

ESTUDO QUÍMICO DO MEL DAS ESPÉCIES *Melipona seminigra merrillae* E *Melipona interrupta* DO AMAZONAS-AM

Pierre André De Souza¹., Mikail Q. da Silva²., Luciano V. Gonzaga³.

^{1,2}Universidade Federal do Amazonas-Ufam-ICET, Rua Nossa Senhora do Rosário 1951,691000-000, Itacoatiária-AM.

³Universidade Federal de Santa Catarina -UFSC. Rod. Admar Gonzaga, 1346-Itacorubi,88034-000 Florianópolis-SC.

Palavras-Chave: Meliponicultores, Microscopia Eletrônica de Varredura, Compostos voláteis.

Introdução

O mel, como produto natural proveniente das diversas espécies de abelhas formadoras de colônias, a partir de exsudatos contendo carboidratos e proteínas produzidos pelas plantas, é amplamente consumido em todo o mundo. Uma prática que remonta há milênios, registrada nas inscrições rupestres pelo homem do paleolítico. Além desses componentes, que agregam valor nutricional ao mel, há ainda outros compostos imprescindíveis que tornam particulares as características físico-químicas e químicas desse insumo, conforme a espécie de abelha e região. Dentre a gama de compostos, destacam-se as vitaminas, os minerais, as enzimas, os aminoácidos livres e as numerosas substâncias voláteis e semivoláteis. As abelhas do gênero *Apis*, especificamente das espécies *Apis mellifera*, de origem europeia e asiática, são as principais produtoras de méis, devido à domesticação desse gênero ser remota e com alta produtividade, por isso, algo muito lucrativo (VILLAS-BOAS.,2012; MICHENER et al., 2013).

No entanto, em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como as Américas Central e do Sul, a Austrália, a África e o Sudeste Asiático, existem outras espécies, mais numerosas, da família *Apidae*, pertencentes aos gêneros da tribo *Meliponinae*. Essas abelhas, formadoras de colônias, constituem um grupo em torno de 400 espécies catalogadas. Não apresentam glândulas de veneno e seu ferrão é atrofiado, resultando na sinonímia de “abelhas sem ferrão”, ou ainda, de “abelhas nativas” (KERATALGIAS et al., 2014; CARVALHO-ZILSE et al., 2011., 2013).

Os gêneros neotropicais que apresentam um número maior de espécies catalogadas são o gênero das *Meliponas* (65 espécies), precedidos da *Plebeia* (30 espécies). Além de produzirem méis com excelente qualidade e altamente apreciados pelos seus sabores distintos, e comumente usados para fins medicinais, essas abelhas também oferecem benefícios ecológicos. Conforme o local onde vive, a abelha sem ferrão é responsável por 40 % a 90 % da polinização das árvores nativas. Por isso, exercem uma função destacada na formação e manutenção das florestas, contribuindo também para manter a biodiversidade de plantas e animais que vivem na várzea. No Brasil foram catalogadas 192 espécies de abelhas sem ferrão, aproximadamente. A Amazônia brasileira é o bioma onde se encontra a maior diversidade dessas espécies. Destacam-se, nessa biodiversidade, as espécies *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta*, por serem as principais espécies manejadas pela meliponicultura e por estarem profundamente arraigadas à cultura local nos estados do Amazonas e Pará. Ambas atendem, respectivamente, pelas sinonímias de jandaíra-da-amazônia ou urucu-boca-de-renda e de jandaíra-preta-da-Amazônia ou jupará (CARVALHO-ZILSE et al., 2011., 2013; CARVALHO et al., 2005).

Além de estudos envolvendo as propriedades físico-químicas, químicas, palinológicas e medicinais do mel como forma de caracterizá-lo, relacionando-o à espécie e à região, outro fator relevante é o estudo de seus compostos voláteis.

A análise dos açúcares relacionada a paninologia como fonte de proteína e energia obtida das flores selecionadas pelas melíponas, bem como de seus compostos voláteis, na produção de mel podem ser alternativas para sua tipificação, utilizados como marcadores químicos específicos, e que fornecem informações relevantes para a promoção desse produto no mercado, agregando valor econômico, convertido em renda familiar para os meliponicultores de todo o Brasil (KERATALGIAS et al., 2014; CARVALHO-ZILSE et al., 2011., 2013).

