

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação do mel como substrato para contaminação
fúngica no ambiente da colméia**

Ana Cláudia Marassi

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO MEL COMO SUBSTRATO PARA CONTAMINAÇÃO
FÚNGICA NO AMBIENTE DA COLMÉIA**

ANA CLÁUDIA MARASSI

Sob orientação do professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Setembro de 2010

638.1
M311a
T

Marassi, Ana Cláudia, 1984-

Avaliação do mel como substrato para contaminação fúngica no ambiente colméia / Ana Cláudia Marassi - 2010.

51 f.: il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 34-40.

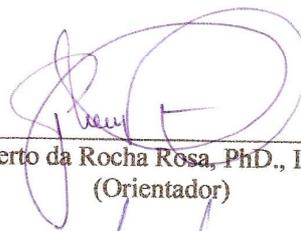
1. Abelha - Criação - Teses. 2. Fungos - Teses. 3. Mel - Avaliação - Teses. 4. Genes - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

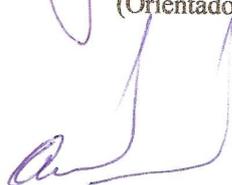
ANA CLÁUDIA MARASSI

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 / 09 / 2010



Carlos Alberto da Rocha Rosa, PhD., L.D. - UFRRJ
(Orientador)



Ana Maria Dalcerro, DSc. - UNRC, Argentina



Maria Cristina Affonso Lorenzon, DSc. - UFRRJ

*Dedico este trabalho à minha
mãe Graça e irmãos André e
Cris, e ao meu marido Igor
por todo apoio e amor ao
longo desta jornada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, por sempre me apoiar, orientar e instruir para o melhor e para o bem, em especial à minha mãe Maria da Graça Marassi, irmã Andréa Cristina Marassi, irmão André Luis Marassi e pai Marco Aurélio de Carvalho Marassi, que sempre estará conosco.

Ao Professor Carlos Alberto da Rocha Rosa pela orientação e confiança em meu trabalho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo espaço e profissionais cedidos ao longo da minha formação.

Às professoras Maria Christina Sanches Muratori, Ana Maria Dalcerro e Maria Cristina Affonso Lorenzon, pelo carinho, atenção e contribuições à pesquisa.

Aos apicultores que participaram da pesquisa com amostragem ou com apoio.

À Capes, órgão financiador desses anos de pesquisa.

Ao meu marido, Igor Leonardo Ventapane Freitas, por todo apoio, carinho e atenção ao longo dessa minha jornada. E a sua família que esteve sempre torcendo por mim.

A todos os meus amigos do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, minha segunda família nesses dois anos: Kelly Moura Keller, Águida Aparecida de Oliveira, Beatriz Dias Queiroz, Tatiana Salomão Barbosa, Bruno de Oliveira, Carla Alves Soleiro, Thaís Fagundes, Tatiana Xavier de Almeida, Beatriz de Sousa Monteiro, Luiz Antonio Moura Keller, Lucila Maria Teixeira Nunes, Renata Quintela Assad, Francine Siqueira Santos, Débora de Castro Rocha, Tayane Karine Barbosa de Moraes, Michele Valadares Deveza e Caroline da Cruz Bessa.

RESUMO

MARASSI, Ana Cláudia. **Avaliação do mel como substrato para contaminação fúngica no ambiente da colméia.** 2010. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O mel é um alimento produzido pelas abelhas a partir do néctar recolhido de flores e processado pelas enzimas digestivas desses insetos, sendo armazenado em favos em suas colméias para servir-lhes de alimento. A apicultura brasileira tem sofrido altas perdas de abelhas melíferas, devido a uma série de doenças que afetam as colméias, colocando-as sob risco. Muitas espécies de leveduras e fungos podem desenvolver-se na colméia utilizando o mel como substrato, como por exemplo, o gênero *Aspergillus*, importante por abranger espécies produtoras de micotoxinas e/ou patogênicas para as abelhas. A Cria Ensacada Brasileira (CEB) é uma doença com alto grau de mortalidade, caracterizada por morte na fase de pré-pupa ou pupa e que vêm ocorrendo na Região sudeste do Brasil. Sua etiologia é desconhecida, já que foi descartada qualquer semelhança com a Cria Ensacada Européia causada pelo *Sac Brood Virus* (SBV), e com a intoxicação pelo pólen do *Stryphnodendron polyphyllum*, de nome vulgar barbatimão. Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar a contaminação fúngica em amostras de mel e crias de abelhas determinando assim relação com a ocorrência da CEB no ambiente da colméia, no Estado do Rio de Janeiro; 2) enumerar os propágulos fúngicos nas amostras de mel em favo, e de crias (pupas e pré-pupas) provenientes de apiários localizados em regiões acometidas pela CEB; 3) determinar a frequência e identificar a micobiota total; 4) identificar espécies fúngicas patogênicas para as abelhas; 5) caracterizar o perfil toxígeno de espécies isoladas do gênero *Aspergillus*. Um total de 43 amostras de mel e 43 amostras de crias (larvas e pupas) foi adquirido em apiários localizados nos municípios de Barra do Piraí, Mendes e Itaipava (áreas endêmicas). As coletas ocorreram nos meses correspondentes ao período pré, e trans - doença (baseado nos dados dos últimos surtos). A análise da micobiota foi feita pelo método de diluição em placa sobre os meios de cultivo dicloran rosa bengala cloranfenicol agar (DRBC) e dicloran glicerol 18% agar (DG18). As contagens fúngicas totais foram expressas em ufc g⁻¹. Foram determinadas o número de amostras e a frequência de isolamento (%) dos gêneros fúngicos e a densidade relativa das espécies. A determinação do perfil toxígeno dos fungos foi feita através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). Os valores de contagens fúngicas totais foram similares em ambos os meios DRBC e DG18, para as amostras de crias. As maiores contagens foram observadas em amostras de mel em favo, com 7,7 x 10⁴ ufc g⁻¹ em meio DRBC e 5,9 x 10⁴ ufc g⁻¹ em meio DG18. *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* foram os gêneros mais frequentemente isolados tanto no mel em favo, quanto nas crias. *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *Penicillium citrinum* apresentaram as maiores densidades relativas no mel e nas crias. Na análise em CCD para os fungos isolados no mel em favo, não foram observadas cepas positivas para as espécies isoladas do gênero *Aspergillus*. Dentre as cepas analisadas na micobiota das larvas, há presença de cepas positivas para o perfil toxígeno de *A. flavus* nas amostras de Barra do Piraí e Itaipava. Para as cepas produtoras de ocratoxinas, o resultado foi de 100% negativas para todos os locais estudados. Os fungos encontrados neste estudo podem estar relacionados às perdas apícolas no estado do Rio de Janeiro, porém não apresentam aparente relação direta com a CEB. Contudo, mais estudos são necessários para identificação da micobiota do mel e das crias, correlacionando às espécies possíveis produtoras de micotoxinas com a micobiota presente nos substratos, promovendo assim o auxílio acerca da etiologia da CEB neste estado.

Palavras chave: fungos, mel, crias, abelhas.

ABSTRACT

MARASSI, Ana Cláudia. **Evaluation of honey as a substrate for fungal contamination in the environment of the hive.** 2010. 51p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences, Animal Health). Veterinary Institute, Veterinary Microbiology and Immunology Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Honey is a food produced by bees from the nectar of flowers collected and processed by the digestive enzymes of insects, stored in combs in their hives to serve them food. The Brazilian apiculture (branch of agriculture that studies of honey bees) has suffered high losses of honey bees, due to a number of diseases that affect the hives, putting them at risk. Many species of yeasts and molds can grow in the hive using honey as a substrate, such as the genus *Aspergillus*, which is important because it contains species that produce mycotoxins and / or pathogenic to bees. The Brazilian sac brood disease (BSB) is a disease with high mortality, characterized by death in the pre-pupa or pupa and that have occurred in southeastern Brazil, with substantial losses to beekeeping. However, its etiology is unknown in the region, which were dismissed any similarity to the European Creates bagged caused by Sac Brood Virus (SBV), and the *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoidea), the common name barbatimão. The objectives of this study were 1) to assess the fungal contamination in honey bee brood and thus determining influence on the occurrence of BSB in the environment of the hive, in Rio de Janeiro, 2) enumerate the fungal propagules in samples of honey in the comb, and the young (pre-pupae and pupae) from apiaries located in regions affected by BSB, 3) determine the frequency and identify the mycoflora total, 4) identify fungal species pathogenic to bees, 5) characterize toxigenic profile isolated species of the genus *Aspergillus*. A total of 43 honey samples and 43 samples of offspring (larvae and pupae) was purchased from apiaries that have already expressed the CEB, in the municipalities of Barra do Pirai, Mendes and Itaipava (endemic areas). Sampling occurred in the months corresponding to the period before, during and after - disease (based on data from recent outbreaks). Analysis of the mycoflora were performed by spread plate on the culture media dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC) and dichloran 18% glycerol agar (DG18). The total fungal counts were expressed as cfu g⁻¹. We determined the number of samples and frequency of isolation (%) of fungal genera and the relative density of species. The determination of toxigenic fungi was done using the technique of thin layer chromatography (TLC). The values of total fungal counts were similar in both media DRBC and DG18 for the samples of offspring. The highest counts were observed in samples of honey in the comb, with 7,7 x 10⁴ cfu g⁻¹ on DRBC medium and 5.9 x 10⁴ cfu g⁻¹ in DG18 medium. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* were the most frequently isolated both in the honey comb, as in the offspring. *Aspergillus niger*, *A. flavus* and *Penicillium citrinum* showed the highest relative density in honey and brood. In the TLC analysis for the fungi isolated honey in the comb, were not observed for positive strains isolated species of the genus *Aspergillus*. Among the strains analyzed in the mycoflora of the larvae, there is presence of positive strains for toxigenic profile of *A. flavus* in samples from Barra do Pirai and Itaipava. For strains producing ochratoxins, the result was 100% negative for all sites studied. The fungi found in this study can be related to losses bee in Rio de Janeiro, but is not present apparent direct with BSB. However, more studies are needed to identify the mycoflora of honey and brood, correlating the possible species that produce mycotoxins with the mycoflora present in the substrate, promoting so help on the etiology of BSB in this state.

Keywords: fungi, honey, brood, bees.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Aspergillus</i> .	14
Tabela 2: Contagem total, em \log_{10} de ufc g^{-1} , dos fungos filamentosos isolados nas amostras de mel em favo de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.	22
Tabela 3: Contagem total, em \log_{10} de ufc g^{-1} , dos fungos filamentosos isolados das amostras de crias de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.	23
Tabela 4: Número total de cepas das espécies de <i>Aspergillus</i> sp. identificadas nas localidades para o mel em favo de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.	25
Tabela 5: Número total de cepas das espécies de <i>Penicillium</i> sp. identificadas nas localidades para o mel em favo de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.	26
Tabela 6: Número total de cepas das espécies de <i>Aspergillus</i> sp. identificadas nas localidades para crias de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.	28
Tabela 7: Número total de cepas das espécies de <i>Penicillium</i> sp. identificadas nas localidades para crias de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Causas das perdas na apicultura do Rio de Janeiro nos últimos cinco anos.	05
Figura 2: Larvas de abelhas <i>Apis mellifera</i> apresentando larvas mortas e mumificadas pelo fungo <i>Ascospaera apis</i> .	07
Figura 3: Larvas de operárias apresentando sintomas típicos da CEB (forma de saco com acúmulo de líquido ecdisial).	08
Figura 4: Características morfológicas básicas representativas do gênero <i>Aspergillus</i> .	10
Figura 5: “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, triverticilado; e, quaterverticilado. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada.	11
Figura 6: Chave específica para identificação de subgênero do gênero <i>Penicillium</i> .	12
Figura 7: Estrutura química da aflatoxina B ₁ .	15
Figura 8: Estrutura química da ocratoxina A.	15
Figura 9: Regiões e municípios do estado do Rio de Janeiro. Divisão político-administrativa.	17
Figura 10: Equipamento AquaLab [®] modelo CX 2	18
Figura 11: Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (ufc g ⁻¹).	19
Figura 12: Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero <i>Aspergillus</i> nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas.	20
Figura 13: Esquema de inoculação e incubação das duas cepas (1 e 2) do gênero <i>Penicillium</i> a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperaturas controladas (25°C, 37°C e 5°C).	20
Figura 14: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras do mel em favo de colméias de abelhas africanizadas, sem sintomatologia aparente da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010.	24
Figura 15: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras do mel em	24

favo de colméias de abelhas africanizadas, com sintomatologia aparente da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Figura 16: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras de crias de colméias de abelhas africanizadas sem sintomatologia da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010. 27

Figura 17: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras de crias de colméias de abelhas africanizadas com sintomatologia da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010. 27

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Hipótese	02
1.2 Objetivo Geral	02
1.3 Objetivos específicos	02
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Apicultura no Brasil	03
2.1.1 Importância econômica da apicultura	03
2.2 Mel	05
2.3 Doenças fúngica das abelhas	06
2.4 Cria Ensacada Brasileira	07
2.5 Os fungos	08
2.5.1. Gênero <i>Aspergillus</i>	09
2.5.2. Gênero <i>Penicillium</i>	10
2.5.3. Os fungos no mel	12
2.5.4. Os fungos nas crias	12
2.5.5. Micotoxinas	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Amostragem: locais, período e procedimentos	17
3.2 Determinação da atividade de água das amostras	18
3.3 Isolamento e identificação da micobiota contaminante do mel	19
3.4 Isolamento e identificação da micobiota contaminante das crias	20
3.5 Caracterização do perfil toxígeno de espécies isoladas	20
3.6 Análises estatísticas	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Determinação da atividade de água	22
4.2 Contaminação fúngica	22
4.2.1 Amostras de Mel em favo	22
4.2.2 Amostras de Crias	22
4.3 Determinação da micobiota	23
4.3.1 Mel em favo	23
4.3.2 Crias	26
4.4 Perfil toxígeno	29
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

A apicultura estuda a criação de abelhas produtoras de mel, da espécie *Apis mellifera*, e as técnicas para usá-las em benefício do homem. A importância da apicultura está diretamente relacionada ao desenvolvimento sustentável, por despertar a consciência ambiental nos homens, e atuando na recuperação da vegetação de áreas degradadas através da polinização das espécies vegetais. Esta atividade inclui ainda a extração e comercialização de seus produtos: mel, pólen, cera, geléia real e própolis.

