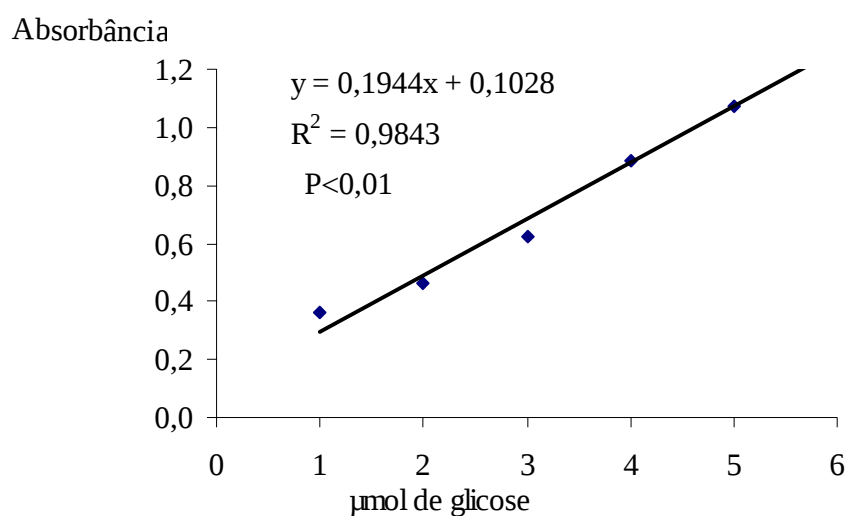


Figura 1. Curva de referência da glicose para a determinação da atividade da invertase

O coeficiente de extinção molar (ϵ) da glicose foi de $0,1944A_{540nm}$, com um coeficiente de determinação de $R^2 = 98,43\%$, mostrando assim a precisão do método.

5.2. Atividade enzimática da invertase das glândulas hipofaringeanas, em abelhas com idades entre 4 e 35 dias.

As abelhas africanizadas foram divididas em quatro grupos: de 4 a 11 dias, de 12 a 19 dias, de 20 a 27 dias e de 28 a 35 dias. A atividade da invertase, do 4º ao 35º dia de idade apresentou valor médio de $0,0178 \pm 0,004$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$ e coeficiente de variação de 65,57% (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e desvio padrão da atividade da enzima invertase em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$, nos diferentes grupos de idade.

Grupo de idade	Média $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$
4 a 11	0,011 $\pm$ 0,0078 B
12 a 19	0,020 $\pm$ 0,0046 AB
20 a 27	0,022 $\pm$ 0,0098 A
28 a 35	0,018 $\pm$ 0,0150 AB
Média	0,0178 $\pm$ 0,004

Letras diferentes, na coluna, diferem entre si no teste Tukey , com 5% de significância

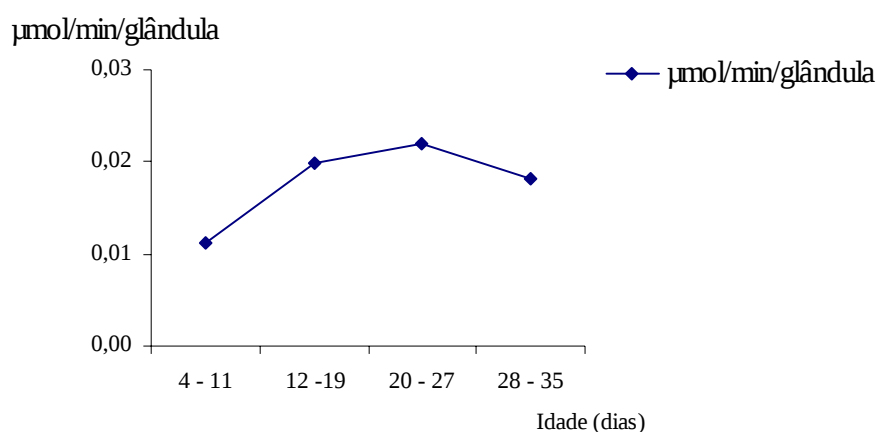


Figura 2. Atividade da enzima invertase, em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$, em solução tampão acetato de sódio a pH 5 e nos diferentes grupos de idade.