São poucos os estudos desenvolvidos sobre a composição química, as atividades biológicas, as características físico-químicas, a palinologia e os compostos voláteis de méis de abelhas sem ferrão no Brasil. Paradoxalmente, na região norte, em específico, a floresta amazônica, por apresentar a maior biodiversidade dessas espécies no país e no mundo, seus estudos são ainda mais raros. O que torna justificável todo e qualquer esforço quanto a contribuição da pesquisa científica que possa agregar valor ao estudo das melíponas em território nacional, além dos aspectos econômicos gerando renda a família do campo, os aspectos ecológicos e ambientais na preservação da floresta amazônica e de seu rico bioma (CARVALHO-ZILSE et al., 2011; CARVALHO et al., 2005).

O objetivo desta pesquisa foi o de contribuir com a ampliação do conhecimento sobre os meliponíneos no norte do Brasil, ao determinar algumas características químicas de compostos voláteis de méis de duas espécies, *M. seminigra merrillae* e *M. Interrupta*, de produtores rurais da Mesorregião do Centro do Amazonas-AM. Imagens de ambas as espécies foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como contribuição ao acervo de imagens da microanatomia ultraestrutural de suas morfologias.

Material e Métodos

As amostras de méis foram coletadas no período de maior produção, segundo os meliponicultores locais (agosto e setembro, período de precipitação pluviométrica mais baixa, característica do período de seca – conhecido como o verão amazônico – de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia-INMET). As coletas foram realizadas nos meliponários de dois municípios localizados na mesorregião central do Amazonas, Itacoatiara, precisamente na comunidade São João do Araçá, rio Arari no estado do Amazonas.

As espécies de abelhas foram fixadas com cola prata, na superfície de fita dupla face aderida em suportes metálicos de 120 mm de diâmetro, e deixadas em estufa a vácuo por 24 horas para a análise ultraestrutural. As amostras foram metalizadas com ouro por 120 segundos em recobridora da marca LEICA Modelo EM SCD 500. Em seguida, acondicionadas em estufa a vácuo até o momento da análise de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), modelo JEOL JSM-6390LV. As espécies de meliponas foram obtidas por doação pela UFSC para a realização dos experimentos. As imagens foram fotografadas com filme Neopan SS 120 Fugi, e/ou capturadas digitalmente, utilizando-se o programa DIT (*Digital Image Transfer*) para um computador compatível IBM-PC, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, e processadas, posteriormente, com o programa CorelDRAW *Graphics Suite X8*.

Para a obtenção do aroma, 10 gramas do mel de cada uma das espécies de melíponas, de seus locais de coleta, foram destilados utilizando um microssistema de hidrodestilação-extração simultânea por “headspace” não dinâmico (fase gasosa, imediatamente acima da fase sólida ou líquida, armazenada em recipiente hermeticamente fechado não acoplado diretamente ao CG-MS). Utilizou-se um extrator tipo Likens-Nickerson, *n*-pentano como solvente (4 mL) carreador, acoplado a um sistema de refrigeração para manutenção da água de condensação entre 5-10 °C, durante 2 horas. A análise do aroma do mel foi realizada em um sistema GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation) equipado por um cromatógrafo gasoso, espectrômetro de massa, autoinjeter AOC-20i, com detector de ionização em chamas (DIC) e *software* GC-Msolution, que inclui um banco de dados das bibliotecas *NIST* e *ADAMS*. Os espectros de massa foram obtidos por varredura automática a 0,3 s, com fragmentos de massas na faixa de 35-400 *m/z*. O índice de retenção linear (índice de Kovats) foi calculado em relação aos tempos de retenção para todos os componentes voláteis, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (IK) C₈-C₄₀ (Sigma-Aldrich), de acordo com a equação linear de Van den Dool e Kratz. (KERATALGIAS et al., 2014; CARVALHO-ZILSE et al., 2011., 2013). Os compostos existentes nos cromatogramas foram identificados através da comparação de seus espectros de massas (a massa molecular e o padrão de fragmentação) com os espectros existentes na espectroteca do sistema e na literatura, no laboratório do Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA, sob a supervisão e análise da professora Dra. Rosa Mourão.

Resultados e Discussão

As imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura foram obtidas apenas para as melíponas operárias. As Figuras 1 e 2 mostram a morfologia das antenas de ambas as espécies, *M. seminigra merrillae* e *M. Interrupta*, um padrão análogo a outros insetos himenópteros possuidores de escapo, flagelo e pedicelo. As operárias apresentam um dimorfismo sexual de dez flagelômeros, conforme consta nas abelhas com ferrão *Apis mellifera* e *M. quadrifasciata*.