Atualmente, a apicultura tem sofrido perdas de abelhas melíferas devido a uma série de doenças que afetam as colméias, colocando-as sob risco. Segundo a Organização Internacional de Epizootia são doenças de notificação compulsória: acarapisosis (*Acarapis woodi*), cria pútrida americana (*Paenibacillus larvae*), cria pútrida européia (*Melissococcus pluton*), pequeno escaravelho das colméias (*Aethina tùmida*), tropilaelaps e varroatose (*Varroa destructor*). No Brasil, foram registrados casos isolados de cria pútrida européia, cria ensacada, cria giz e alguns casos de doenças de crias causadas por vírus bem como uma baixa infestação, oscilando de 2,0 a 5,0%, em regiões do Sul do Brasil, de crias e de abelhas adultas pelo ácaro ecto-parasita de abelhas, *Varroa destructor*. As abelhas africanizadas, poli-híbrido de diversas subespécies de *Apis mellifera*, que colonizaram nosso país desde a década de 50, são utilizadas na apicultura brasileira e são consideradas resistentes às doenças, e o Brasil é visto como um país de poucos problemas na área de sanidade apícola.

A ocorrência de doenças pode levar ao aumento na mortalidade de abelhas, e conseqüente queda de produtividade das colméias. Tanto as crias como as abelhas adultas podem ter suas populações reduzidas, perdendo muitas vezes até seus enxames. E devido a essa susceptibilidade das abelhas a diversas doenças, parasitas e predadores, é necessário a participação dos apicultores em promover o desenvolvimento de colônias fortes e saudáveis, em especial nas épocas de maior produção.

Muitos microrganismos podem se desenvolver na colméia empregando o mel como veículo contaminante, no caso de fungos, destaca-se o gênero *Aspergillus*, que abrange espécies produtoras de micotoxinas e, ou patogênicas para as abelhas. Sabe-se atualmente que as doenças fúngicas mais importantes para as abelhas, encontradas no Brasil, são a cria “giz” e a cria “pedra”. A primeira atinge as larvas de abelhas, e é causada pelo fungo *Ascophæra apis*, a segunda é causada por fungos *Aspergillus*, sendo as espécies *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* as de maior importância.

No Brasil, a cria ensacada brasileira (CEB) é uma doença de grande importância por causar alta e rápida mortalidade em abelhas, e provocar grande redução da população da colméia, que ao se tornar doente costuma apresentar invasão de outros insetos como formigas e forídeos (*Pseudohylocera kerteszi*), ou fuga de enxames.

A CEB afeta larvas pré-pupas, acarretando um acúmulo de líquido ecdisial abaixo da cutícula, o que impede sua metamorfose para o estágio pupal. Sua sintomatologia é semelhante à cria ensacada européia, cujo agente etiológico é o *Sac Brood Virus* (SBV). Porém, este vírus não foi encontrado, até o momento, como agente causador desta doença no Brasil, o que a torna única e identificada com o nome de CEB.

Foi comprovado que esta doença no Brasil pode ser causada pela ingestão do pólen tóxico de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*), porém sua baixa ocorrência nas regiões afetadas do Estado do Rio de Janeiro indica ausência de envolvimento desta espécie floral com a etiologia da CEB neste estado. Logo, mais estudos são necessários acerca da etiologia desta doença, que causa grandes prejuízos na apicultura deste estado, causando interferência na sanidade das abelhas.

1.1 Hipótese

O mel serve como veículo de contaminação do ambiente da colméia por diversos fungos, incluindo espécies patogênicas para as abelhas.

1.2 Objetivo Geral

Avaliar a contaminação fúngica em amostras de mel e crias de abelhas determinando assim relação com a ocorrência da CEB no ambiente da colméia, no Estado do Rio de Janeiro.

1.3 Objetivos Específicos

1. Enumerar os propágulos fúngicos nas amostras de mel em favo, e de crias (larvas e pupas) provenientes de apiários localizados em regiões acometidas pela CEB.
2. Determinar a frequência e identificar a microbiota total.
3. Identificar espécies fúngicas patogênicas para as abelhas.
4. Caracterizar o perfil tóxico de espécies isoladas do gênero *Aspergillus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Apicultura no Brasil

Apicultura é a arte ou ciência de criar abelhas de forma racional, de produzir em menor tempo os melhores produtos e com o menor custo para obter o maior lucro (ROCHA, 2008). O Brasil é um país tipicamente tropical, formado de uma grande área de cobertura vegetal que apresenta alta biodiversidade de flora, onde as abelhas têm papel fundamental na polinização, proporcionando cerca de 80% das perpetuações das espécies vegetais (MCT, 2001).

A apicultura teve seu início, no Brasil, a partir de 1939 com a introdução das abelhas européias trazidas pelos emigrantes europeus (WIESE, 2005). Segundo Gonçalves (2006), a história da apicultura Brasileira divide-se em três etapas:

A primeira etapa encontra-se entre 1939 e 1955 que corresponde à implantação da apicultura no País iniciada pelos colonizadores europeus, com o uso tecnologias importadas da Europa.

A segunda etapa se dá a partir de 1956, através da introdução das abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) no Brasil, a partir da africanização dos apiários houve melhora no desempenho produtivo da apicultura brasileira. Após uma visita a África do Sul, ao constatar a alta produtividade das abelhas africanas, o geneticista brasileiro Professor Warwick Kerr da ESALQ (Piracicaba), decidiu introduzi-las no Brasil para atender às necessidades da classe apícola, cujos anseios eram aumentar a resistência das abelhas às doenças e sua produção. Prof.º Kerr objetivou fazer um melhoramento e posterior distribuição de rainhas selecionadas aos apicultores. O Setor de Apicultura da Universidade Rural do Rio de Janeiro recebeu muitas rainhas virgens de duas raças Africanas (amarela e preta) e conseguiu introduzir em núcleos de Européias que ficaram sob observações. Algumas colônias de Africanas pretas se extinguiram, e as de amarelas, no entanto continuaram, mostrando certa agressividade e uma alta tendência a fugas. Esta tendência juntamente a capacidade destas abelhas de enxameação levou ao cruzamento descontrolado dessas abelhas com as demais abelhas européias formando um polihíbrido com o domínio das africanas. Este período caracterizou-se por um “caos na apicultura brasileira”, já que muitos apicultores abandonaram esta atividade devido à alta agressividade das abelhas.

A partir de 1970 inicia-se a terceira etapa ou período de recuperação e expansão da apicultura brasileira marcada pelo desenvolvimento de várias ações, como a criação de metodologias de manejo, entre outras. Estas ações possibilitaram a adaptação dos apicultores às abelhas africanizadas.

A criação de abelhas melíferas é uma atividade que promove qualidade de vida através da geração de ocupação e renda, não degrada o meio ambiente, nem contamina ou esgota os recursos naturais e ainda, possibilita às famílias a prática de outras atividades agrícolas (EMBRAPA, 2009).

2.1.1 Importância econômica da apicultura

A China é a principal produtora de mel comercial em termos mundiais, com uma produção bem acima da Argentina e Turquia, países que ocupam, respectivamente, a segunda e terceira posições. O Brasil ocupa a 11ª posição na lista dos principais produtores (FAO, 2006).

O Brasil comercializa mel principalmente com os Estados Unidos e com países europeus, tornando-se, em 2006, o quarto maior exportador mundial, embora tenha enfrentado embargo desses últimos. Do total produzido nacionalmente, cerca de 40,3% foi exportado, sendo São Paulo o principal estado exportador de mel (IBGE, 2006).

A produção de mel de abelhas teve um crescimento de 7,2% relativamente ao ano de 2005, e a Região Sul do País concentra 45,4% da produção nacional de mel. O Rio Grande do Sul sozinho produz 21,6% do mel, além de produções significativas ocorrerem também nos demais estados da região. A Região Nordeste também tem grande importância como produtora de mel, produzindo 33,4% do total nacional e ganhando participação relativa (FIBGE, 2006). O cenário é promissor e descortina um mundo de oportunidades para a apicultura brasileira. Há ainda um grande potencial a ser explorado e descoberto, favorecido especialmente pelas características naturais do Brasil.

A apicultura é considerada uma atividade com grandes efeitos benéficos na fixação do homem no campo, por envolver famílias inteiras no seu trabalho despontando também como uma das atividades econômicas mais rentáveis do País. Todos os seus produtos, como o mel, a geléia real, o pólen e a cera têm forte procura no mercado (LORENZETTI; MARQUES; CALDAS, 2009).

O Brasil tem alcançado produções de mel elevadas, e o país pode alcançar a posição de orgânico comercializando mel de qualidade e reconhecido no mercado como livre de resíduos de medicamentos (MESSAGE, 2002). As perspectivas para a apicultura brasileira são as melhores possíveis, devido as suas condições mesológicas: clima, riqueza em flora poli-nectarífera. Além das possibilidades praticamente ilimitadas de exportação para diversos países (VIEIRA, 2000).

Para atingir as expectativas esperadas é fundamental estar atento à situação sanitária das colméias, e saber reconhecer as anormalidades que indicam a presença de doenças. Isso ajudará a evitar a disseminação de doenças no Brasil, que podem causar sérios prejuízos à apicultura, como é o caso da CEB. Através do conhecimento dos principais sintomas de doenças, podem-se tomar medidas imediatas, como o isolamento das colméias atacadas, o envio de amostras a laboratórios para análise e diagnóstico precisos, comunicação das associações, cooperativas ou outras instituições. Desta maneira, poder-se-á evitar contaminação dos apiários locais e de outras regiões (EMBRAPA, 2009).

O censo apícola, realizado no estado do Rio de Janeiro em 2006, revelou um dado preocupante: as perdas de colméias atingiram cerca de 60% dos apiários nos últimos cinco anos e as doenças constituíram a principal causa destas perdas (Figura 1). O censo também revelou que 75% das doenças de abelhas foram diagnosticadas pelo próprio apicultor devido à baixa disponibilidade de apoio técnico (PACHECO, 2007).

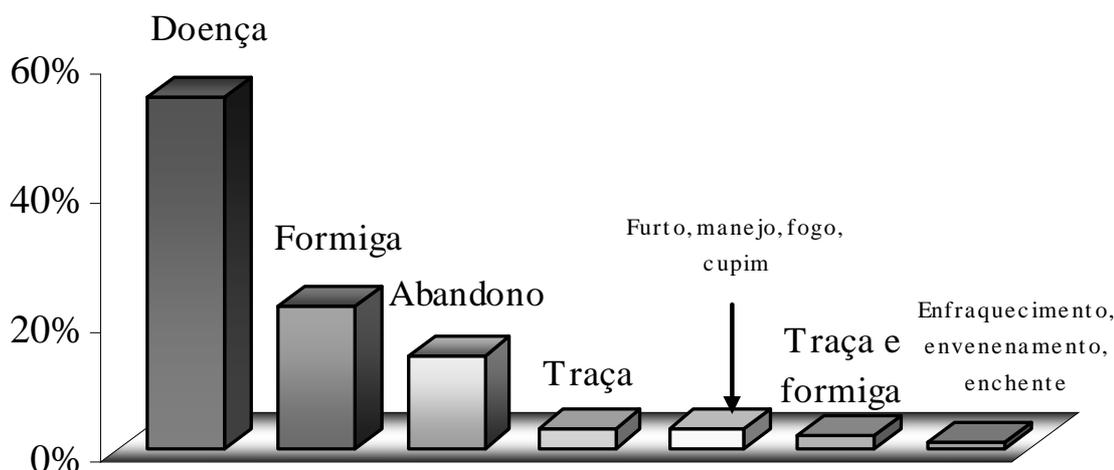


Figura 1: Causas das perdas na apicultura do Rio de Janeiro nos últimos cinco anos.

Fonte: PACHECO (2007).

2.2 Mel

Entende-se por mel, o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colméia (BRASIL, 2000). A abelha *Apis mellifera* é a espécie considerada como principal produtora do mel comumente utilizado para consumo humano, apesar da grande diversidade de espécies de abelhas silvestres e que produzem mel de boa qualidade, como as abelhas sem ferrão (*Meliponina*) (ALVES et al., 2005).

O mel é uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração (BRASIL, 2000).

O mel pode apresentar-se em sua forma verde (mel não-maduro) com alto índice de umidade, não operculado pelas abelhas. A quantidade alta de água no mel facilita a proliferação de fungos e leveduras, tornando-o impróprio para o consumo humano e impossibilitando a sua comercialização (EMBRAPA, 2010). O mel também pode apresentar-se em sua forma madura, que é aquela com menores índices de umidade, operculado pelas abelhas. Porém, devido a alguns fatores internos da colméia, como a dificuldade de produção de cera, por exemplo, o mel maduro pode não ser operculado. Logo a operculação ou não do favo pode ser um falso indicador de maturidade do mel.

A cera que recobre o mel é formada de ácidos graxos, de natureza hidrofóbica, diminuindo assim a possível contaminação por fungos e leveduras. O ninho apresenta disposição característica, em que as crias encontram-se localizadas no centro do ninho, rodeadas por pólen, e mel mais externamente (FREE, 1987).