A atividade da invertase da glândula hipofaríngea diferiu significativamente apenas entre o grupo de 4 a 11 dias e o grupo de 20 a 27 dias (Tabela 1 e Figura 2).

A enzima invertase apresenta menor atividade nos primeiros dias de vida das abelhas, aumentando progressivamente e atingindo sua máxima atividade entre 20 - 27 dias de idade, quando as abelhas começam a coletar alimento no ambiente. Na faixa etária dos 28-35 dias, a atividade da enzima começa a diminuir (Tabela 1 e Figura 2).

Resultados similares foram encontrados por Simpsom *et al.* (1968), os quais observaram que abelhas muito novas, com até cinco dias de idade, tinham pouco ou

nenhuma enzima ativa e, que abelhas com 20 dias de idade, no começo da atividade de coleta, produziam grandes quantidades de invertase.

5.3. Porcentagem dos diferentes tipos de glândulas hipofaríngeas, de acordo com a idade das abelhas operárias

As porcentagens médias dos diferentes tipos de glândulas hipofaríngeas (G1, G2, G3 e G4), de abelhas com idade entre 4 e 35 dias encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem média dos diferentes tipos de glândulas hipofaríngeas (G1, G2, G3 e G4) de operárias de 4 a 35 dias

Tipo de Glândula	Porcentagem (%)				Média
	4 a 11 dias	12 a 19 dias	20 a 27 dias	28 a 35 dias	
G1	68,33±8,73a	29,38±11,23c	34,17±15,84b	27,71±12,73c	39,9A
G2	24,38±8,40b	39,17±13,08a	22,50±17,59b	19,79±15,02c	26,6 B
G3	6,88±4,58d	23,54±8,19c	30,83±12,82b	32,50±13,74a	23,6 B
G4	0,00±0,00	7,50±9,00c	12,08±13,24b	19,38±9,38a	09,9 C

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey, com 5% de significância. Letras minúsculas diferentes, na linha, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

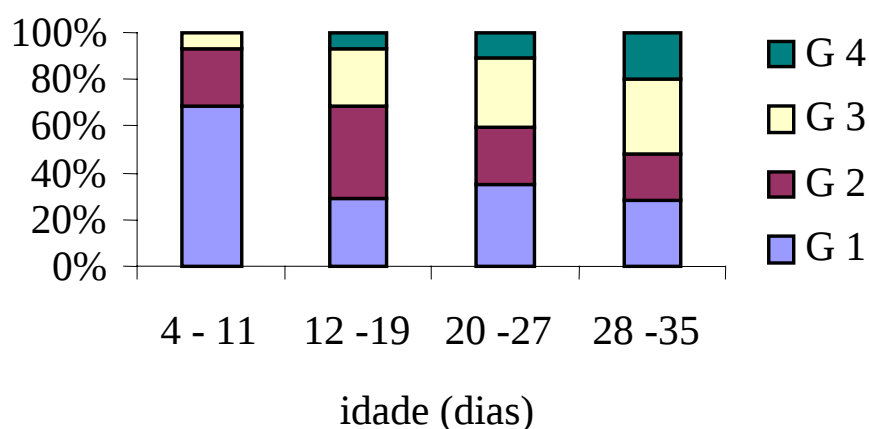


Figura 3. Porcentagem dos tipos de glândulas hipofaríngeas (G1, G2, G3 e G4) nos diferentes grupos de idades.

Na análise dos resultados dos diferentes tipos de glândulas verificou-se que o tipo G1 foi o mais freqüente (39,9%), diferindo significativamente dos tipos G2, G3 e G4. O tipo G2 (26,6%) não diferiu do tipo G3 (23,6%), sendo que ambos foram estatisticamente diferentes do tipo G4 (9,9%). Os tipos de glândulas G1, G2 e G3 foram encontrados em todos os grupos de idade analisados, mas o tipo G4 foi encontrado a partir do 15º dia, sendo o menos freqüente (9,9%) (Tabela 2 e Figura 3).