As sensilas cétricas, responsáveis pelo estímulo em reconhecer indivíduos invasores do ninho, estão presentes em todos os seguimentos antenais nas duas espécies como importantes unidades sensoriais que se assemelham a pelos. No entanto, o maior número de sensilas em suas antenas parece distinguir a espécie *M. seminigra merrillae*.

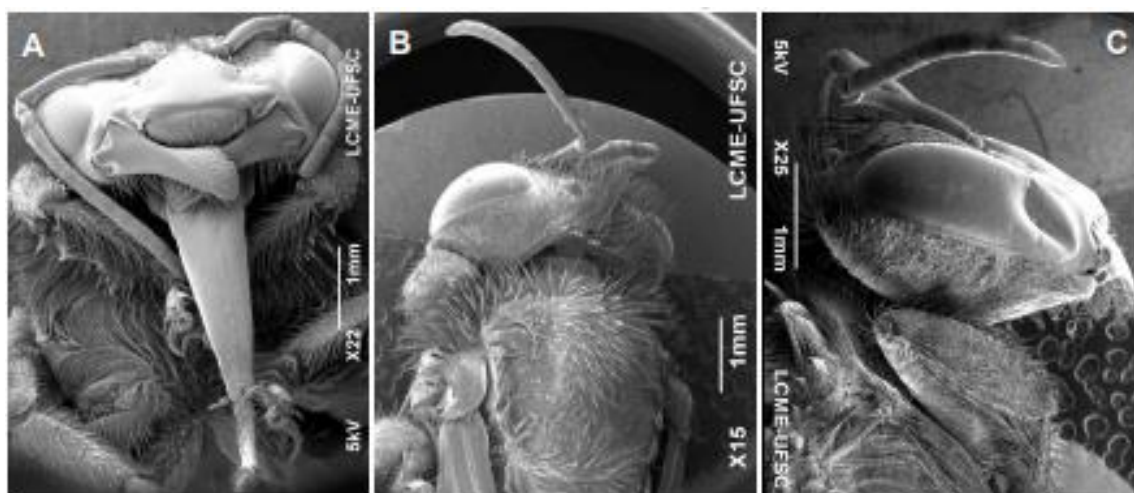


Figura 1. *M. seminigra merrillae*, obtidas por Micrografia Eletrônica de Varredura. A: vista ventral. B: vista dorsal. C: vista lateral.

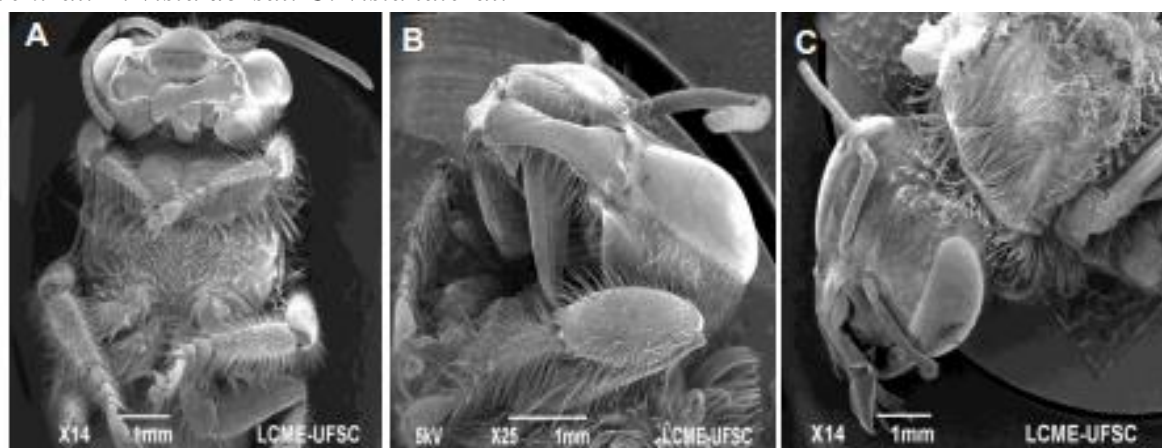


Figura 2. *M. Interrupta*, obtidas por Micrografia Eletrônica de Varredura. A: vista ventral. B: vista lateral. C: vista dorsal.