A utilização dos produtos das abelhas com fins terapêuticos é denominada Apiterapia, e vem se desenvolvendo consideravelmente nos últimos anos com a apresentação de inúmeros trabalhos científicos, cujos efeitos benéficos à saúde humana têm sido considerados por um número cada vez maior de profissionais da saúde. Países como a Alemanha já a adotaram como prática oficial em sua rede pública de saúde (EMBRAPA, 2010). Exemplificando, o mel pode ser utilizado no tratamento de asma ou para combater um coma diabético. Quando

diluído, pode ser usado como xarope contra a tosse, e pode ser aplicado em queimaduras e outras feridas devido à sua ação osmótica. Devido à quantidade mínima de pólen que se encontra no mel, este pode ser usado também para aumentar a resistência contra a rinite alérgica (MUTSAERS; ARAÚJO, 2006). Além disso, o mel apresenta ação antioxidante e antisséptica relacionada aos compostos fenólicos nele presentes (MOREIRA, 2001). Destaca-se o efeito inibidor do mel de abelhas contra bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus* (TAVARES et al., 2006).

A cor do mel é variável, dependendo da sua composição. Quanto mais escuro (cor de café) mais rico em minerais e mais forte é o seu sabor; quanto mais claro mais pobre em sais minerais, podendo até apresentar-se quase incolor, com um sabor mais suave (CRANE, 1996). Sua coloração está diretamente relacionada com a fonte de néctar que o originou e também com a espécie de abelha que o produziu (EMBRAPA, 2010). Sua elaboração resulta de duas reações principais a partir do néctar: uma sofrida pela desidratação, através da evaporação na colméia e absorção no papo (vesícula melífera), e outra que atua transformando a sacarose, através da enzima invertase, em glicose e frutose. Ou seja, o néctar sofre no trajeto da boca a vesícula melífera ação definitiva das enzimas, estando assim pronto para ser regurgitado nos alvéolos do favo, local este onde o mel sofre a maturação, possibilitando assim a operculação dos favos realizada pelas abelhas (CRANE, 1996).

2.4 Doenças fúngicas das abelhas

A ocorrência de doenças nas colméias pode acarretar prejuízos diretos pela diminuição da produtividade, uma vez que o aumento da mortalidade, tanto de crias como de abelhas adultas, leva a uma redução da população da colméia com conseqüente redução da produção. Em casos mais graves, o apicultor poderá perder enxames, já que as abelhas africanizadas, costumam abandonar as colméias quando a população adulta se reduz.

Existem vários organismos que podem causar problemas para as abelhas, tanto na fase de larva quanto na fase adulta. Algumas bactérias, fungos e vírus causam doenças que afetam principalmente as larvas. Já as abelhas adultas são freqüentemente atacadas por protozoários, ácaros e insetos. (EMBRAPA, 2009). Algumas espécies de fungos e leveduras podem desenvolver-se utilizando o mel como substrato, como o gênero *Aspergillus* por conter espécies produtoras de micotoxinas e/ou patogênicas para as abelhas (SNOWDON; CLIVER, 1996).

A seguir estão apresentadas as principais doenças fúngicas que acometem as abelhas. Originalmente conhecido como *Pericystis apis* e posteriormente reclassificado como *Ascosphaera apis*, esse fungo caracteriza-se por causar mortalidade nas crias de abelhas *Apis mellifera*. As larvas infectadas geralmente morrem nos dois primeiros dias, após serem operculadas em suas células, na fase de pupa. Essas crias inicialmente apresentam coloração branca e, em fase mais adiantada da doença, algumas continuam brancas, mas outras se tornam cinza-escuras ou quase pretas. O fungo irá competir por alimento com a larva provocando desnutrição. Passará então a consumir o resto do corpo da larva, fazendo-a parecer branca e calcária, porém quando morta sua característica será marrom, típico sinal de putrefação (Figura 2). Esta doença é mais visível durante estações de alta umidade; colméias com estes sintomas geralmente podem ser recuperadas através do aumento da ventilação, e conseqüente queda de umidade (ARONSTEIN; MURRAY, 2009). O fungo *Ascosphaera apis* apresenta duas fases distintas de vida: uma vegetativa ou micelial e outra reprodutiva, na qual são formados os ascospores, que são os propágulos responsáveis pela disseminação da doença. As larvas de abelhas contaminam-se após ingerirem alimento com esporos que germinam no lúmen do intestino, com crescimento e desenvolvimento de micélio, particularmente na parte posterior do intestino da cria. Quando ocupam todo o corpo das

larvas, estas ficam ressecadas, mumificadas e duras, semelhantes a um diminuto bastão de giz, o que motivou a proposição do nome da doença de cria giz (BAILEY; BALL, 1991).



Figura 2: Larvas de abelhas *Apis mellifera* apresentando larvas mortas e mumificadas pelo fungo *Ascospaera apis*.

Fonte: MORTON (2006).

A cria pedra é uma doença causada pelos fungos *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* causando mumificação de abelhas na colméia. A doença é difícil de identificar na fase inicial da infecção. Os conídios destas espécies apresentam-se de cores diferentes, e também podem causar danos respiratórios aos humanos e outros animais. Quando a larva ingere os conídios, estes são conduzidos ao intestino e crescem rapidamente formando um “colarete” perto da cabeça. Após a morte das larvas, estas ficam pretas e se tornam difíceis de triturar, daí o nome. Eventualmente, o fungo se desenvolve a partir do tegumento da larva e faz uma falsa pele. Nesta fase, as larvas são cobertas com conídios fúngicos (ALI ZADEH; MOSADEGH, 1994).

2.5 Cria Ensacada Brasileira

A CEB é uma doença que cursa com alta e rápida mortalidade de larvas pré-pupas nas colméias afetadas. A doença tem se constituído em um grave problema para a apicultura nos estados do Sudeste e Centro Oeste brasileiros, caracterizados por prejuízos substanciais. Os sintomas são muito semelhantes aos da cria ensacada européia, causada pelo SBV, descrita em alguns países. Esta é a virose de abelhas com a maior difusão mundial (BAILEY, 1968). Entretanto a doença aqui no Brasil foi nomeada como CEB por não ter sido detectado o vírus como agente causador (MESSAGE, 1997). A larva acumula líquido ecdisial abaixo da cutícula, não realiza a muda para o estágio pupal e ocorre escurecimento da região cefálica e depois de todo o seu corpo (Figura 3).



Figura 3: Larvas de operárias apresentando sintomas típicos da doença CEB (forma de “saco” com acúmulo de líquido ecdisial).

Fonte: www.apacame.org.br

Há divergências entre os pesquisadores quanto à etiologia da CEB. Carvalho (1998) considerou que esta enfermidade é uma intoxicação, derivada da ingestão do pólen tóxico de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*), contudo para Cintra et al. (2003) outras espécies florais também podem estar envolvidas. A baixa ocorrência de barbatimão nas áreas afetadas pela CEB no estado do Rio de Janeiro, constatada por Pacheco et al. (2008) e Tokarnia (2005), indicam que outros agentes podem estar envolvidos e que há necessidade de estudos mais amplos.

2.6 Os Fungos

Durante muito tempo os fungos foram considerados vegetais, mas a partir de 1969 passaram a ser classificados como pertencentes ao quinto Reino, o Reino Fungi. São seres vivos eucarióticos e podem se apresentar como uni ou pluricelulares, temos como exemplo as leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético (TRABULSI et al., 2002). Os fungos são um grande grupo de microorganismos que podem ser encontrados em diferentes ambientes como solo, água, ar, plantas e matéria orgânica em decomposição, crescendo em quase todos os tipos de substratos (MÁRCIA; LÁZZARI, 1998). Os conídios dos fungos filamentosos são abundantes e amplamente encontrados na natureza. De um modo geral, a umidade presente no ambiente favorece a proliferação dos fungos (FONSECA, 2000). Conídios fúngicos podem ser transportados pela água, vento, plantas, entre outros, sendo resistentes a oscilações de temperatura e podendo permanecer dormentes no solo por vários anos (MÁRCIA; LÁZZARI, 1998).

A variação de temperatura do ambiente interfere na atividade de água (A_a) do substrato, que é a quantidade de água livre de um dado substrato que o microorganismo utiliza para crescer e se desenvolver. É considerado de importância, pois quanto maior o seu valor maior será a proporção de água no substrato e conseqüente influência na proliferação e destruição microbiana. São poucos os fungos que são capazes de crescer e se desenvolver em baixas A_a , são os chamados fungos xerofílicos, como exemplos temos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (EL HALOUAT; DEBEVERE, 1997).

A contagem da microbiota total presente no substrato, é de grande importância para verificação da qualidade sanitária do material analisado. Para o estabelecimento da carga

fúngica em ufc g⁻¹ são utilizados meios de cultura específicos. Entre eles estão o agar dicloran glicerol a 18% (DG18) seletivo para fungos xerofílicos, que por possuir dicloran na sua fórmula, este meio é um eficaz inibidor de fungos da ordem Mucorales (*Rhizopus* sp. e *Mucor* sp., como exemplos) e de bactérias, além de controlar parcialmente o crescimento de fungos de outros gêneros, como o *Trichoderma* (PITT; HOCKING, 1997; BEUCHAT; DAZA, 1992). O meio de cultura agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC), é utilizado para contagem geral de fungos, sendo portanto capaz de simular condições ideais de crescimento da microbiota presente na amostra. Este meio contém rosa bengala (25 mg/kg) e dicloran (2 mg/kg), uma combinação de inibidores eficazes, que restringem o crescimento da maioria dos fungos da ordem *Mucorales*. É um meio muito utilizado, pois permite a identificação de variados gêneros fúngicos, expressando assim a qualidade higiênica do material analisado (PITT; HOCKING, 1997).

Os fungos são deteriorantes de alimentos por excelência, porém muitos deles, quando presentes em alimentos e sob condições de temperatura e umidade adequadas, são capazes de produzir micotoxinas, que são produtos tóxicos do seu metabolismo secundário (ROSA et al., 2006).

A identificação das espécies fúngicas contaminantes é um importante sinalizador quanto a potencial presença de micotoxinas nos substratos. Entretanto, o isolamento e a identificação desses fungos nem sempre estão ligados à detecção de micotoxinas no substrato analisado, considerando que existem cepas de uma mesma espécie que podem não apresentar capacidade toxígena quando as condições ambientais não lhe forem favoráveis, tais como temperatura do ambiente, A_a, presença de oxigênio, entre outros. Logo, para verificação do potencial destes fungos faz-se necessário a utilização de técnicas específicas (FARIAS, 2000).

Aspergillus, *Fusarium* e *Penicillium* são considerados como os principais gêneros produtores de micotoxinas (BATISTA; FREITAS, 2000).

2.6.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* possui mais de 200 espécies, é filamentososo, cosmopolita e distribuído amplamente na natureza. Comumente é isolado do solo, debris de plantas e, ambientes fechados; encontra-se em maior abundância nas regiões de climas tropicais e subtropicais (PITT; HOCKING, 1997).

Este gênero pertence à classe dos Hyphomycetes. Sua reprodução ocorre de forma anamórfica através de conídios, embora algumas espécies apresentem a forma teleomórfica do tipo ascosporada (Euscomycetidae), como é o caso do *A. nidulans*. As espécies são aeróbicas e encontradas em ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem na superfície do local que vivem (KLICH, 2002).

A diferenciação das espécies de *Aspergillus* é realizada a partir da avaliação macro e microscópica do fungo. Na avaliação macroscópica, as características para a identificação das espécies são: coloração dos conídios, diâmetro da colônia (que pode variar conforme o período de incubação da cepa, composição do meio de cultura utilizado e temperatura), coloração do micélio (usualmente branca, porém pode variar de acordo com a espécie), exsudato (presença ou ausência de micro gotas formadas na superfície do micélio), pigmento solúvel (presença ou ausência de pigmento formado à margem da colônia), esclerócios (presença ou ausência de massas firmes de hifas na superfície da colônia, geralmente em formato esférico e coloração escura), células de Hülle (presença ou ausência de massas de células, produzidas por algumas espécies deste gênero) e coloração do reverso da colônia. O crescimento é, em geral, rápido a moderadamente rápido, quando utilizados os meios específicos para a identificação das espécies deste gênero, variando em um período de incubação de cinco a sete dias, a temperatura média de 25°C (KLICH, 2002).

Microscopicamente, possuem hifas regulares e septadas, estipes robustas com paredes espessas geralmente não septadas, formadas a partir de uma célula pé. Através da estipe forma-se a vesícula, que varia em tamanho e formato (globoso ou esférico, piriforme, espatulado ou clavado) conforme a espécie. As vesículas podem originar diretamente as fiáldes (uniseriados) ou pode ocorrer uma camada intermediária entre as fiáldes e a vesícula, chamada de métulas (biseriados) (Figura 4). A partir das fiáldes são formados os conídios, que pode ser de diferentes tamanhos, formas e superfícies (lisa, finamente rugosa ou rugosa) de acordo com a espécie (XAVIER, 2008).

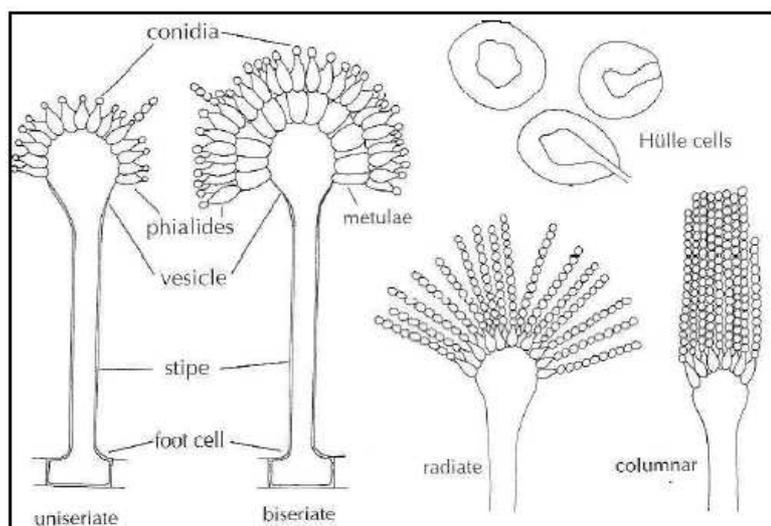


Figura 4: Características morfológicas básicas representativas do gênero *Aspergillus*.

