

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

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

DISSERTAÇÃO

**Fungos e micotoxinas presentes em amostras
de pólen de abelhas melíferas do estado
do Rio de Janeiro**

Michele Valadares Deveza

2011



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

**FUNGOS E MICOTOXINAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE PÓLEN DE
ABELHAS MELÍFERAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

MICHELE VALADARES DEVEZA

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

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.

**Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011**

638.13098153

D491f

T

Deveza, Michele Valadares, 1983-

Fungos e micotoxinas presentes em amostras de pólen de abelhas melíferas do estado do Rio de Janeiro / Michele Valadares Deveza - 2011.

72 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. 66-72.

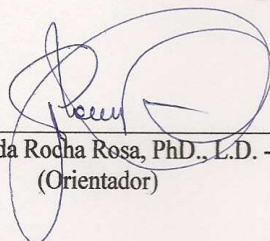
1. Abelha - Pólen - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 2. Abelha - Produtos - Teses. 3. Micotoxinas - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1956-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

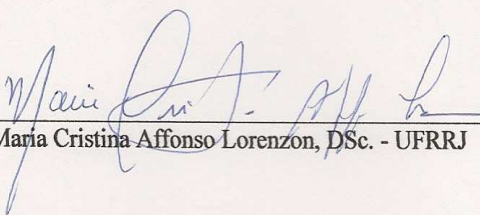
MICHELE VALADARES DEVEZA

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.

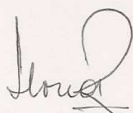
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08/ 02/ 2011



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



Maria Cristina Affonso Lorenzon, DSc. - UFRRJ



Lilia Renée Cavaglieri, DSc. - UNRC, Argentina

Dedico este trabalho a Prof^a Maria Cristina Affonso Lorenzon, as minhas eternas amigas Kelly, Águida e Tatiana. Sem minha determinação e vocês esse trabalho não teria nascido.

“O pé na estrada eu vou botar
Que já tá na hora de ir
Com um lindo horizonte e um céu azul
O que mais eu poderia pedir?
O pé na estrada eu vou botar
E o coração eu quero abrir
Sob os raios do sol
Sigo um sonho meu
Eu não posso deixar de sorrir
Que todos saibam:
Lá vou eu
Por novos caminhos seguir
Com a lua lá no céu a olhar pra mim
Eu vou sob as estrelas dormir
E se a chuva cair
Não vou parar
Qualquer tempestade tem fim
E o vento no meu rosto a soprar,
Me faz sonhar
O que eu quero é caminhar assim
Que todos saibam que lá vou eu
Caminhando eu vou pro meu lar
Sob os raios do sol sigo um sonho meu
Histórias eu vou contar.”

Irmão Urso

Phil Collins

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter realizado um dos meus grandes sonhos que era estudar na UFRRJ, tentei durante 4 anos realizar esse sonho, nunca entendi porque não conseguia. Hoje sei que não era a hora e agora estou realizando um sonho maior que é a conclusão do meu mestrado. Agradeço a ele também por ter me fortalecido em momentos que pensei em fraquejar, momentos tristes, momentos alegres, porém, necessários para o meu amadurecimento profissional e principalmente pessoal.

Aos meus pais pela minha vida, à minha mãe pelas “marmitas” semanais, ao meu pai por nunca me deixar só no alojamento, toda noite com uma palavra carinhosa a me dizer.

Ao meu amado noivo Sidarta Boochimpany Alves que ajudou a me irritar, mas também a me sentir amada muitas vezes.

Aos meus animais de estimação, Docinho, Pipi, Tofi, Zezinho, Cotinha (*in memorian*) e Sadam (*in memorian*) quem perdi recentemente. Sinto tanta falta de você meu amigo! Foram eles que sempre que chorei estiveram ao meu lado, abanando rabinhos, pulando, fazendo bagunça todas as vezes que eu chegava em casa e me dando muito amor sem pedir nada em troca.