Há distintas sensilas distribuídas ao longo do segmento antenal com funções que vão da mecanorreceptora à quimiorreceptora. Esta última, sensível aos compostos hidrocarbonetos cuticulares, auxiliares na identificação das companheiras operárias de ninho, e também, estimuladoras no desempenho de tarefas específicas na colônia, como desidratação de néctar, defesa do ninho, trabalho com cerume, dentre outras.

Compostos voláteis dos méis de meliponas

Por meio do processo de extração e destilação simultânea com o solvente *n*-pentano a partir da técnica de Likens-Nickerson, obteve-se um total de 19 compostos voláteis, conforme expresso na Tabela 1, com seus respectivos cromatogramas. Estes foram identificados nas amostras de méis analisadas dos meliponíneos estudados por cromatografia gasosa associado à espectrometria de massas (CG-MS), cujos valores de RI_{calc} obtidos neste trabalho estão coerentes com os valores encontrados na literatura.

Os compostos identificados pertencem a diferentes classes químicas, incluindo terpenos, hidrocarbonetos lineares, álcoois, ésteres, cetonas não aromáticas, aldeídos, derivados

do benzeno e heterocíclicos com anéis furano e pirazina. O hidrocarboneto linear *n*-octano e os monoterpênicos linalol e seus isômeros *cis* óxido de linalol (furanóide) e *trans* óxido de linalol (piranóide) foram detectados praticamente em todas as amostras de méis analisadas, como pode ser verificado na Tabela 1. No entanto, a maior porcentagem relativa da presença desses compostos voláteis coube ao linalol no mel de *M. seminigra* (67,76 % e 61,21 %), seguido de seu isômero *cis* óxido de linalol (29,47 % e 43,8 %). Para a espécie *M. interrupta* foram registrados, respectivamente, (38,97 % e 29,63 %) e (27,36 % e 23,37 %), indicando o estágio de maior floração e preferência meliponícola supostamente cítrica para as espécies vegetais visitadas pelas abelhas (Tabela 1).

Tabela 1. Constituintes voláteis dos méis produzidos pelas espécies *M. seminigra merrillae* e *M. interrupta* nos meses de coleta do verão amazônico (período seco), dos meliponicultores rurais nos municípios de Itacoatiara e Urucará-AM

Compostos	RI _{calc}	RI _{lit}	Itacoatiara				Urucará			
			<i>M. seminigra</i>		<i>M. interrupta</i>		<i>M. seminigra</i>		<i>M. interrupta</i>	
			Ag	Set	Ag	Set	Ag	Set	Ag	Set
<i>n</i> -octano	800	800	10,33	5,29	8,17	6,27	1,61	7,19	22,63	10,13
3z-hexenal	805	797	-	-	-	-	1,11	-	-	-
Etil de Piruvato	806	807	-	-	-	-	-	-	2,34	-
Etil de Benzeno	867	857	-	-	-	-	-	-	2,56	-
<i>n</i>-nonano	900	900	-	-	-	-	-	-	1,91	-
Pentanona	941	940	-	-	-	-	0,38	-	-	-
Benzaldeído	959	952	-	-	4,73	-	-	-	-	-
2-etil Hexanol	1026	1030	-	2,18	-	1,77	-	5,41	6,76	21,58
Acetaldeído de Benzeno	1042	1036	16,63	4,17	30,31	6,06	-	2,45	-	-
2-etoxi-3-metil Pirazina	1039	1040	-	0,97	-	-	-	-	13,67	-
<i>cis</i>-óxido de Linalol	1071	1067	29,47	10,06	22,27	27,36	43,8	15,34	10,02	23,37
<i>trans</i>-óxido de Linalol	1088	1084	10,80	4,42	9,08	11,76	19,51	8,40	-	9,26
Linalol	1104	1095	32,77	67,76	25,44	38,97	31,03	61,21	22,55	29,63
Isofurano	1120	1118	-	-	-	-	-	-	9,38	6,03
Formato de octila	1130	1127	-	-	-	4,70	-	-	-	-
2-vinil Anisole	1129	1135	-	-	-	-	1,11	-	-	-
4- reto Isofurano	1141	1140	-	2,99	-	-	-	-	8,18	-
Óxido de Nerol	1153	1154	-	2,16	-	-	1,45	-	-	-
γ-Eudesmol	1632	1630	-	-	-	3,11	-	-	-	-

Legenda: RI_{calc} = Tempo de Retenção Calculada; RI_{lit} = Tempo de Retenção da Literatura;
Ag = agosto; Set = setembro.