Fonte: SAMSOM et al. (2000).

A forma teleomórfica do gênero *Aspergillus* se caracteriza pela presença de cleistotécio, asco e ascosporos representada pelos gêneros *Eurotium*, *Neosartorya* e *Emericella* (TEIXEIRA, 1994).

Estas características estáveis, combinadas com outras primárias e secundárias constituem a base para a taxonomia clássica do gênero (KLICH, 2002).

Muitas espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir metabólitos tóxicos. Duas dessas importantes toxinas são: aflatoxina B₁ e ocratoxina A.

2.6.2 Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é formado por fungos filamentosos encontrados no solo, na vegetação em decomposição e no ar, com maior diversidade em termos de número de espécies. São pouco exigentes no aspecto nutricional, podendo crescer em quase todos os tipos de ambientes, com diferentes temperaturas e A_a (MACHADO, 2006).

Este gênero pertence à classe dos Hyphomycetes. Sua taxonomia é difícil, já que suas espécies apresentam a cor e colônias de aparência similares, e suas estruturas reprodutivas são pequenas. Em situações controladas de ambiente e temperatura, a identificação das estruturas microscópicas e o aspecto das colônias tornam-se facilitadas (PITT; HOCKING, 1997).

Suas colônias são filamentosas, com texturas variadas (aveludada ou flocosa). Sua coloração é inicialmente branca, alterando-se a azul esverdeado, verde acinzentado, verde oliva, até amarelado ou rosado. Apresentam como características macroscópicas de importância em sua identificação: o diâmetro das colônias; a presença ou ausência de exsudato, pigmento solúvel e sulcos; presença, tamanho e cor de esclerócios; coloração do reverso da colônia; e coloração do micélio (PITT; HOCKING, 1997).

Microscopicamente, apresentam hifas hialinas septadas, conidióforos simples ou ramificados formando um “pincel” (são formados por fiálides, métulas e conídios). As métulas são ramos secundários que se formam a partir dos conidióforos de algumas espécies de *Penicillium*, e que transportam as fiálides. A organização das fiálides nas pontas dos conidióforos é muito típica, e podem ser de dois tipos: ampuliformes e acerosas. Os conídios são redondos, unicelulares, e visualizados como cadeias nas pontas das fiálides. (LARONE, 1995). Distinguem-se pelo número de pontos de ramificação entre as fiálides e a estipe (estrutura do conidióforo). O tipo mais simples designa-se monoverticilado, pois a fiálide se conecta diretamente a estipe, ou seja, há apenas um ponto de ramificação. O biverticilado tem métulas entre a fiálide e a estipe, apresentando dois pontos de ramificação. O triverticilado contém métulas e ramos, entre a fiálide e a estipe, formando três pontos de ramificação, e quando existem quatro pontos de ramificação entre as estruturas citadas, designa-se quaterverticilado (MACHADO, 2006; PITT; HOCKING, 1997) (Figura 5).

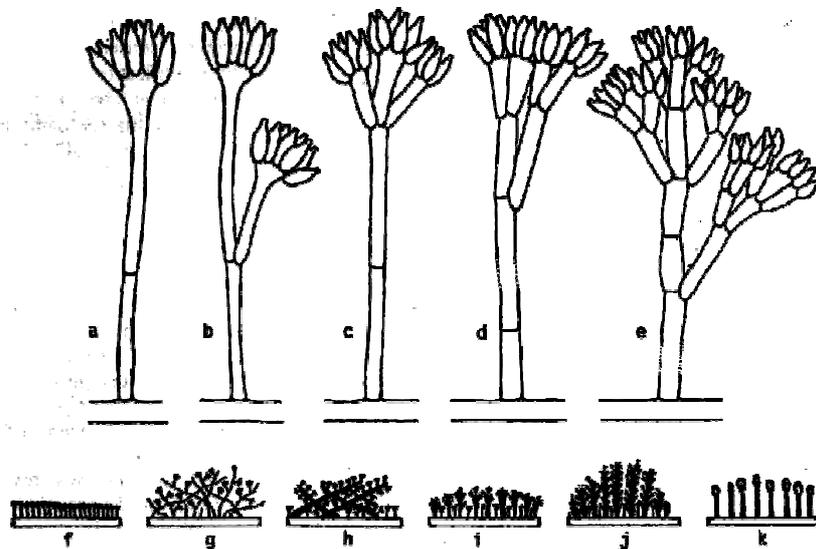


Figura 5: “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, triverticilado; e, quaterverticilado. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada.

Fonte: SAMSON et al. (2000).

São identificadas em chave específica as características morfológicas básicas em diferentes meios de cultivo, e a identificação de subgênero conforme mostra Figura 6. Subseqüentes, dentro de cada subgênero são identificadas suas respectivas espécies, segundo Pitt (1988).

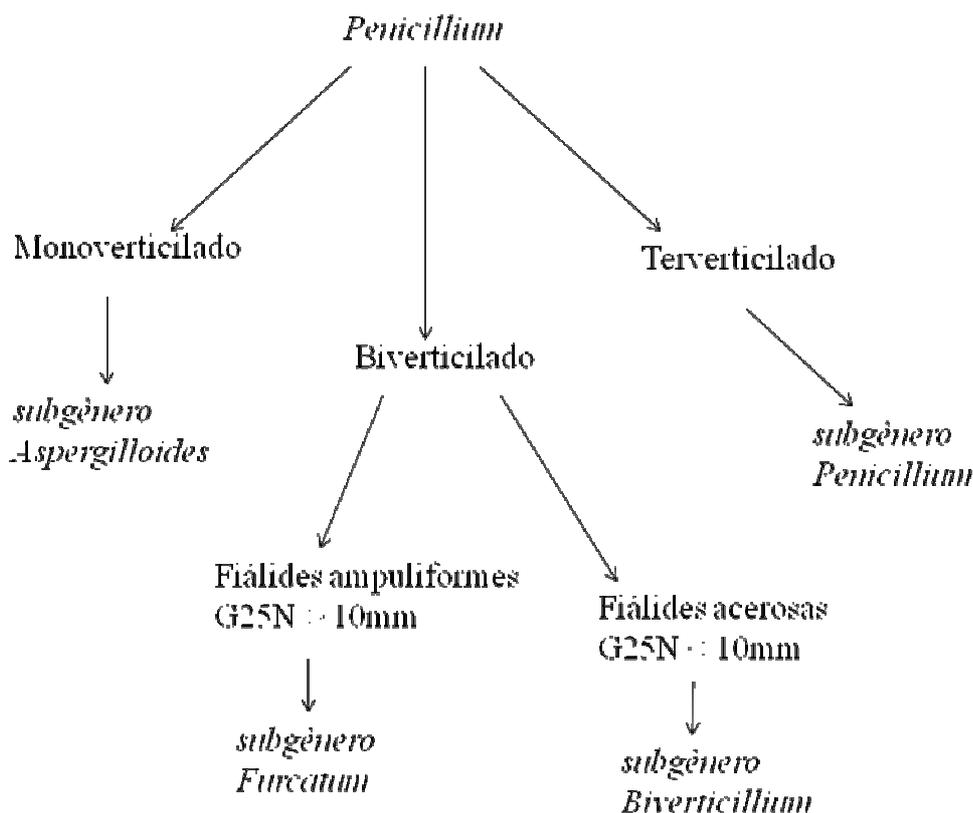


Figura 6: Chave específica para identificação de subgênero do gênero *Penicillium*.

Fonte: PITT, 1988.

2.6.3 Os fungos no mel

Existem escassos relatos em literatura mostrando a presença de fungos contaminantes de mel em favo. Alves et al. (2009), analisaram em seu estudo 24 amostras de mel orgânico, sendo que 22 amostras coletadas diretamente nas melgueiras das colônias. As amostras foram coletadas em três apiários, localizados no alto Rio Paraná, nas imediações de Porto Brasília, em Querência do Norte, Paraná (PR). Foram feitas análises para a enumeração de fungos e leveduras (ufc g⁻¹). Estes autores encontraram contagem fúngica com valor máximo de $3,8 \times 10^1$ ufc g⁻¹, quando utilizado o meio de cultura agar batata dextrose (BDA).

2.6.4 Os fungos nas crias

Escassos relatos em literatura são apresentados mostrando a presença de fungos contaminantes em crias. Pacheco (2007) estudou a micobiota de amostras de pólen, pão de abelha e crias, coletados em apiários das regiões de Mendes, Petrópolis e Sapucaia, no estado do Rio de Janeiro. Para seu trabalho foram coletadas amostras em duas colméias por apiário, nas categorias de ninho ou melgueira, totalizando 16 amostras de crias mortas. Foi realizada, após a identificação fúngica das espécies, a análise do perfil toxígeno daquelas potencialmente produtoras de micotoxinas. Em seu estudo foram utilizados os meios de cultura BDA e agar Sabouraud ampicilina a 2,0%. Verificou presença de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Beauveria*, obtendo valores de frequência de 2,5%; 7,5%; 7,5% e 2,5%, respectivamente.

2.6.5 Micotoxinas

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários que são tóxicos e às vezes carcinógenos aos animais. Estes são chamados de fungos toxígenos e seus metabólitos de micotoxinas. São conhecidas mais de 80 espécies de fungos toxígenos, que produzem mais de 300 diferentes tipos de micotoxinas (BATISTA; FREITAS, 2000).

O termo micotoxinas foi adotado pela primeira vez em 1962, na Inglaterra, em um surto no qual aproximadamente 100 mil perus morreram. Esta misteriosa doença X dos perus estava relacionada a um farelo de amendoim contaminado com metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus flavus*, as aflatoxinas (BENNET; KLICH, 2003).

Dentre os principais fungos toxígenos destacam-se aqueles dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MARQUARDT; FROHLICH, 1992). Embora existam diferenças geográficas e climáticas para a produção e ocorrência de micotoxinas, a exposição a estas substâncias é mundial (KUIPER-GOODMAN, 2004). Desta maneira, a caracterização e identificação de fungos contaminantes em diferentes substratos são essenciais para o controle da contaminação por estes microrganismos e seu possível potencial produtor de micotoxinas.

Muitas espécies do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir metabólitos tóxicos. As espécies mais importantes destacadas neste estudo são: *A. flavus* e *A. parasiticus*, potenciais produtores de aflatoxinas; e *A. ochraceus*; *A. carbonarius* e *A. niger*; potenciais produtores de ocratoxina A (Tabela 1). Estas duas toxinas são destacadas neste estudo por terem relatos na literatura como possíveis causadoras de doenças em abelhas, já que há confirmação da ação de uma substância tóxica produzida pelos fungos das espécies *A. flavus* e *A. niger* que ocasionaram a morte de abelhas, possivelmente a aflatoxina B₁ (BURNSIDE, 1930) e a ocratoxina A, respectivamente (CORNEJO; ROSSI, 1975).

Tabela 1: Potencial toxígeno das principais espécies de *Aspergillus*.

ESPÉCIES	MICOTOXINAS
<i>A. aculeatus</i>	Ácido Secalônico D
<i>A. candidus</i>	Ácido Kójico, Candidulina, Terfenilina, Xantoacina
<i>A. clavatus</i>	Citochalasina E, Patulina, Clavatul, Triptoquivalonas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarina B, Ocratoxina A
<i>A. carneus</i>	Citrinina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B₁ e B₂ , Aflatrem, Ácido Aspergílico, Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Aflavininas, Ácido 3-Nitropropilônico, Paspalininas
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorgens A e C, Gliotoxinas, Fumigaclavinas, Fumitoxinas, Fumigatinas, Fumagilinas, Espinulosinas, Triptoquivalinas, Verruculogem
<i>A. niger</i>	Ocratoxinas , Malforminas, Naftoquinonas
<i>A. niveus</i>	Citrinina
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂), Ácido Aspergílico, Ácido Kójico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas , Ácido Penicílico, Ácido Kójico, Ácido Secalônico A, Xantomegnina, Viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Ácido 3-Nitropropilônico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) , Ácido Aspergílico, Ácido Kójico, Aflavininas
<i>A. tamarii</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, Patulina, Citreoviridina, Mevinolina, Territrems, Ácido Terréico, Terramide A
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina, Versicolorinas, Nidulotoxinas
<i>A. wentii</i>	Metilxantonas, Ácido 3-Nitropropilônico, Ácido Kójico

Fonte: FRISVAD; SAMSON (1991); PITT; HOCKING (1997).

As aflatoxinas possuem quatro tipos diferentes, são elas: B₁, B₂, G₁ e G₂. São consideradas as primeiras em importância toxicológica na alimentação animal e humana, podendo se desenvolver em diferentes substratos (DIENER et al., 1987).

São substâncias do grupo das bifuranocumarinas produzidas com atividade A_a > 0,7; umidade do ar alta e temperatura do ambiente entre 25°C a 30°C, variando conforme o tipo de substrato (PEREIRA et al., 2002). A aflatoxina B₁ é a mais frequente e a mais tóxica dentro do grupo, possui efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (PRADO, 1999), sendo um potente hepatocarcinógeno para o homem e os animais (IARC, 1993) (Figura 7).