À Capes pela bolsa concedida durante esses anos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, por ter acreditado em mim, por ter tido muita paciência comigo, foram tantas conversas... Agradeço também à sua filha Beatriz que foi um anjo enviado por Deus no momento do meu pedido de estágio.

À Prof. Dra. Maria Cristina Affonson Lorenzon por toda a sua dedicação, carinho, orientação, confiança, amizade e que fez nascer em mim uma nova paixão: as abelhas.

À Kelly Moura Keller, o que dizer dessa grande pessoinha, a quem serei eternamente grata por toda a minha vida. Minha eterna “chefinha”, sentirei saudades, muitas saudades... amiga.

À minha amiga, irmãzinha, Tatiana Xavier de Almeida a quem chamo de “meu danoninho preferido”, “minha pequena”. Obrigada pelas caronas divertidas, risos, puxões de orelha, carinho, paciência, obrigada por ser essa pessoa com qualidades tão raras que nunca imaginei que existisse nesse mundo que está cada dia mais difícil de viver.

O que dizer da minha outra irmã, Águida Aparecida de Oliveira, que nos últimos meses se tornou uma das pessoas mais importantes em minha vida, com seus olhinhos e dedinhos milagrosos. Obrigada amiga por ter tido paciência comigo de domingo a domingo. Foi você quem me salvou, me acalmou, me tirou dúvidas nas horas em que eu mais precisei, foi você quem me acolheu em sua casa sem obrigação nenhuma em seu momento de descanso, obrigada amiga por sempre, sempre, me compreender, mesmo na hora em que estive errada, obrigada pelas risadas, confidências, choro, sentimentos compartilhados. O verdadeiro amigo é aquele que está presente quando o resto do mundo desaparece. Amo-te!

Aos meus companheiros de laboratório, pessoas que passaram e outras que ficaram em minha vida, mas que de uma certa forma contribuíram para o meu crescimento principalmente

peçoal durante esses 4 anos: Ana Cláudia Marassi, Beatriz Dias Queiroz, Beatriz de Sousa Monteiro, Carla Alves Soleiro, Caroline da Cruz Bessa, Dalila da Costa Gonçalves, Débora de Castro Rocha, Érica de Oliveira Dias, Francine Siqueira Santos, Ingrid Larissa Araújo Batista, Juliane Martins da Fonseca, Luiz Antonio Moura Keller, Lucila Maria Teixeira Nunes, Matheus Collantes Bahia, Renata Quintela Assad, Tayane Karine Barbosa de Moraes, Tatiana Salomão Barbosa e Thais Ferreira Fagundes.

As meninas do alojamento da pós-graduação da UFRRJ que me acolheram com tanto carinho.

Quando fiz a prova do mestrado não sabia se ia passar, cheguei em casa, conversei com papai do céu e ele me mostrou uma passagem linda e aí sim tive certeza que tinha conseguido, hoje com uma mistura de emoções me despeço com ela.