Quanto às porcentagens dos diferentes tipos de glândulas nos quatro grupos de idade (Tabela 2), verificou-se que o tipo de glândula G1 apresentou a maior porcentagem no período de 4 a 11 dias ($68,33 \pm 8,73\%$), diferindo significativamente dos outros grupos de idade. O tipo G2 apresentou a maior porcentagem no grupo de idade de 12 a 19 dias ($39,17 \pm 13,08\%$), diferindo significativamente dos demais. A porcentagem de glândulas do tipo G3 aumentou gradativamente e de modo significativo, do 1º ao 4º grupo, apresentando sua maior porcentagem ($32,50 \pm 13,74\%$) no período de 28 a 35 dias de idade.

As glândulas do tipo G4 estiveram ausentes no grupo de 4 a 11 dias de idade e cresceu significativamente. A partir daí, atingiu a freqüência máxima ($19,38 \pm 9,38\%$) no 4º período (28 -35) (Tabela 2).

Segundo Free (1980), o estado de desenvolvimento das glândulas de uma abelha pode influenciar de maneira significativa em sua atividade, bem como a atividade pode

influenciar o desenvolvimento glandular. Isto corrobora com os resultados observados, onde se encontrou glândulas com diferentes graus de desenvolvimento em abelhas de mesma idade.

5.4. Atividade da enzima invertase em diferentes tipos de glândulas hipofaringeanas

A atividade enzimática foi determinada de acordo com os tipos de glândulas (G1, G2, G3 e G4) e encontra-se na Tabela 3 e na Figura 4.

Tabela 3. Valores médios da atividade da invertase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$) nos diferentes grupos de idades e tipos de glândulas

	G1	G2	G3	G4
8 e 9	0,0337 $\pm$ 0,0102 B	0,0233 $\pm$ 0,0088 B	0,0148 $\pm$ 0,0019 A	-
15 e 16	0,0409 $\pm$ 0,0028 A	0,0251 $\pm$ 0,0051 B	0,0178 $\pm$ 0,007 A	0,0018 $\pm$ 0,0006 B
22 e 26	0,0424 $\pm$ 0,0043 A	0,0203 $\pm$ 0,0043 B	0,0183 $\pm$ 0,001 A	0,0010 $\pm$ 0,0000 B
29 e 34	0,0240 $\pm$ 0,0057 C	0,0325 $\pm$ 0,0057 A	0,0156 $\pm$ 0,0087 A	0,0400 $\pm$ 0,0054 A
Média	0,0353 $\pm$ 0,0073 A	0,0253 $\pm$ 0,0017 AB	0,0166 $\pm$ 0,0034 BC	0,0143 $\pm$ 0,0024C

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

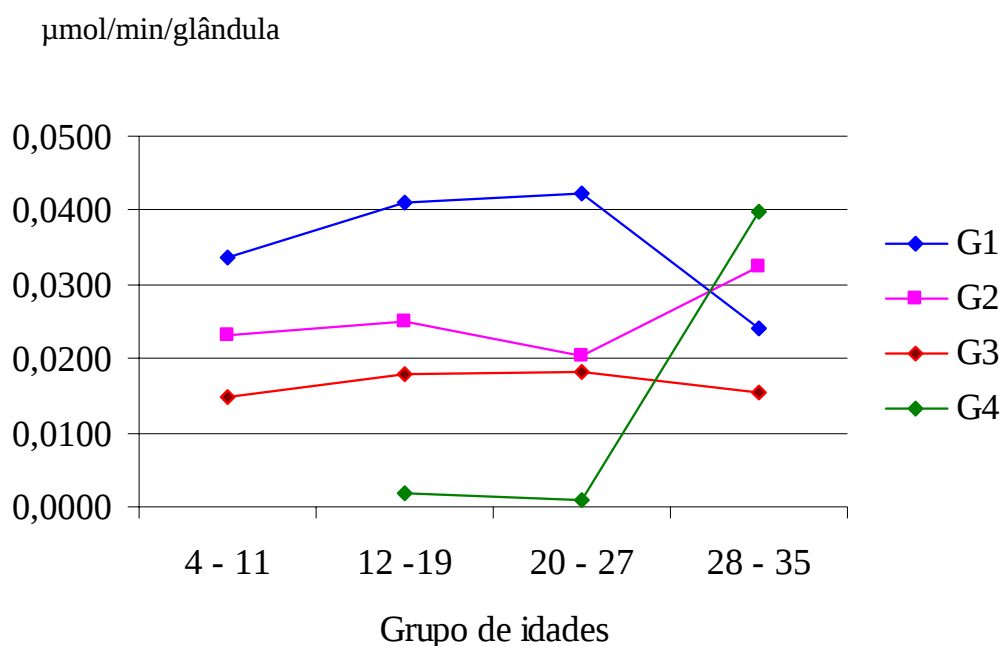


Figura 4. Valores médios da atividade da invertase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$) nos diferentes grupos de idades e tipos de glândulas.