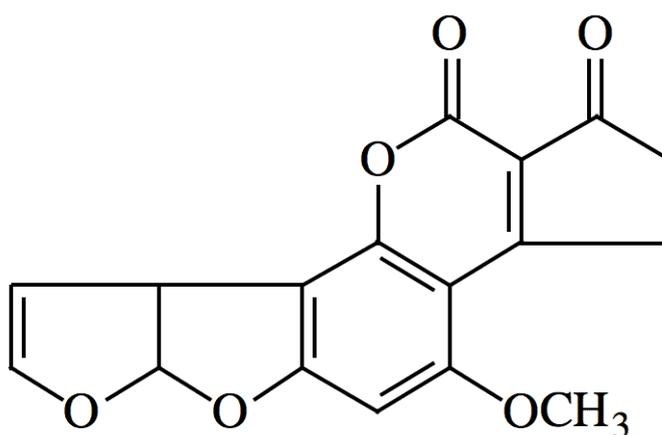


Figura 7: Estrutura química da aflatoxina B₁.

Fonte: JARDIM; CALDAS. 2009

As ocratoxinas possuem sete tipos diferentes, sendo a mais destacada neste estudo, a do tipo “A”. É a segunda em importância toxicológica na alimentação animal e humana, depois das aflatoxinas (BRAGULAT; ABARCA; CABAÑES, 2001). É uma fenilalanina (C₂₀H₁₈ClNO₆) que se deriva da substituição da isocumarina, ou seja, uma dihidro-isocumarina unida a um grupo L-fenilalanina por uma ligação peptídica (Figura 8) (MOSS, 1996).

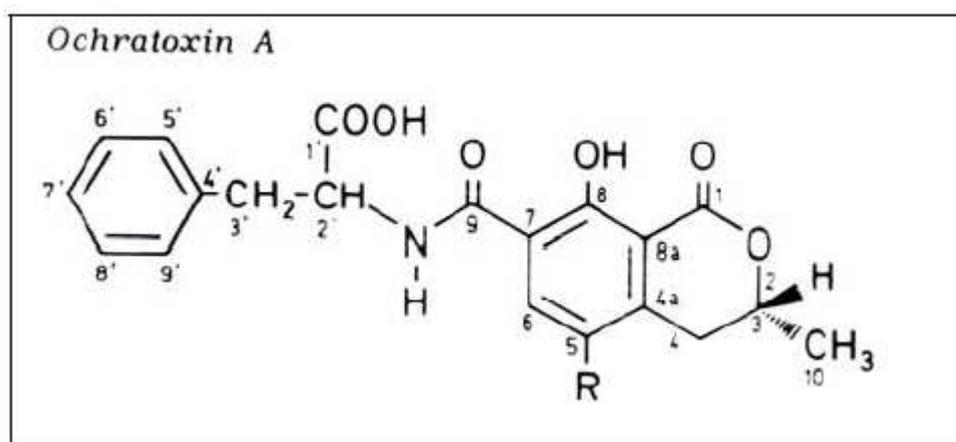


Figura 8: Estrutura química da ocratoxina A.

Fonte: STORMER (1992)

A ocratoxina A (OTA) é produzida por uma série de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, destacadas as espécies *A. ochraceus*; *A. carbonarius* e *A. niger* em regiões de clima tropical, como o Brasil.

Segundo a Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer a OTA foi classificada como pertencente à categoria 2b, isto é, um possível carcinógeno para o homem com evidências para animais (IARC, 1993).

A OTA é muito tóxica e tem associação com nefropatias, toxicidade renal e imunossupressão em várias espécies animais, principalmente suínos (CREPPY, 1999); resultando em parâmetros de desempenho reduzido na produção animal. Esta toxina também foi detectada em soro sanguíneo (ZIMMERLI; DICK, 1995; UENO et al., 1998) e em leite humano (MIRAGLIA et al., 1998), e tem sido relacionada à doença endêmica dos Balcãs (MARQUARDT; FROHLICH, 1992).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem: locais, período e procedimentos

A escolha dos locais de amostragem exigiu que os mesmos fossem próximos ao local de manipulação (laboratório), que houvesse disponibilidade do apicultor para colaborar nas revisões, que fossem regiões endêmicas da CEB e que se dispusesse de apiários com condições mínimas de higiene e do uso da tecnologia apícola.

Neste estudo foram obtidas amostras coletadas nos períodos pré e trans ocorrência da sintomatologia da CEB, provindas do Estado do Rio de Janeiro, dos seguintes Municípios: a) Barra do Piraí, pertencente a mesorregião Sul fluminense (microrregião do Médio Paraíba), que localiza-se a latitude 22°28'12" sul e longitude 43°49'32" oeste, a 363 metros de altitude (FIBGE, 2008); b) Mendes, pertencente a mesoregião Metropolitana (microregião Centro Sul Fluminense), localiza-se a latitude 22°31'36" sul e a longitude 43°43'58" oeste, a 446 metros de altitude (FIBGE, 2008); c) Itaipava, distrito de Petrópolis, pertencente a mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro (microregião Serrana), localiza-se a latitude 22°30'18" sul e a longitude 43°10'44" oeste, a 845 metros de altitude (FIBGE, 2008). A divisão das microrregiões do Estado do Rio de Janeiro pode ser observada na Figura 9.



Figura 9: Regiões do estado do Rio de Janeiro. Divisão político-administrativa.

Fonte: <http://www.codin.rj.gov.br/Regions/Region.htm>

De cada município, utilizou-se um apiário. A instalação de cada apiário é típica para abelhas africanizadas: cavalete individual, distância de mais de 2 metros entre cavaletes, local de clareira (aberto), distante de residências, criações, etc. Cada apiário apresentava no mínimo 15 colméias de abelhas africanizadas, na categoria de ninho mais melgueira, todas bem populosas e em período de produção de mel. De cada apiário selecionaram cinco colméias ao acaso para a amostragem. As revisões para a amostragem eram realizadas no ninho, nos favos centrais e foram realizadas pelo menos duas amostragens por colméia, dependendo da ocorrência da CEB.

Ao total, nos três apiários foram obtidas 43 amostras de mel em favo e 43 amostras de crias (larvas e pupas) do ninho das colméias. As coletas ocorreram sempre no turno da manhã,

desde que com clima favorável (céu aberto), no período de agosto de 2009 a janeiro de 2010, conforme últimos surtos descritos por Pacheco (2007). A amostragem de Barra do Piraí e Mendes ocorreu de Setembro a Outubro, que correspondeu ao período de “seca” e a de Itapaiva de Dezembro a Janeiro, correspondeu ao período chuvoso.

De cada colméia foi coletada uma amostra de mel em favo, com corte de aproximadamente 5 cm de diâmetro, comumente formada por mel verde. Da mesma forma, de cada colméia selecionada foi coletado um *pool* amostral de cinco crias cada. O corte dos favos foi feito com o auxílio de bisturi estéril, durante todo o procedimento de amostragem a higiene de coleta foi absoluta, e as amostras foram acondicionadas em frascos coletores de polipropileno estéreis, sob refrigeração desde a coleta até o processamento, que foi realizado nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ. Este processo transcorreu em período máximo de 24 horas.

No período de coleta trans sintomatologia da doença, foram coletadas crias com característica da CEB. Não foi possível se efetuar mais de duas amostragens no ninho, já que este procedimento provoca forte estresse nas colméias. Assim, nem sempre foi possível se obter amostras de colméias com sintomas da CEB, como ocorreu com Barra do Piraí, embora esta doença possa ter ocorrido pós-amostragem. Considera-se que, mesmo sem os sintomas, é provável a presença do vetor também neste município, logo foram coletados apenas amostras sem sintomatologia da CEB, fato este que ocasionou variação de amostras entre os municípios.

No laboratório, as crias foram discriminadas por município, com e sem sintomatologia aparente da CEB, foram maceradas e homogeneizadas com diluente específico. As amostras de méis foram também separadas por município, com e sem sintomatologia aparente da CEB e armazenadas sob refrigeração a temperatura média de 5°C, para posterior análise segundo metodologia específica.

3.2 Determinação da atividade de água das amostras

As amostras de mel em favo foram imediatamente analisadas quanto a A_w , em equipamento AquaLab® modelo CX 2 (Figura 10).

Cada amostra foi colocada em um recipiente próprio, de modo a preencher aproximadamente 1/3 de sua capacidade. O aparelho foi calibrado com soluções-padrão de água destilada antes de cada aferição. As análises foram realizadas em sala climatizada, em temperatura média de 20°C.



Figura 10: Equipamento AquaLab® modelo CX 2

3.3 Isolamento e identificação da microbiota contaminante do mel

A análise das amostras de mel realizou-se através do método de diluição decimal seriada em placa para isolamento e contagem da microbiota total (PITT; HOCKING, 1997). A quantidade de 10mL de cada amostra de mel em favo foi devidamente pesada em balança calibrada e colocada em Erlenmeyer estéril com 90 mL de água peptonada 0,1% estéril (diluição 10^{-1}), onde foram devidamente homogeneizadas. Diluições seriadas 1/10 da solução anterior foram realizadas colocando 1,0 mL em 9,0 mL do mesmo diluente (diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), e alíquotas de 0,1 mL foram semeadas nos meios de cultivo DRBC e DG18 (Figura 11). As placas foram incubadas durante cinco a sete dias a 25°C para o crescimento das colônias. Após crescidas, estas foram repicadas em tubos de agar extrato de malte (MEA) inclinados, aguardando novamente o crescimento das mesmas em condições idênticas às das placas. Após o crescimento das colônias, os tubos foram conservados a temperatura média de $5,0^{\circ}\text{C}$. A identificação em nível de gênero foi realizada de acordo com suas características macro e microscópica (SAMSON et al., 2000; PITT; HOCKING, 1997). As cepas de fungos isoladas foram então identificadas segundo as chaves taxonômicas apropriadas de cada grupo particular: Klich (2002) para o gênero *Aspergillus* e Pitt (1988) para o gênero *Penicillium*.

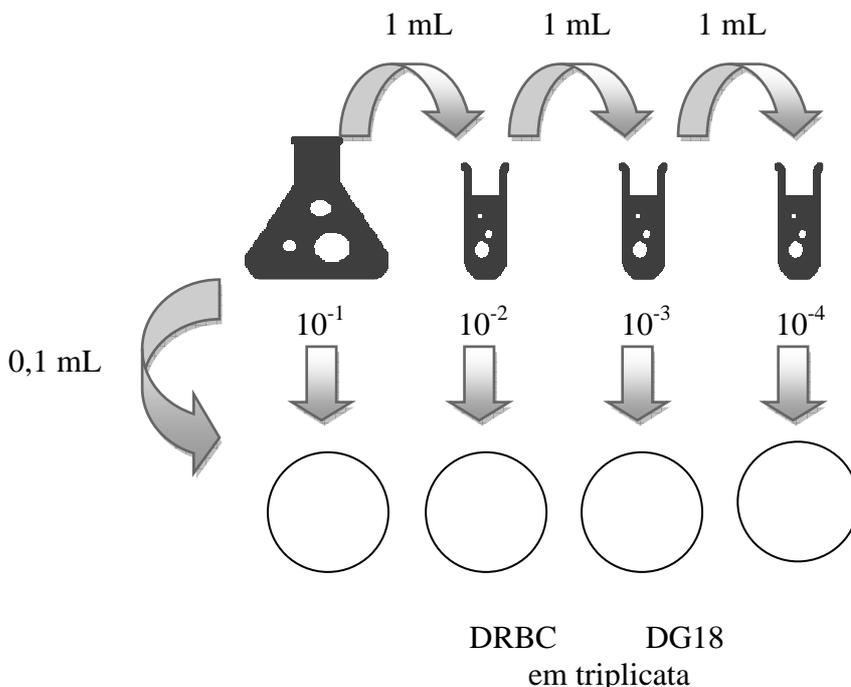


Figura 11: Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias por grama (ufc g^{-1}).

A marcha de identificação taxonômica de *Aspergillus* spp. foi baseada na semeadura padrão em três meios básicos segundo Klich (2002) (Figura 12): agar Czapek extrato de levedura (CYA); agar Czapek extrato de levedura sacarose a 20% (CY20S) e MEA .

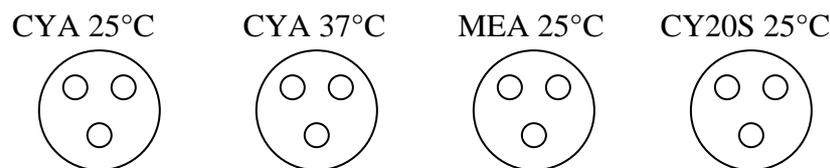


Figura 12: Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas controladas (25°C e 37°C).

A identificação taxonômica das espécies de *Penicillium* sp. foi realizada através da chave proposta por PITT (1988) e foi baseada na sementeira em três meios básicos composto por CYA; MEA e agar nitrato glicerol a 25% (G25N) conforme Figura 13.

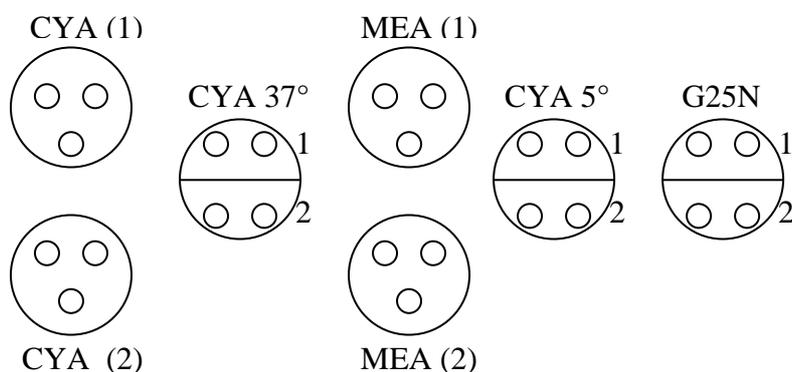


Figura 13: Esquema de inoculação e incubação das duas cepas (1 e 2) do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperaturas controladas (25°C, 37°C e 5°C).