“O choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã.” Sl 30.5

RESUMO GERAL

DEVEZA, Michele Valadares. **Fungos e micotoxinas presentes em amostras de pólen de abelhas melíferas do estado do Rio de Janeiro**. 2011. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O pólen é um produto apícola rico em nutrientes essenciais para a alimentação das abelhas. Na colmeia ele passa por processos químicos e se torna o pão de abelhas, de extrema importância para o crescimento das larvas. Atualmente, o pólen apícola vem se destacando também na alimentação humana, tanto por suas propriedades terapêuticas, quanto pela sua utilização na indústria alimentícia. Para a produção de um pólen de qualidade a colmeia precisa estar sadia, e as abelhas, como qualquer outro animal, são susceptíveis a várias doenças, parasitas e predadores, que podem prejudicar seu desenvolvimento e produtividade. A Cria Ensacada Brasileira (CEB) é uma dessas doenças, que no Brasil acomete larvas de abelhas melíferas. Em apiários do estado do Rio de Janeiro vêm ocorrendo uma alta mortalidade de larvas com sintomatologia semelhante a da CEB, e ainda não há uma conclusão definitiva acerca do agente etiológico desta doença no estado. Portanto, os objetivos desse estudo visam esclarecer duas problemáticas: 1) avaliar, através de estudo de caso, amostras de pão de abelhas, abelhas adultas e pólen apícola em regiões atingidas e não atingidas pela CEB, diagnosticando a presença de fungos, visando fornecer informações importantes para a elucidação do agente etiológico da CEB no estado do Rio de Janeiro; 2) verificar a qualidade higiênica das amostras de pólen desidratado comercializado no estado do Rio de Janeiro. Um total de 48 amostras de pão de abelhas, 15 de abelhas adultas e 12 de pólen apícola, foram adquiridas de regiões endêmicas da CEB. As coletas ocorreram nos meses que antecederam, durante e após o período da doença. Já as amostras de pólen desidratado foram adquiridas no comércio do estado, totalizando 27 amostras. A enumeração da microbiota (ufc g⁻¹) foi realizada através do método de diluição decimal com semeadura em placas utilizando-se meios de cultivo gerais e seletivos. Foram determinadas a frequência de isolamento dos gêneros fúngicos e a densidade relativa das espécies. Foi determinado o perfil toxígeno de cepas isoladas e foi feita a detecção e quantificação de aflatoxina B₁ no pão de abelhas e pólen apícola. Nos resultados obtidos das amostras do estudo de caso, o pão de abelhas mostrou ser o melhor substrato para o veículo de contaminação para a colmeia. Observou-se também altas contagens fúngicas, além da presença de micotoxinas e fungos entomopatogênicos, como *Aspergillus flavus*, *A. niger* agregados e *A. fumigatus* o que favorece a queda da imunidade desses insetos deixando-os suscetíveis a diversas doenças, entre elas a própria CEB. Em relação ao pólen desidratado, os resultados mostraram uma alta carga fúngica com 92% das amostras em condições higiênicas insatisfatórias segundo os padrões legais consultados e 25% das cepas de *A. flavus* mostraram-se potencialmente produtoras de aflatoxinas. Os altíssimos percentuais de reprovação das amostras para a qualidade higiênica, aliado à presença de grande variedade de fungos contaminantes, incluindo espécies produtoras de micotoxinas, é uma evidência de que a legislação necessita ser atualizada, para que este produto possa ser comercializado com segurança. Considera-se que toda a linha de produção do pólen apícola, desde sua coleta até o armazenamento deva ser monitorada, a fim de minimizar os riscos para a saúde humana

Palavras-chave: Produtos apícolas, sanidade apícola, micotoxicologia.

ABSTRACT

DEVEZA, Michele Valadares Deveza. **Fungi and mycotoxins in bee pollen samples of honeybees from Rio de Janeiro state.** 2011. 72 p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences, Animal Health). Veterinary Institute, Postgraduate Course in Veterinary Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The bee's pollen is a product rich in essential nutrients to feed the bees. In the hive it goes through chemical processes and becomes the bee's bread, of extreme importance for the growth of larvae. Currently, the use of pollen in the human's cuisine has been increasing for its therapeutic properties, and by its use in the food industry. To produce quality pollen the hive needs to be healthy, and bees, like any other animal, are susceptible to various diseases, parasites and predators, which can affect their development and productivity. The Brazilian Sac Brood (BSB) is one of these diseases, which in Brazil affects honeybee larvae. In apiaries of Rio de Janeiro state, a high mortality of larvae with symptoms similar to the BSB is occurring, and until now, there is no definite conclusion regarding the etiologic agent of this disease in the state. Therefore, the objectives of this study was to clarify two issues: 1) provide a mycological research, through a study case, of bees' bread samples, adult bees and bees' pollen in areas affected and not affected by the BSB, aiming the elucidation of its etiologic agent, 2) verify the hygienic quality of dehydrated pollen samples sold in Rio de Janeiro state. A total of 48 samples of bees' bread, 15 of adult bees and 12 of pollen were collected from endemic regions of the BSB. The samples were collected in the months before, during and after the period of the disease. The dehydrated pollen samples were also purchased in commercial stores of the state, totaling 27 samples. Fungal species enumeration (cfu g⁻¹) was through decimal dilution method using general culture media and selective ones. The isolation frequency and relative density of species were determined. The toxigenic profile of strains was determined, as also the detection and quantification of aflatoxin B₁ in bread and bees' pollen. The results obtained from the study case samples showed that the bees' bread was the best vehicle of contamination for the hive. It was also observed a high fungal counts and the presence of mycotoxins and entomopathogenic fungi such as *Aspergillus flavus*, *A. niger* aggregate and *A. fumigatus*, which cause a decrease of the immune response, leaving them susceptible to various diseases, including the BSB itself. Pollen dehydrated samples showed a high fungal contamination with 92% of the samples in unsatisfactory hygienic conditions according to legal standards. A total of 25% of the *A. flavus* strains showed to be aflatoxigenic. The high percentage of unhygienic samples combined with the presence of a large variety of fungal contaminants, including mycotoxin-producing species, evidences that the legislation needs to be updated so that it can be safely commercialized. It is considered that the whole line production of bees' pollen, since its extraction until its storage should be monitored in order to minimize risks to human health.