Em trabalhos apresentados por Castro-Vázquez., demonstrou-se a relação direta da elevada concentração de terpenos, proveniente de flores cítricas, como o linalol, principalmente, e seus derivados, em 80 % dos méis analisados com sabor e aroma cítricos na Espanha. Com isso, os autores destacam em suas pesquisas que não há, necessariamente, uma relação direta da importância sensorial dos compostos voláteis minoritários e de suas concentrações baixas no mel. Compostos voláteis majoritários e de elevadas concentrações podem ser igualmente determinantes para as características organolépticas do aroma e sabor do mel de abelhas, associados a suas espécies e características geográficas onde se encontram (CASTRO-VÁZQUEZ, 2006 a.,b., 2007.,2010.,2014).

Os compostos, *n*-octano, linalol, óxido de *cis*-linalol, acetaldeído de benzeno e benzaldeído estão entre as substâncias mais amplamente distribuídas no reino vegetal como consta, por exemplo, nas espécies *Hipericum tomentosum*, *Melissa officinalis* L, *Cymbopogon citratus* DC, *Citrus* sp, *Acacia* sp. (acácia), *Anacardium occidentale* e *Croton* sp. Esses compostos podem estar presentes no néctar das flores, ou ainda, como resultado de possíveis transformações bioquímicas enzimáticas devido ao ambiente oxidante dos favos nas colmeias durante a produção e estocagem do mel pelas abelhas (CASTRO-VÁZQUEZ, 2006 a.,b., 2007.,2010.,2014).

Vale ressaltar que os méis, comumente comercializados pelos microprodutores rurais em todo o norte do Brasil como importante fonte de renda familiar, das duas espécies de meliponas estudadas, são apreciados pelos seus distintos sabores e propriedades terapêuticas. A etnomedicina amazônica utiliza os méis *in natura* no alívio de dores de garganta e inflamações provenientes de infecções como gripes e resfriados, conforme constatamos *in loco*. Curiosamente, muitas espécies de plantas produtoras de linalol e de seus derivados são utilizadas pela aromaterapia e pela medicina tradicional no alívio de diversos sintomas e enfermidades. O linalol, o composto de maior concentração em todas as amostras de méis analisadas, apresenta na literatura uma variedade de atividades farmacológicas que justificam o uso do mel pela etnomedicina da mesorregião amazônica para fins terapêuticos, além do alimentício. Dentre tais atividades, a antimicrobiana e a antiinflamatória (CASTRO-VÁZQUEZ, 2006 a.,b., 2007.,2010.,2014).

Esse monoterpene destaca-se também por apresentar atividade leishmanicida, indutor de apoptose na citotoxicidade em células de câncer em cólon retal, antioxidante, com efeitos cardiovasculares e neuroprotetor, dentre outras propriedades. O efeito neuroprotetor foi atribuído em neuropatologias, como o mal de Alzheimer, com resultados promissores *in vivo* em cobaias de laboratório (CASTRO-VÁZQUEZ, 2006 a.,b., 2007.,2010.,2014).

O hidrocarboneto linear *n*-octano apresentou uma diferença na porcentagem relativa somada em todas as amostras de 16,38 % no mel da espécie *M. interrupta* de Urucará frente aos 7,22 % de Itacoatiara, e de 4,4 % para a espécie *M. seminigra*. Já o composto acetaldeído de benzeno, derivado do benzeno, geralmente encontrado no óleo essencial de laranja e lima, foi detectado em todas as amostras do meliponário do município de Itacoatiara, com uma diferença na porcentagem relativa de 21,05 % acima do terpenóide *trans* óxido de linalol. Em relação ao meliponário de Urucará, onde esse composto foi detectado apenas para a espécie *M. Seminigra*, no mês de setembro, com 2,45 %; esse composto aromático obteve uma porcentagem relativa total de 57,17 % nas amostras dos méis de ambas as espécies de meliponas em Itacoatiara, o que pode indicar a preferência meliponícola entre as espécies de abelhas (Tabela 1).

O álcool 2-etil hexanol presente nos méis de ambas as espécies de melíponas foi detectado apenas no mês de setembro nos meliponários, destacando-se, em sua porcentagem relativa, apenas para a espécie *M. interrupta* (21,58 %), em Urucará. Tanto o álcool supracitado quanto o hidrocarboneto *n*-octano são compostos voláteis atrativos de abelhas que aumentam a interação entre planta e o polinizador. No entanto, suas concentrações podem ser expressivamente elevadas conforme a influência do microbioma presente no néctar das flores, como fungos e bactérias, responsáveis diretos pela biossíntese desses compostos, e não necessariamente, advindos do óleo essencial das flores.