3.4 Isolamento e identificação da microbiota contaminante das crias

A análise micológica das amostras de crias realizou-se utilizando a diluição 10^{-1} , que foi preparada com um total de cinco larvas devidamente trituradas, pesando em média 0,1g cada uma, com posterior adição de 4,5 mL de água peptonada 0,1%. Alíquotas de 0,1 mL deste preparado foram inoculados nos meios de cultivo DRBC e DG18. As placas foram incubadas durante cinco a sete dias a 25° C para o crescimento das colônias, após desenvolvidas estas foram repicadas em tubos de MEA inclinados (em condições idênticas à incubação inicial das placas de meios DRBC e DG18). Após desenvolvidas as colônias nos tubos, estes foram conservados em temperatura média de 5,0 °C. A identificação em nível de gênero e a identificação das espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram realizadas de acordo com suas características macro e microscópicas, segundo chaves específicas citadas no item 3.3.

3.5 Caracterização do perfil toxígeno de espécies isoladas

Para as espécies produtoras de aflatoxinas (*A. flavus* e *A. parasiticus*) a determinação do perfil toxígeno foi feita segundo metodologia de Geisen (1996) com modificações, em que as cepas foram cultivadas em MEA a 25°C por sete dias. Após a incubação, foram retirados com auxílio da alça de platina, três fragmentos equidistantes de cada colônia e transferidos para microtubos onde foram adicionados 1,0 mL de clorofórmio. Os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos a 4000 rotações por minuto (rpm). A solução sobrenadante

foi separada com o auxílio de uma pipeta, e em seguida colocada em novos microtubos que foram acomodados em uma estante, para evaporação passiva em temperatura ambiente durante 24 horas, foram então armazenados em ambiente refrigerado a temperatura abaixo de 0°C. Para detecção por cromatografia em camada delgada (CCD) o conteúdo foi ressuspensionado em 1,0mL de clorofórmio.

Para as espécies produtoras de OTA (*A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger*) a determinação do perfil toxígeno foi feita segundo metodologia de Bragulat; Abarca; Cabañes (2001) com modificações. Metodologia esta que é a mesma daquela citada anteriormente, modificando apenas o solvente de extração utilizado, no qual a última faz uso do metanol.

3.6 Análises estatísticas

As análises dos dados foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Todos os dados foram testados para normalidade a partir do teste de Shapiro Wilk e em caso de ausência de normalidade foram transformados usando a função logarítmica $\log_{10}(x + 1)$ para a realização da ANOVA. O teste de Duncan foi utilizado na comparação entre as regiões baseado nos dados de enumeração fúngica nos diferentes meios de cultivo. O nível de significância para informar as diferenças foi de $\alpha = 5\%$. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (SAS Institute, Cary, NC).

Foram testadas as variáveis entre as localidades e entre amostras coletadas com e sem sintomatologia da CEB.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da atividade de água

As análises de atividade de água (A_w) realizadas em amostras de mel em favo apresentaram-se com valor médio de 0,62. A análise dos resultados não mostrou diferenças significativas entre as localidades.

4.2 Contaminação fúngica

4.2.1 Amostras de Mel em favo

Os valores obtidos para a carga fúngica contaminante das amostras de mel em favo, expressa através de \log_{10} em ufc g^{-1} , encontram-se apresentada na Tabela 2, segundo as localidades de coleta.

Tabela 2: Contagem total, em \log_{10} de ufc g^{-1} , dos fungos filamentosos isolados nas amostras de mel em favo de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Mel em favo (n=43)		DRBC (média)	DG18 (média)
Barra do Pirai (n=14)	Sem sintomas	4,52 ^a	4,76 ^a
	Com sintomas	NA	NA
Mendes (n=17)	Com sintomas	4,34 ^a	4,25 ^a
	Sem sintomas	3,45 ^b	4,11 ^a
Itaipava (n=12)	Com sintomas	5,00 ^a	4,68 ^a
	Sem sintomas	4,77 ^a	4,71 ^a

^a letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (p valor $\leq 0,05$).

NA não aplicável.

Os resultados apresentados na contagem total (DRBC) dos fungos filamentosos indicaram que não houve diferença significativa entre os apiários de Barra do Pirai e Itaipava (ambos apresentaram contaminação de 10^4 ufc g^{-1}). No município de Mendes verificou-se uma contaminação significativamente menor (10^3 ufc g^{-1}) quando comparados às outras localidades.

Para a análise de fungos xerofílicos (DG18), observou-se que não houve diferença significativa entre os municípios de Barra do Pirai, Mendes e Itaipava.

4.2.2 Amostras de Crias

A contagem geral dos fungos filamentosos obtida a partir de amostras de crias coletadas em períodos com e sem sintomatologia da CEB encontra-se expressa, através de \log_{10} em ufc g^{-1} , na tabela 3.

Tabela 3: Contagem total, em \log_{10} de ufc g^{-1} , dos fungos filamentosos isolados das amostras de crias de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Crias (n=43)		DRBC (média)	DG18 (média)
Barra do Piraí (n=14)	Sem sintomas	2,64 ^a	2,23 ^a
	Com sintomas	NA	NA
Mendes (n=17)	Com sintomas	2,90 ^a	3,40 ^a
	Sem sintomas	2,85 ^a	3,04 ^a
Itaipava (n=12)	Com sintomas	3,43 ^{ab}	3,47 ^{ab}
	Sem sintomas	2,78 ^{ac}	2,72 ^{ac}

^a letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p \text{ valor} \leq 0,05$).

NA não aplicável.

Na análise da contagem fúngica das crias, não houve diferença significativa entre as localidades, e entre a presença ou ausência da sintomatologia da doença. Quando analisados os resultados obtidos em Itaipava verifica-se que houve diferença significativa entre crias com sintomatologia da doença e sem sintomatologia da doença; mostrando uma contaminação maior em crias sintomáticas (média de 10^3 ufc g^{-1}) quando comparada as crias assintomáticas (média de 10^2 ufc g^{-1}).

Para os municípios de Mendes e Barra do Piraí não foram observadas diferenças significativas entre as contagens fúngicas das amostras.

4.3 Determinação da micobiota

4.3.1 Mel em favo

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontrados na micobiota isolada a partir das amostras sem sintomatologia da doença coletadas a partir do mel em favo, porém outros gêneros podem ser observados conforme Figura 14.

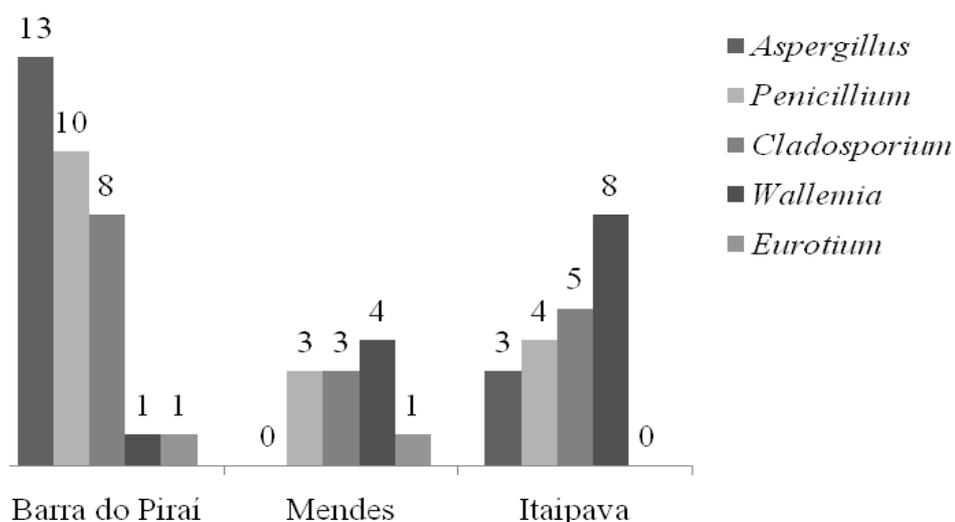


Figura 14: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras do mel em favo de colméias de abelhas africanizadas, sem sintomatologia aparente da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Entre as localidades estudadas, Barra do Pirai apresentou maior frequência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, com 39% (13/33) e 30% (10/33), respectivamente. Para o município de Mendes, não foi identificado o gênero *Aspergillus*. Em Itaipava o gênero fúngico prevalente foi *Wallemia* com frequência de 40% (8/20).

Foram isolados quatro gêneros fúngicos a partir de amostras de mel em favo com sintomatologia da CEB (Figura 15).

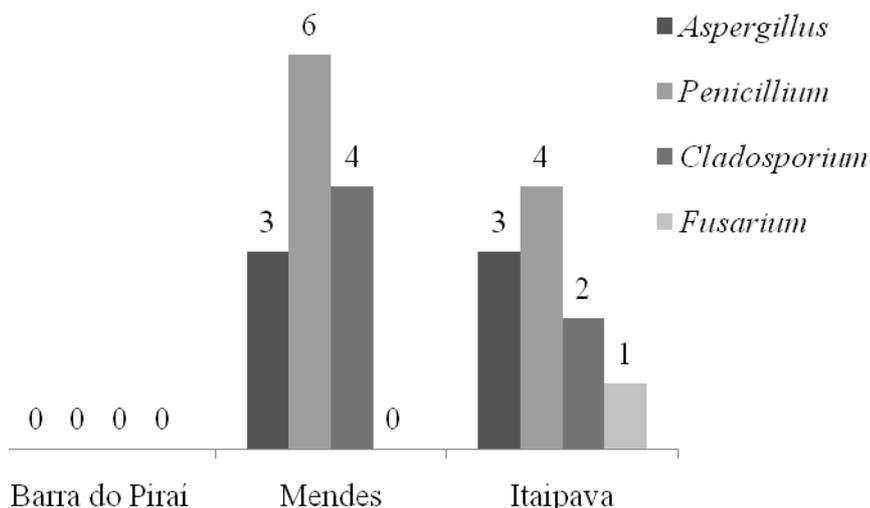


Figura 15: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras do mel em favo de colméias de abelhas africanizadas, com sintomatologia aparente da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

No município de Barra do Pirai não foi identificada a presença de gêneros fúngicos, já que não houve coleta de amostras com sintomatologia da CEB nesta localidade. Houve prevalência do gênero *Penicillium* em Mendes e Itaipava, com frequências de 46% (6/13) e 40% (4/10), respectivamente. Destaca-se a identificação de uma cepa de *Fusarium* sp. em Itaipava, localidade esta que apresentou maior contaminação fúngica no mel em favo.

Cinco espécies de *Aspergillus* foram identificadas nas amostras de mel em favo. Dentre os resultados, destacam-se as que tiveram espécies prevalentes de *A. flavus* e *A. niger* agregados (Tabela 4).

Tabela 4: Número total de cepas das espécies de *Aspergillus* sp. identificadas nas localidades para o mel em favo de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Localidade	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. ochraceus</i>	Total
Barra do Pirai	6(-)	6(-)	4(-)	3(-)	1(-)	20(-)
Mendes	2(2)	1(1)	4(4)	-	-	7(7)
Itaipava	3(1)	4(3)	0(-)	1(-)	-	8(4)
Total	11(3)	11(4)	8(4)	4(-)	1(-)	35(11)

(-) número de cepas identificadas em amostras coletadas com sintomatologia da doença.

Pode-se observar maior contaminação por este gênero no município de Barra do Pirai, com presença de 20 cepas do total de 35 isoladas.

Em Mendes, todas as cepas para *Aspergillus* sp. foram isoladas de amostras com sintomatologia da doença. Já em Itaipava houve prevalência de *A. niger* em amostras coletadas em período com sintomatologia da doença, em que dentre quatro cepas isoladas, três eram pertencentes às amostras de colméias sintomáticas da CEB, ou seja, 75%.

Foram encontradas *A. flavus* e *A. niger* em todas as localidades estudadas, espécies fúngicas potencialmente toxígenas.

Para o gênero *Penicillium* foram identificadas, nas amostras de mel em favo, a presença de oito espécies fúngicas, conforme mostra tabela 5.

Tabela 5: Número total de cepas das espécies de *Penicillium* sp. identificadas nas localidades para o mel em favo de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

<i>Penicillium</i> sp.	Barra do Piraí	Mendes	Itaipava	Total
<i>P. citrinum</i>	6(-)	3(3)	6(2)	15(5)
<i>P. corylophilum</i>	5(-)	-	-	5(-)
<i>P. citreonigrum</i>	1(-)	4(3)	-	5(3)
<i>P. variabile</i>	1(-)	-	-	1(-)
<i>P. brevicompactum</i>	1(-)	-	-	1(-)
<i>P. funicullosum</i>	1(-)	-	-	1(-)
<i>P. implicatum</i>	-	2(-)	-	2(-)
<i>P. janthinelum</i>	-	-	1(1)	1(1)
Total	15(-)	9(6)	7(3)	31(9)

() número de cepas identificadas em amostras coletadas com sintomatologia da doença.

Os resultados mostram a presença de *P. citrinum* em todas as localidades estudadas, totalizando 15 cepas das 31 identificadas para este gênero. Dentre estas 15 cepas, cinco eram pertencentes às amostras com sintomatologia da CEB, sendo três identificadas nas amostras coletadas em Mendes e duas identificadas nas amostras de Itaipava, ou seja, 100% (3/3) das cepas isoladas em Mendes e 33% (2/6) das cepas isoladas em Itaipava.

4.3.2 Crias

Foram encontrados na microbiota isolada a partir das amostras de crias de abelhas sem sintomatologia da CEB os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Wallemia* e *Eurotium* conforme Figura 16.