Keywords: Bees' products, bees' health, mycotoxicology.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Hipóteses	2
1.2 Objetivos Gerais	2
1.3 Objetivos Específicos	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Abelhas, Origem e Destaque de <i>Apis mellifera</i>	3
1.2 A Apicultura no Brasil	6
1.3 Produtos Apícolas	8
1.4 Fungos	9
1.4.1 <i>Aspergillus</i> spp	10
1.4.2 <i>Penicillium</i> spp.	11
1.4.3 <i>Fusarium</i> spp.	14
1.5 Micotoxinas	15
1.5.1 Aflatoxinas	16
1.5.2 Ocratoxinas	16
CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO MICOTOXICOLÓGICA EM COLMEIAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS SUJEITAS À ENFERMIDADE CRIA ENSACADA BRASILEIRA	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Locais	25
2.2 Instalações	26
2.3 Amostragem	26
2.3.1 Material amostrado	27
2.4 Determinação da A _a das Amostras	28
2.5 Isolamento e Identificação da Micobiota Contaminante	29
2.6 Caracterização do Perfil Tóxico das Espécies Isoladas	32
2.7 Quantificação de Aflatoxina B ₁ produzida <i>In Vitro</i> pelas Cepas Tóxicas Isoladas	33
2.8 Detecção e Quantificação de Aflatoxina B ₁ das Amostras	33
2.9 Análises Estatísticas	35

3 RESULTADOS	36
3.1 Determinação da A_a das Amostras de Pólen Apícola e Pão de Abelhas do Estudo de Caso	36
3.2 Avaliação da Contaminação Fúngica do Pólen Apícola	36
3.3 Avaliação da Contaminação Fúngica do Pão de Abelhas e Abelha Adulta	38
3.4 Perfil Toxígeno dos Fungos Isolados de Amostras do Estudo de Caso: Habilidade como Produtor	44
3.5 Análises Micotoxicológicas: Aflatoxina B_1	44
4 DISCUSSÃO	45
CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO MICOTOXICOLÓGICA DE PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO COMERCIALIZADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Locais e Amostragem	55
2.2 Determinação da A_a das Amostras	55
2.3 Isolamento e Identificação da Micobiota Contaminante	55
2.4 Caracterização do Perfil Toxígeno das Espécies Isoladas	56
2.5 Quantificação de Aflatoxina B_1 produzida <i>In Vitro</i> pelas Cepas Toxígenas Isoladas	57
3 RESULTADOS	58
3.1 Apresentação do Pólen Comercial	58
3.2 Determinação da A_a	58
3.3 Determinação da Carga Fúngica	58
3.4 Determinação da Micobiota das Amostras de Pólen	59
3.5 Perfil Toxígeno dos Fungos Isolados de Amostras de Pólen Apícola Desidratado: Habilidade como Produtor	61
3.6 Determinação da Qualidade Higiênica	61
4 DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES GERAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO GERAL