Quanto à atividade dos tipos de glândula que invertem a sacarose em glicose e frutose, nos diferentes grupos de idade das abelhas verificou-se que a abelha portadora da glândula do tipo G1, apresentou maior atividade enzimática na idade entre 12 – 19 e 20 -27 dias. As glândulas do tipo G2 tiveram as atividades enzimáticas maior no grupo de idade de 28 a 35 dias. Já as abelhas portadoras de glândula do tipo G3, apresentaram a atividade enzimática com mesma intensidade em todos os grupos e, finalmente na análise da glândula do tipo G4 verificou-se que estas estiveram ausentes nas abelhas de 4 a 11 dias de idade e só apareceram no grupo seguinte com pouca atividade. Constatou-se ainda que essas se assemelharam na atividade das glândulas do tipo G1 no grupo de idade de 28 -35 dias como mostra a Figura 4. Estes resultados estão de acordo com os de Huang *et al.*, (1994) onde mostrou que o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas nas abelhas operárias é flexível, pois operárias com mesma idade desempenham tarefas diferentes dentro das colônias podendo mostrar desenvolvimento diferente das glândulas.

Com relação aos valores médios de atividade da invertase, para as idades estudadas, observou-se que o tipo G1 apresentou maior atividade enzimática, diferindo

estatisticamente dos tipos G3 e G4. No entanto, a glândula do tipo G4 foi a que apresentou menor atividade (Tabela 3 e Figura 5).

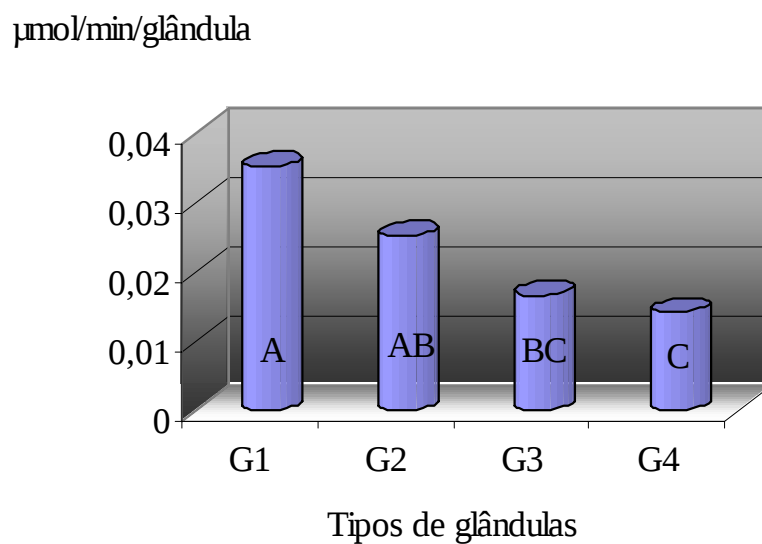


Figura 5. Valores médios da atividade da enzima $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{glândula}$ segundo o tipo de glândula.

[Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância]

6. Conclusões

Diante dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- A atividade enzimática da invertase aumenta com a idade da abelha, atingindo um pico máximo de atividade entre 20 a 27 dias de idade, declinando em seguida.
- A porcentagem dos tipos de glândulas hipofaríngeas varia de acordo com a idade das abelhas operárias.
- Os tipos de glândulas hipofaríngeas apresentam diferentes atividades enzimáticas, dependendo da idade da abelha operária.