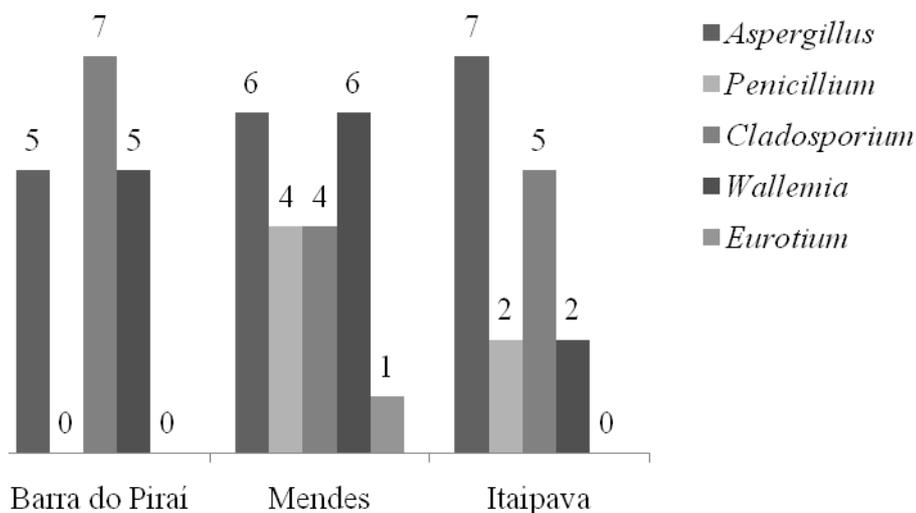


Figura 16: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras de crias de colméias de abelhas africanizadas sem sintomatologia da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Os resultados mostram a presença do gênero *Aspergillus* em todas as localidades, com frequências de 29% (5/17) em Barra do Pirai, 28% (6/21) em Mendes e 44% (7/16) em Itaipava.

Para o Município de Barra do Pirai não foram identificadas cepas do gênero *Penicillium*. Em Mendes e Itaipava este gênero fúngico foi encontrado com frequência de 19% (4/21) e 12,5% (2/16), respectivamente.

Para as amostras de crias com sintomatologia da doença foram isolados três gêneros fúngicos (Figura 17).

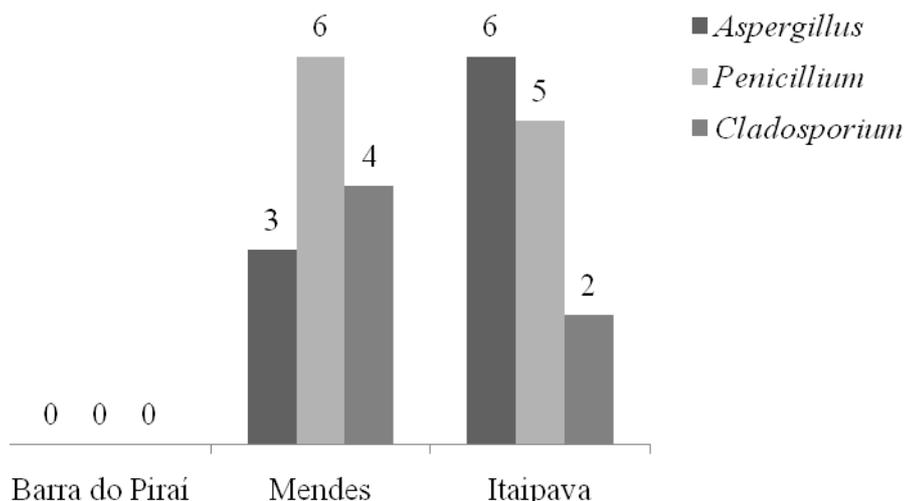


Figura 17: Número de gêneros fúngicos isolados a partir de amostras de crias de colméias de abelhas africanizadas com sintomatologia da Cria Ensacada Brasileira. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Observa-se a ausência de gêneros fúngicos isolados em Barra do Pirai, pois não foi coletado amostras com sintomatologia da CEB nesta localidade.

Os resultados mostram prevalência de *Penicillium* sp. em Mendes e de *Aspergillus* sp. em Itaipava, ambos com frequência de 46% (6/13).

Seis espécies de *Aspergillus* foram identificadas nas amostras de crias. Dentre os resultados as espécies *A. flavus* e *A. fumigatus* foram identificadas em todas as localidades estudadas (Tabela 6).

Tabela 6: Número total de cepas das espécies de *Aspergillus* sp. identificadas nas localidades para crias de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

<i>Aspergillus</i> sp.	Barra do Piraí	Mendes	Itaipava	Total
<i>A. fumigatus</i>	3(-)	5(-)	2(-)	10(-)
<i>A. flavus</i>	2(-)	5(3)	13(6)	20(9)
<i>A. oryzae</i>	1(-)	-	-	1(-)
<i>A. versicolor</i>	-	1(1)	-	1(1)
<i>A. candidus</i>	-	1(-)	2(-)	3(-)
<i>A. niger</i>	-	-	7(4)	7(4)
Total	6(-)	12(4)	24(10)	42(14)

(-) número de cepas identificadas em amostras coletadas com sintomatologia da doença.

Foram isoladas, nas amostras de crias, um total de 42 cepas para o gênero *Aspergillus*, dentre estas 14 estavam presentes em amostras com sintomatologia da doença, ou seja, 33,3%.

Os resultados revelam como espécies prevalentes, em amostras com sintomatologia da CEB, *A. flavus* e *A. niger* agregados. *A. flavus* foi encontrado com frequências de 41,6% (5/12) em Mendes e 54,2% (13/24) em Itaipava, e *A. niger* foi encontrado em 29,2% (7/24) das cepas isoladas para a localidade de Itaipava.

Para o gênero *Penicillium* três espécies fúngicas foram isoladas, conforme demonstrado na tabela 7.

Tabela 7: Número total de cepas das espécies de *Penicillium* sp. identificadas nas localidades para crias de colméias de abelhas africanizadas. Estado do Rio de Janeiro. 2010.

Localidade	<i>P. citrinum</i>	<i>P. corylophilum</i>	<i>P. implicatum</i>	Total
Barra do Piraí	-	-	-	-
Mendes	6(3)	4(3)	-	10(6)
Itaipava	5(4)	1(0)	1(1)	7(5)
Total	11(7)	5(3)	1(1)	17(11)

(-) número de cepas identificadas em amostras coletadas com sintomatologia da doença.

No Município de Barra do Piraí não foram identificadas cepas do gênero *Penicillium* nas amostras de crias analisadas.

Dentre os resultados foram observados prevalência da espécie *P. citrinum* em Mendes e Itaipava, com frequências de 60% (6/10) e 71,4% (5/7), respectivamente. Também se pode verificar a prevalência desta espécie em amostras com sintomatologia da CEB, com frequências de 50% (3/6) em Mendes e 80% (4/5) em Itaipava.

4.4 Perfil toxígeno

O resultado obtido através da análise por CCD das cepas fúngicas do gênero *Aspergillus*, encontradas nos méis, foi negativo, isto é, nenhuma das espécies deste gênero mostrou-se micotoxígenas em todas as localidades estudadas.

Na análise da microbiota das crias, 50% das cepas de *A. flavus* em Barra do Pirá e 7,7% das cepas de *A. flavus* em Itaipava, foram positivas para a produção de aflatoxinas. Dentre as cepas de *A. niger* isoladas, nenhuma foi produtora de OTA, quando analisadas por CCD.

5 DISCUSSÃO

A análise da A_a das amostras evidencia que o substrato não deveria ser favorável ao crescimento microbiano (valor médio de 0,62 para mel em favo). Marassi et al. (2010) obtiveram valores para A_a de mel comercial de 0,55 (média), de amostras obtidas no Estado do Rio de Janeiro. A diferença verificada deve-se ao momento de maturação do mel, que em favo do ninho de colméias no início de florada tende a ser de mel verde e o de mel comercial de mel maduro.

O mel verde encontrado na proximidade da área de crias, serve ao consumo destas. E comumente pode apresentar um alto teor de umidade, e de A_a . Entretanto, os valores obtidos no mel verde deste experimento foram baixos, quando comparados ao valor de 0,61 e de 0,85 que são valores que favorecem o crescimento de leveduras osmofílicas (FRANCO; LANDGRAF, 2008) e *Aspergillus flavus*, respectivamente (AFONSO JÚNIOR, et al. 2003). Esta condição do substrato deveria inibir a presença de esporos fúngicos contaminantes do mel. Considera-se que outros fatores internos a colméia, como o pão de abelha e outros substratos possam estar favorecendo a manutenção da biota fúngica.

Os resultados encontrados para contaminação fúngica no mel em favo discordam dos encontrados por Alves et al. (2009), em que estes autores relataram valores máximos de $3,8 \times 10^1$ ufc g^{-1} (média) e em nosso estudo de $2,0 \times 10^5$. Esta diferença deve-se a origem amostral: em nosso estudo originaram-se de colméia (do seu ninho) enquanto que nos autores supracitados de mel comercial, além das diferentes condições climáticas entre as regiões e também devido aos distintos meios de cultura: Alves et al. (2009), empregou o BDA, enquanto nosso estudo utilizou meios DRBC e DG18 (PITT; HOCKING, 1997). O BDA é um meio comumente preconizado para isolamento, cultivo e contagem geral de fungos e leveduras em alimentos e produtos lácteos, permitindo isolamento de fungos *Trichoderma* e *Fusarium*.

No geral, a contaminação fúngica do mel em favo de colméias de abelhas africanizadas foi alta em todas as localidades estudadas, mas destaca-se a do município de Itaipava como a maior contaminação aparente. Esta diferença é devida a fatores locais, como a umidade, em que esta localidade teve sua amostragem realizada no período chuvoso (estação verão). Fatores de manejo peculiar ao apicultor também podem ter favorecido a maior contaminação, como a revisão em intervalos estreitos (menor que 15 dias) e o período do dia (manhã). A contaminação pode ter ocorrido também por fontes secundárias e fatores ambientais, já que é um experimento em campo, e pode sofrer variações provocadas por fatores ambientais, como vento, insetos, poeira, animais, entre outros.

A alta contagem fúngica das amostras analisadas de mel em favo implica na sua reprovação. Embora a legislação não apresenta padrões microbiológicos para mel, ao se comparar aos valores permitidos para a alimentação humana, segundo a Portaria nº 451/97-do Ministério da Saúde (MS), estes valores superaram o limite aceito para assegurar a qualidade higiênica do mel ($1,0 \times 10^2$ ufc g^{-1}) para fungos e leveduras. Infelizmente, esta Portaria foi revogada pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2 de janeiro de 2001, que naquela época considerou o mel, em nosso país, como um produto sujeito a baixa contaminação por microorganismos. Este estudo mostra que o mel pode apresentar índices altos de ufc g^{-1} e merece especial atenção pelo governo, no sentido de vigiar a questão sanitária dos apiários e monitorar a ocorrência de focos de doenças.

A análise da contaminação fúngica das crias revelam valores superiores para com sintoma da doença, ao se comparar com as crias sem sintomas, possivelmente, isto é um forte

indício da susceptibilidade das larvas à contaminação fúngica secundária. Ressalta-se que mesmo nas crias sem sintomas, a contagem foi alta, apesar da condição de homeostase e de higiene do ninho da colméia, por ser esta a área da maternidade, onde os cuidados são redobrados pelas abelhas. Os favos das crias no ninho são os mais revestidos de própolis, substrato de desinfecção e de isolamento térmico, conhecido por seu poder germicida contra microrganismos (FREE, 1987). As crias sem sintomas podem assim adoecer a qualquer momento, dependendo de algum fator de estresse.

Na determinação da microbiota em amostras de mel em favo, todas as localidades apresentaram presença de gêneros potencialmente toxígenos, como *Aspergillus* e *Penicillium*, nas amostras originárias de período com e sem sintomatologia da doença, fato este que pode indicar ausência de relação destes fungos com a CEB. Porém, a presença destes gêneros e de espécies possíveis causadoras de doenças em abelhas, como *A. flavus* e *A. niger*, nas localidades de Mendes e Itaipava, indicam o contrário, ou seja, que pode existir a relação destas espécies com a doença em questão, o que exige cuidadosa pesquisa.

Em Itaipava, espécies de *Fusarium* foram encontradas em amostras de mel coletados em áreas com sintomatologia da doença, o que poderia indicar possível relação deste gênero, que é um potencial produtor toxígeno, com a CEB. Porém, a ausência deste fungo em amostras coletadas com sintomas da CEB, no município de Mendes, descartaria uma possível relação deste gênero com a CEB, o que exige mais estudos.

Na determinação da microbiota em amostras de crias, o gênero *Cladosporium* é o único presente em todas as localidades. Já o gênero *Wallemia* foi encontrado somente em áreas sem sintomatologia da doença. Estes gêneros são amplamente distribuídos no ar e matéria orgânica em decomposição, podendo ser frequentemente isolados como contaminantes nos substratos em geral (PITT; HOCKING, 1997).

Os resultados deste trabalho concordam parcialmente com os de Pacheco (2007), uma vez que no presente estudo foram encontrados valores inferiores a 50% na frequência de *Aspergillus* sp., com exceção de Mendes (crias sem sintomatologia da doença), em que foram verificados valores superiores a 50%. Esta similitude pode ser explicada pelo uso do mesmo tipo de substrato (crias) e de coleta em mesma ambiência.

Deve-se destacar que a presença da espécie *A. flavus* em todas as localidades estudadas, que podem ser um importante produtor de micotoxinas (aflatoxinas). Em duas áreas de amostragem com sintomatologia da CEB (Mendes e Itaipava) houve maior número de cepas isoladas, quando comparadas a localidade que não houve amostras com sintomatologia da doença (Barra do Pirai). Observa-se também uma alta frequência destas cepas pertencentes às amostras com sintomas da CEB (60%, em Mendes e 46% em Itaipava). Isto pode indicar um foco de contaminação na área das crias, com aparente relação direta com a CEB. Os resultados mostram também que a presença das espécies isoladas nas localidades estudadas deve constituir um alto risco de contaminação no ambiente da colméia.