A apicultura dedica-se ao estudo e à criação de abelhas melíferas principalmente para atender a polinização dos cultivos. As produções de mel, cera, própolis, geléia real, pólen e veneno, entre outros são importantes subprodutos. As abelhas, como todos os organismos vivos, são susceptíveis a várias doenças, parasitas e predadores, que podem prejudicar seu normal desenvolvimento e produtividade. Proteger as abelhas das suas doenças e predadores continua a ser um dos pontos mais críticos da moderna apicultura em nível mundial.

Entre as principais doenças das abelhas, podemos citar: a Cria Pútrida Americana, Cria Pútrida Européia, Cria Giz, Nosemose, Varroatose, e Distúrbio do Colapso das Colônias (DCC), esta última atualmente vem causando o desaparecimento das abelhas pelo mundo.

No Brasil há relatos de uma doença conhecida como Cria Ensacada Brasileira (CEB), que acomete larvas de abelhas melíferas quando são alimentadas com pólen das árvores *Stryphnodendron polyphyllum* e *Stryphnodendron adstringens*. Apesar de comprovada sua toxidez para as larvas de abelhas, levanta-se a hipótese de que estas espécies florais não estejam envolvidas na etiologia da CEB no estado do Rio de Janeiro, já que sua distribuição geográfica não coincide com os locais de ocorrência da doença, e que esta se manifesta fora do período de floração de tais plantas. Além disso, em estudos realizados em colmeias nos apiários no estado do Rio de Janeiro entre os anos 2005 e 2006, foram encontrados nas larvas mortas diversos microorganismos. Artigos relatam a presença de propágulos fúngicos coletados acidentalmente pelas abelhas, além de uma ampla micobiota natural com capacidade toxígena no pólen, fator este de grande preocupação.

Os fungos, quando presentes nos alimentos, além da forte capacidade deteriorante são capazes de produzir substâncias tóxicas, denominadas micotoxinas, quando em condições de temperatura e umidade adequadas. As micotoxinas, produzidas durante o metabolismo secundário de algumas espécies de fungos, causam efeitos adversos, podendo levar à morte de acordo com a quantidade ingerida, inalada ou por contato. Entre os principais gêneros produtores de micotoxinas podemos citar: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Com relação ao pólen, é relatada na literatura a presença de fungos, principalmente produtores de ocratoxina A e aflatoxinas. Tais considerações fazem surgir a suspeita de que a CEB seja causada por um fungo, micotoxina ou ambos, presente no pólen apícola *in natura* e pão de abelhas, já que estes são produtos essenciais para as abelhas.

Somado a isso, o pólen apícola atualmente vem se destacando também na alimentação humana, tanto por suas propriedades terapêuticas, quanto pela sua utilização na indústria alimentícia. A busca por alimentos saudáveis faz com que o pólen seja um dos alimentos requisitados, pois é altamente nutritivo, contem em sua composição nutrientes como minerais, lipídeos, carboidratos e fibras, além de ser rico em proteínas. Porém, o controle de qualidade do pólen apícola é ainda deficiente, uma vez que a contaminação deste alimento está cada vez mais freqüente, mostrando a necessidade e a importância do monitoramento da qualidade higiênica comum a todos os alimentos.

Portanto, condições adequadas de manejo e armazenamento nos apiários são essenciais para o não surgimento de microorganismos indesejáveis nas colmeias e para a comercialização de um produto seguro evitando riscos à saúde humana também. Logo, análises micológicas e micotoxicológicas das amostras de pólen são de grande importância a fim de monitorar a qualidade higiênica dos produtos e a possível ocorrência de doenças em abelhas e em seres humanos, além de evitar prejuízos na apicultura do estado do Rio de Janeiro e em outros estados do Brasil.