7. Referências Bibliográficas

- BROWERS E.V.M. (1982) Measurement of hypopharygeal gland activity in the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, **21**, 193-198.
- CRUZ-LANDIM C. and COSTA R.A.C. (1998) Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. *Journal of Comparative Biology*, Ribeirão Preto, **3**, p.151-63.
- DUSTMANN J.H. (1993) Honey quality and its control. *American Bee Journal*, **133**, 648-51.
- FREE J.B. (1980) Organização social das abelhas (Apis) Editora Pedagógica e Universitária Ltda. EDUSP. p.79.
- HUANG Z.Y., OTIS G.W., TEAL P.E.A. (1989) Nature of broad signal activity the protein synthesis of hypopharygeal gland in honeybee *Apis mellifera* (Apidae:Hymenoptera), *Apidologie*, **20**, 455-64.
- KRATKY E. (1931) Morphologie und physiologie der drusen in kopf und thorax der honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zeitschrift fur Vergleichende Physiologie*, **139**, 120-200.
- LAUDE V.T., NAEGEL L., HORN H. (1991) Die physiko-chemischen Eigenschaften Philippinischer Honige. *Apidologie*, **22**, 371-80.
- MAURIZIO A. (1957) Break down of sugar by inverting enzymes in the pharyngeal glands and midgut of honeybees. *Bee World*, **40**, 275-83.
- MICHENER C.D. (1974) The social behavior of the bees. Cambridge: Harvard University, 189p.
- PATEL N.G., HADAYDAK M.H., GOCHNAUER T.A. (1964) Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature*, **186**, p.633-4.
- SAS User's procedures guide. Version 6. 4ed. Vol.1-2, Cary, NC:SAS Institute, Inc, 1999. 1686p.
- SIMPSON J., RIEDEL I.B.M., WILDING N. (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, **7**, 29-36.
- TAKENAKA T., ITO H., YATSUNAMI K., ECHIGO T. (1990b) Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands

- during lifespan of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). Agricultural and Biological Chemistry, **54**, 2133-4.
- TAKENAKA T. and KAATZ H.H. (1987) Protein synthesis by hypopharyngeal glands of worker honey bees. In: EDER J.; Rembold, H. (Eds). Chemistry and biology of social insects. Munchern: Verlag j. Peperny,.p. 166-7.
- TAKENAKA T., MIWA S., ECHIGO T. (1990a) Changes of protein content and enzyme activity in hypopharyngel glands during lifespan of honeybees workers (*Apis mellifera* L.). Bulletin of the Faculty of Agriculture Tamagawa University, **30**, 1-8.
- TAKENAKA T., ITO H., YASUNAMI K., ECHIGO T. (1990b) Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands during lifespan of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, **54**, n.8, p.2133-2134.
- VILLELA G.G., BACILA, M. TASTALDI H. (1973) Técnicas e Experimentos de Bioquímica. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. 398p.
- WHITE JR W. (1975) *Composition of honey*. In: Honey: a comprehensive survey. E. Crane, London: Heinemann ed., p.1157-206.
- WHITE JR W., SUBERS M.H., SCHEPARTZ A.I. (1963) Identification of inhibine, the antibacterial fator in honey glucose oxidase system. Biochimica et Biophysica Acta, **73**, 57-70.

IMPLICAÇÕES

As técnicas laboratoriais evoluíram no sentido de não só oferecer maior segurança como maior precisão na análise de qualidade do produto. Assim, utilizamos a técnica dos isótopos estáveis de Carbono -13 e Nitrogênio -15 para o estudo da qualidade dos méis de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas), produto de extrema importância na alimentação humana e de alto valor econômico. A utilização do $\delta^{0/00}_{13}\text{C}$ permite monitorar o mel com pequenas contaminações de subproduto das plantas do Ciclo Fotossintético C_4 , contribuindo no controle da qualidade de méis comercializados no Brasil e para a exportação. A técnica de $\delta^{0/00}_{15}\text{N}$ permite não só identificar a procedência geográfica do mel de alguns estados do país (Bahia e Pernambuco), como também a florada (méis uniflorais), constituindo-se assim em um importante passo no uso da tecnologia em prol da apicultura.

Em relação à enzima invertase, contribuiu-se no conhecimento da mesma, entendendo-se melhor sua função e desenvolvimento.