Com base nos resultados obtidos e das considerações apresentadas, faz-se necessário ampliar esse estudo por meio da multidisciplinaridade entre as ciências afins, como química, bioquímica e biologia, certificando-se quanto a real fonte da produção via biossíntese desses compostos voláteis presentes no mel dessas abelhas. O néctar das flores, fonte igualmente importante de compostos voláteis para aromas específicos de méis, torna necessária sua análise química para a identificação da origem floral desses compostos.

Conclusões

A determinação de compostos voláteis em méis permite indicar a preferência meliponícola das abelhas de uma dada região, auxiliando na padronização e controle de qualidade do produto. Evita possíveis fraudes para a sua comercialização, certifica a credibilidade e valoriza o produto dos meliponicultores rurais, aumentando, com isso, a renda familiar, e fixando o homem no campo.

Os resultados de nossa pesquisa destacaram os monoterpenos linalol e seus derivados *cis* e *trans* óxidos de linalol, assim como o hidrocarboneto linear *n*-octano, como produtos voláteis majoritários nos méis de ambos os meliponários estudados. Entretanto, apenas no meliponário de Itacoatiara, o composto acetaldeído de benzeno, comumente encontrado no óleo essencial da laranja, fez-se presente em todas as amostras analisadas. Contudo, o mel da espécie *M. interrupta*, de Urucará, foi o mais rico em tipos de compostos voláteis. Os terpenos supracitados, presentes majoritariamente e em concentração porcentual nas amostras analisadas, são apontados como méis de aroma e sabor cítricos. Os compostos acima citados são possíveis candidatos a marcadores químicos de suas origens meliponícolas. No entanto, estudos adicionais são necessários para a caracterização do aroma e da identificação da origem floral para os méis da região estudada.

Agradecimentos

Aos meliponicultores do Amazonas, ao Dr. Américo Cruz (*in memoriam*) da UFSC e as Dras Favizea de Oliveira, da UFBA, e Rosa H. V. Mourão, UFOPA, pelo valioso apoio nesse trabalho.

Referências

CARVALHO, C. A. L.; Souza, B. A.; Sodré, G. S.; Marchini, L. C.; Alves, R. M. O.; Mel de abelhas sem ferrão: contribui o para a caracteriza o físico-química, Cruz das Almas: Bahia, 2005.



- CARVALHO-ZILSE, G. A.; Silva C. G. N. da; Alves R. M. de O.; Souza, B. de A.; Waldschmidt, A. M.; Sodré, G. da S.; Carvalho, C. A. L.; Meliponicultura: perguntas mais frequentes sobre as abelhas sem ferrão, Cruz das Almas: Nova civiliza o, 2011.
- CARVALHO-ZILSE, G.A.; Produ o de polinizadores para a agricultura na Amazônia. In: Noda, H.; Souza, L.A.G.; Silva Filho, D.F. (Ed.). *Pesquisas agron micas para a agricultura sustentável na Amazônia Central*. Núcleo de Estudos Rurais e Urbanos Amazônico/Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. 2013.
- CASTRO-VÁZQUEZ, L. Floral origin markers for authenticating Lavandin honey (*Lavandula angustifolia* x *latifolia*). Discrimination from Lavender honey (*Lavandula latifolia*). **Food Control**, v. 37, p. 362-370, 2014.
- CASTRO-VÁZQUEZ, L. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. **Food Research International**. 43, 2335-2340, 2010.
- CASTRO-VÁZQUEZ, L. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. **Journal Agriculture Food Chemistry**. 54, 4809-4813, 2006a.
- CASTRO-VÁZQUEZ, L. Analysis of volatile compounds of Eucalyptus honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Eur. Food Res. Technol.** 224, 27-31, 2006b.
- CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. **Food Chemistry**. 103, 601-606, 2007.
- KERATALGIAS, I. K.; Badeka, A.; Kontakos, S.; Karabournioti, S.; Kontominas, M.G.; Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chem**, 146, 548. 2014.
- MICHENER, C. D.; The Meliponini. In: Vit, P.; Pedro, S. R. M.; Roubik, D. H. (Orgs.). *Pot-Honey: um legacy of stingless bees*. New York: Springer, 2013.
- VILLAS-BOAS, J. *Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão*. Brasília, Instituto Sociedade, Popula o e Natureza, 2012.