1.1 Hipóteses

a) As amostras de pólen apícola *in natura* e de pão de abelhas estão contaminadas com fungos e micotoxinas, levando a ocorrência de doenças em abelhas melíferas do estado do Rio de Janeiro.

b) As abelhas adultas são veículos de contaminação para a colmeia, observando-se que o *grooming* não está sendo eficiente. *Grooming* nada mais é que um mecanismo de defesa usado por insetos eussociais que utilizam suas glândulas salivares com o objetivo de impedir infecções microbiológicas.

c) As amostras de pólen apícola desidratado comercializadas no estado do Rio de Janeiro não estão de acordo com padrões legais recomendados, oferecendo riscos aos seus consumidores.

1.2 Objetivos Gerais

a) Avaliar, através de estudo de caso, a situação de regiões potencialmente atingidas pela doença Cria Ensacada Brasileira, diagnosticando a presença de fungos, incluindo espécies patogênicas para abelhas, comparando os resultados com as regiões não atingidas pela doença, visando fornecer informações importantes para a elucidação do agente etiológico da CEB no estado do Rio de Janeiro.

b) Verificar a qualidade higiênica e toxicológica do pólen apícola desidratado comercializado no estado do Rio de Janeiro, de importância para a saúde pública, tendo em conta os padrões legais recomendados.

1.3 Objetivos Específicos

- a) Realizar a enumeração quantitativa das unidades formadoras de colônias (ufc) das amostras.
- b) Determinar a frequência da microbiota total realizando sua identificação taxonômica em nível de gênero.
- c) Isolar e identificar espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, estabelecendo a densidade relativa de cada um com enfoque nas espécies patogênicas para as abelhas.
- d) Determinar o perfil toxígeno de espécies isoladas potencialmente produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A (OTA) através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD).
- e) Quantificar através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a produção *in vitro* de aflatoxina B₁ (AFB₁) pelas cepas toxígenas isoladas.
- f) Detectar e quantificar AFB₁ presente nas amostras de pão de abelhas e pólen apícola, provenientes do estudo de caso, utilizando a técnica de cromatografia de imunoafinidade por colunas (IAC) e ELISA.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Abelhas, Origem e Destaque de *Apis mellifera*

As abelhas dos táxon Hymenoptera (ordem), Aculeata (subordem) são derivadas das vespas. Embora as abelhas se assemelhem a outros grupos de himenópteros aculeados, elas guardam estreita relação com as vespas esfecóides. Estes grupos estão reunidos no táxon Apoidea (superfamília). Estudos das relações filogenéticas desta superfamília mostraram que o grupo mais próximo das abelhas é o Crabonidae, onde foram comprovadas semelhanças morfológicas e comportamentais com estas vespas, o que sugere um período relativamente longo de evolução comum antes de sua divergência (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Pertencente aos Apoidea, as abelhas sociais *Apis mellifera* é um dos grupos mais estudados, devido a sua exploração em muitas localidades de nosso planeta. Esta espécie se destaca por apresentar complexa organização social (CARVALHO, 2009).

Atualmente, são conhecidas mais de 20 mil espécies de abelhas, no entanto acredita-se que ocorram 40 mil espécies, incluindo-se as supostas a identificar. Somente 2% dessas espécies são sociais e são produtoras expressivas de mel.

Morfológicamente, as abelhas apresentam um esqueleto externo chamado exoesqueleto, constituído de quitina, que fornece proteção para os órgãos internos e sustentação para os músculos, além de proteger o inseto contra a perda hídrica. O corpo é dividido em três partes: cabeça, tórax e abdome (EMBRAPA, 2003a) (Figura 1).