Na análise dos resultados das crias sem sintomatologia da doença, encontramos também espécies *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. candidus*, e em Itaipava também se encontrou *A. niger*. Esta análise é discordante da de Pacheco (2007), que verificou a presença de *A. niger* em 100% das amostras de crias analisadas em várias localidades, enquanto que em nosso estudo verificou-se presença desta espécie apenas no município de Itaipava. Esta variação pode ter sido favorecida pelas condições abióticas do período e revela a prevalência de fungos nas regiões sujeitas à CEB.

A presença de *Penicillium* neste estudo, em particular de *P. citrinum* que esteve presente em todas as amostras de crias analisadas, significa outro fator de risco de deteriorização das mesmas. *P. citrinum* é um fungo distribuído mundialmente, com características mesofílicas, seu crescimento varia entre temperaturas de 5-37° C, sendo a

temperatura ótima entre 26-30° C. Tem sido amplamente isolado nos alimentos, sendo considerado o principal produtor da toxina citrinina (PITT; HOCKING, 1997).

A análise do perfil toxígeno de *A. flavus* e *A. niger* reforça a potencialidade produtora de toxinas destes fungos. Burnside (1930) e Cornejo, Rossi (1975) afirmaram a ação de uma substância tóxica produzida por estes fungos que ocasionaram a morte de abelhas, possivelmente as aflatoxinas e a ocratoxina A, respectivamente.

Enquanto que as análises para as cepas fúngicas de *Aspergillus*, por CCD, no mel em favo foram negativas, isto é, nenhuma das espécies deste gênero isoladas no substrato em questão mostrou-se micotoxígena para as toxinas analisadas, na microbiota das larvas 33,3% das cepas de *A. flavus* foram positivas para a produção de aflatoxinas em crias sem sintomatologia da doença, e 8% em crias com sintomatologia da doença. Este resultado pode sinalizar uma relação entre a presença do fungo aflatoxígeno e a ocorrência da CEB em crias de abelhas. Vale observar que os fungos mencionados podem produzir outros tipos de metabólitos secundários, quando em condições favoráveis, que não foram analisados no estudo em questão e que podem estar relacionados também com a etiologia da CEB, o que exige mais estudos.

6 CONCLUSÕES

- Os fungos isolados neste estudo podem estar relacionados com a cria ensacada brasileira (CEB) no Estado do Rio de Janeiro;
- As elevadas contagens fúngicas obtidas a partir de amostras de mel em favo demonstraram que este pode servir como meio de contaminação fúngica no ambiente da colméia;
- *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros mais frequentemente isolados no mel em favo;
- O mel em favo e crias de abelhas podem ser contaminados por *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*, possíveis causadoras de doenças em abelhas;
- Cepas de *Aspergillus* isoladas em mel em favo não foram produtoras de micotoxinas, entretanto, as cepas isoladas em crias podem ser.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, B. X. **Pesquisa de fungos e leveduras de méis não inspecionados comercializados no estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Universidade Estácio de Sá, 2003. Originalmente apresentada como Monografia em graduação (Medicina Veterinária). 52p
- AFONSO JÚNIOR, P. C.; CORRÊA, P. C.; SILVA, F. S. da; RIBEIRO, D. M. Atividade de água, crescimento microbiológico e perda de matéria seca dos grãos de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de produtos agroindustriais**, v. 5, n. 1, p. 17-24, 2003.
- ALI ZADEH, A.; MOSADEGH, M. S. Stonebrood and some other fungi associated with *Apis-Florea* in Iran. **Journal of Apicultural Research**, v. 33, n. 4, p. 213-218, 1994.
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644-650, 2005.
- ALVES, E. M.; TOLEDO, V. A. A.; MARCHINI, L. C.; SEREIA, M. J.; MORETI, A. C. C. C.; LORENZETTI, E. R.; NEVES, C. A.; SANTOS, A. A. Presença de coliformes, bolores e leveduras em amostras de mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas do alto rio Paraná. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2222-2224, 2009.
- ARONSTEIN, K. A.; MURRAY, K. D. Chalkbrood disease in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 20-29, 2010.
- BAILEY, L. Honey Bee Pathology. **Annual Review of Entomology**, v. 13, n. 1, p. 191-212, 1968.
- BAILEY, L.; BALL, B. V. **Honey Bee Pathology**. 2 ed. London: Academic Press, 1991.
- BATISTA, L. R. ; FREITAS, R. F. de. Avaliação da produção de aflatoxinas por espécies do fungo *Aspergillus* associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 1, n. 1, p. 44-49, 2000.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BEUCHAT, L. R.; DAZA, M. S. T. Evaluation of chemicals for restricting colony spreading by a xerophilic mold, *Eurotium amstelodami*, on dichloran-18% glycerol agar. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 2093-2095, 1992.
- BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 139-144, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1690>>. Acesso em 16 de setembro de 2010.

BURNSIDE, C. E. Fungous disease of the honeybee. **United States Department of Agriculture. Technical Bulletin**, v. 149, p. 1-43, 1930.

CAC (Codex Alimentarius Commission). **Revision codex standard for honey**, n. 12, p. 1-7, 2001.

CARVALHO, A. C. P. **Pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* como agente causador da cria ensacada brasileira em *Apis mellifera***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. Originalmente apresentada como Dissertação de Mestrado (Entomologia). 52p.

CASTAGNINO, G. L. B.; FUNAR, S. R. C.; BLUME, E.; ARBOITTE, M. Z.; WEBER, M. N. Doença Cria Giz *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir em abelhas *Apis mellifera* L. na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

CBA (Confederação Brasileira de Apicultura). **Brasil Apícola**. Disponível em: <<http://www.brasilapicola.com.br/brasil-apicola>>. Acesso em: 28 abril 2010.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO O. C. Toxicity of barbatimão to *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica*, under laboratory conditions. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n. 1-2, p. 9-12, 2003.

CORNEJO, L. G.; ROSSI, C. O. **Enfermedades de las abejas. Su profilaxis e prevención**. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1975.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: Manejo e Produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 1996.

CRANE, E. **Livro do Mel**. São Paulo, Brasil: Livraria e Editora Nobel S.A. 1996.

CREPPY, E. E. Human ochratoxycosis. **Journal of Toxicology and Toxin Review**, v. 18, n. 3-4, p. 277-293, 1999.

DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 249-270, 1987.

EL HALOUAT, A.; DEBEVERE, J. M. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 41-48, 1997.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Doenças e inimigos naturais das abelhas**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/doencas.htm>>. Acesso em: 08 jul. 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Produção de mel**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/mel.htm>>. Acesso em: 02 jun. 2010.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**, São Paulo: Atheneu, 2008.

FREE, J. B. **Pheromones of social bees**. 1. ed. Ithaca: Comstock, 1987.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 441-476.

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 388-392, 1996.

GIMENO, A. **Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en al alimentacion animal**. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 20 maio 2010.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, 1993. p. 489-521. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56).

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**, v.34, 2006

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4 ed. Brasília, Brasil: Editora Ministério da Saúde. 2005.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JIMÉNEZ, M.; MATEO, J. J.; HUERTA, T.; MATEO, R. Influence of the storage conditions on some Physicochemical and Mycological Parameters of Honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 64, n.1, p. 67-74. 1994.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KUIPER-GOODMAN, T. **Risk assessment and risk management of mycotoxins in food**. 1 ed. England, London: Mycotoxins in Food. Detection and Control. 2004.

LARONE, D. H. **Medically important fungi. A guide to identification**. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995.

LENGLER, S. **Inspeção e Controle de Qualidade do Mel**. Disponível em: <http://www.sebraern.com.br/apicultura/pesquisas/inspecao_mel01.doc>. Acesso em: 02 out. 2009.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin producing by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 60, n. 12, p. 1466-1469, 1976.

LORENZETTI, E. R.; MARQUES, P.; CALDAS, R. G. **Microbiologia do Mel**. Disponível em: <br.geocities.com/horticultura1/Microbiologiamel.PDF>. Acesso em: 28 fev. 2009.

MACHADO, A. P. S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. Portugal: Escola de Engenharia da Universidade do Minho, 2006. Originalmente apresentada como Dissertação de Mestrado (Tecnologia do Ambiente). 64p.

MARASSI, A. C.; SANTOS, F. S.; DEVEZA, M. V.; KELLER, K. M.; LORENZON, M. C. A. Avaliação micológica do mel comercializado no estado do Rio de Janeiro. In: FÓRUM DO CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 2010, Cuiabá. **Anais 18º congresso Brasileiro de Apicultura**. Cuiabá: CEP, 2010.

MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. A review of recent advances in understanding ochratoxycosis. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3968–3988, 1992.

MÁRCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

MESSAGE, D. Management and disease problems of Africanized bees in Brazil. **The Central Association of Beekeepers**, United Kingdom, v. 1, p. 1-15, 1997.

MESSAGE, D. Doenças, pragas e predadores das abelhas no Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária**, v. 3, n. 15, p. 52-59, 2002.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MONTAMINO, G.; MIRAGLIA, E. Occurrence of ochratoxin A in maternal serum, placenta and folliculum. In: IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 9., 1995, Rome. **Proceedings of IX International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. Colorado: Inc. Fort Collins, 1998.

MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey. **The Bee World**, v. 73, n. 1, p. 5-28, 1992.

MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.

MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. Analysis of the F₁ generation, descendents of Africanized bee colonies with differing defense abilities against the mite *Varroa jacobsoni*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, n. 1, p. 177-179, 1995.

MOSS, M.O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 1, p. 5-9, 1996.

MUTSAERS, M.; ARAÚJO, L. Produtos apícolas: propriedades, processamento e comercialização. **Agromisa**, v. 1, n. 1, p. 22-27, 2006.

PACHECO, M. R. Intoxicação natural de abelhas melíferas pelo "Barbatimão" no Estado do Rio de Janeiro. In: FÓRUM DE DESENVOLVIMENTO DA APICULTURA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2005, Seropédica. **Anais do III Fórum de Desenvolvimento da Apicultura do Estado do Rio de Janeiro**. Seropédica: UFRRJ, 2005.

PACHECO, M. R. **Cria ensacada brasileira em *Apis mellifera* Linnaeus no Estado do Rio de Janeiro: perdas, zoneamento, palinologia e microbiologia**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. Originalmente apresentada como Dissertação de Mestrado (Zootecnia). 69p.

PASSAMANI, L. **Estudo das características físicas, químicas e microbiológica de compostos de mel produzidos no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005. Originalmente apresentada como Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos). 70p.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.

PITT, J. I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2 ed. Sydney, Australia: CSIRO, Division of Food Processing. 1988.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. O.; GAZZINELLI-MADEIRA, J. E. C.; GODOY, I. J.; CORRÊA, B.; JUNQUEIRA, R. G.; FERREIRA, S. O. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ após inoculação com *Aspergillus flavus* link. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 84-87, 1999.

ROCHA, J. S. **Manual técnico: Programa Rio Rural**. Disponível em: <<http://www.pesagro.rj.gov.br/downloads/riorural/05%20Apicultura.pdf>>. Acesso em: 09 maio 2010.

ROSA, C. A. R.; RIBEIRO, J. M. M.; FRAGA, M. E.; GATTI, M; CAVAGLIERI, L. R.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M.; LOPES, C. W.G. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89-96, 2006.

SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centralbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 2000.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequenas Empresas). **Rede Apis Agricultura integrada e sustentável**. Disponível em: < <http://www.apis.sebrae.com.br/>>. Acesso em: 28 abril 2010.

SCIENCE DAILY. **Fungus may be part of bee epidemic**. Disponível em: <<http://www.sciencedaily.com>>. Acesso em: 12 dez. 2009.

SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1-3, p. 1-26, 1996.

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; ROSA, V. P.; MORETI, A. C. C.; CARVALHO, C. A. L. Conteúdo microbiológico de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) dos Estados do Ceará e Piauí. **Boletim de Indústria Animal**, v. 64, n. 1, p. 39- 42, 2007.

STORMER, F. C. Ochratoxin A- A mycotoxin of concern. In: BHATNADAR, D.; LILLEHOJ, E. B.; ARORA, D. K. **Handbook of Applied Mycology: mycotoxin ecological systems**. New York: Mercel Dekker, INC., v. 5, cap. 16, p. 403-432, 1992.

TAVARES, J. P.; MARTINS, I. L.; VIEIRA, A. S.; LIMA, F. A. V.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 350-356, 2006.

TEIXEIRA, M. F. S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicos e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos**. Amazonas: Universidade Federal do Amazonas, 1994. Originalmente apresentada como Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos (Farmácia). 146p.

TOKARNIA, C. Contribuição ao estudo sobre a mortalidade de cria em colméia de *Apis mellifera* no Estado do Rio de Janeiro. In: FÓRUM DE DESENVOLVIMENTO DA APICULTURA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2005, Seropédica. **Anais III Fórum de Desenvolvimento da Apicultura do Estado do Rio de Janeiro**. Seropédica: UFRRJ, 2005. p. 22-23.

UENO, Y.; MAKI, S.; LIN, J.; FURUYA, M.; SUGIURA, Y.; KAWAMURA, O. A 4-year study of plasma ochratoxin A selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 445-449, 1998.

WELLFORD, T. E.; EADIE, T.; LLEWELLYN, G. C. Evaluation the inhibitory action of honey on fungal growth sporulation, in aflatoxin production. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 28, n. 166, p. 280-283, 1978.

XAVIER, M. O.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; CABANA, A. L.; FILHO, R. P. S.; MEIRELES, M. C. A. Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2008.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced

fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data.
Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 666, n. 1, p. 85-89, 1995.