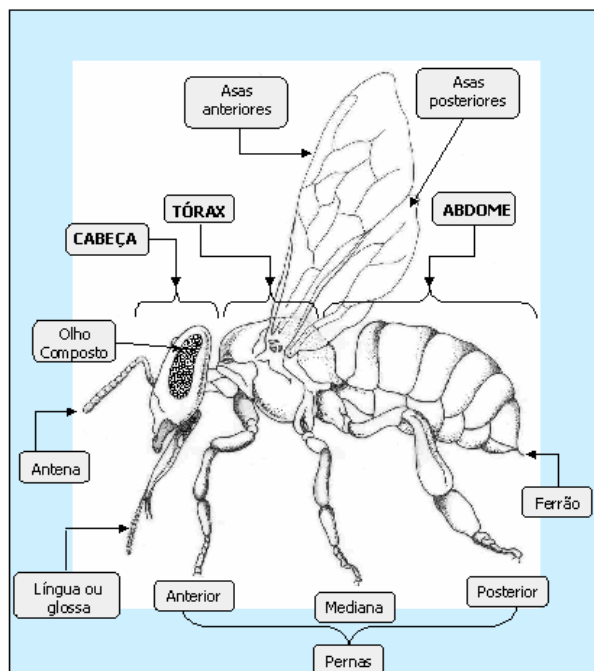


Figura 1. Aspectos da morfologia externa da abelha do gênero *Apis mellifera*.

Fonte: (EMBRAPA, 2003a).

Os habitats das abelhas são bem diversificados: inclui savanas, florestas tropicais, desertos, regiões litorâneas e montanhosas. Essa grande diversidade de climas e tipos

vegetacionais favoreceu a formação de diferentes subespécies de abelhas, bem adaptadas aos diversos ambientes particulares (RAMOS; CARVALHO, 2007).

Os sítios de nidificação também são bem variados. Os locais escolhidos normalmente são troncos ocos, cujas aberturas e fendas são fechadas com substância resinosa, chamada própolis, mantendo uma única abertura. Desta forma, o calor e a umidade são mantidos dentro da colmeia, além de dar segurança ao ninho (ZMITROWICZ, 2001) (Figura 2).

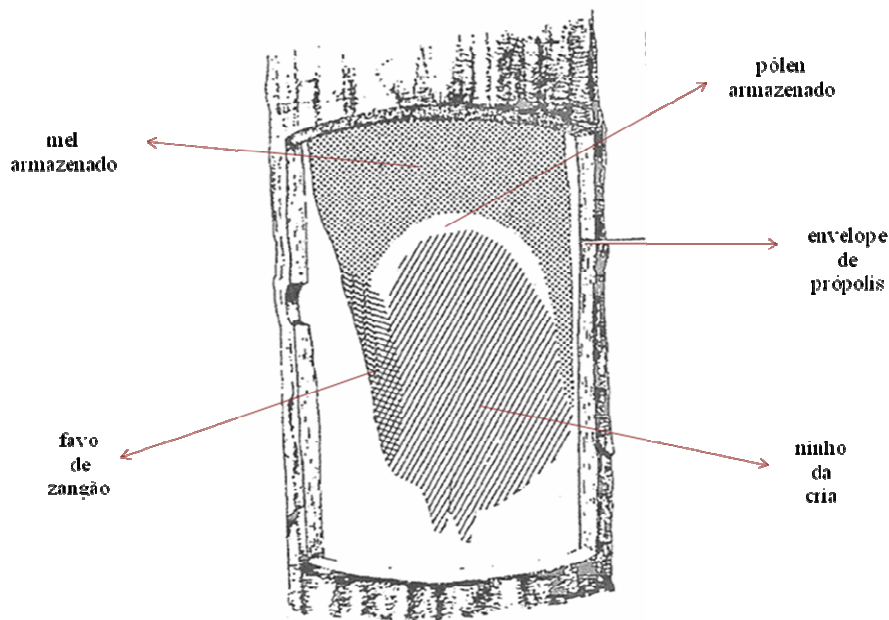


Figura 2. Arquitetura do ninho de *Apis mellifera*.

Fonte: (WINSTON, 2003).

As abelhas vivem em famílias denominadas colônias formadas por uma única abelha fisiogástrica (rainha), alguns milhares de zangões e dezenas de milhares de operárias, onde cada indivíduo possui uma função bem definida, visando sempre à sobrevivência e a manutenção do enxame (RPA, 1986) (Figura 3).

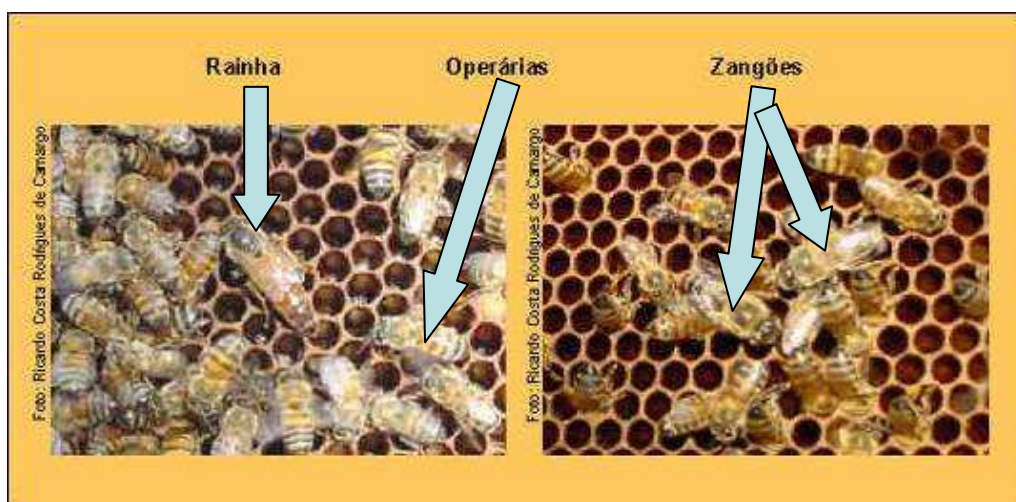


Figura 3. Abelha fisiogástrica, operárias e zangões adultos de uma colmeia de *Apis mellifera*.

Fonte: (EMBRAPA, 2003a).

A abelha fisiogástrica possui o tamanho quase duas vezes maior que o das operárias e vive cerca de 1 ano. A sua principal função é oviposição, é a única abelha fêmea com capacidade de reprodução de ambos os sexos. Ela com as demais abelhas são as responsáveis pela manutenção da harmonia e ordenação dos trabalhos da colônia (RAMOS; CARVALHO, 2007).

Os zangões são os machos da colônia, não possuem ferrão e emergem de ovos não fecundados, depositados pela rainha e operárias. A sua principal função é cruzar com as rainhas, copulando apenas uma vez, morrendo após esse ato (AMARAL; ALVES, 1979). Os zangões emergem 24 dias após a postura do ovo e atingem a maturidade sexual aos 12 dias de vida. Vivem de 80 a 90 dias e dependem única e exclusivamente das abelhas operárias para sobreviver: são alimentados por elas e podem ser expulsos da colmeia quando há escassez de alimento. O número de zangões é variável em uma colônia, dependendo das condições desta e principalmente, da disponibilidade de alimento (AMBIENTE BRASIL, 2010).

As abelhas operárias são responsáveis pela maior parte do trabalho realizado na colmeia. Coletam o alimento, a água, pólen e néctar, produzem o mel que serve de alimento tanto para as larvas quanto para as adultas, produzem também a cera com a qual constroem os favos, alimentam a rainha, os zangões e as larvas por nascer e cuidam da defesa da família (RAMOS; CARVALHO, 2007). São responsáveis pela higiene da colmeia, detectando a presença de doentes, retirando os mortos e combatendo os invasores. Quanto às larvas doentes, as abelhas adultas as lançam para fora da colmeia. Porém, nem sempre, tem êxito no controle de patógenos, presentes em seu corpo, o que pode ocasionar enfermidades diversas para as crias e para as abelhas adultas na colmeia (GLINSKI; BUCZEK, 2003).

As atividades das operárias na colônia são distribuídas de acordo com sua faixa etária. As mais jovens se ocupam dos cuidados com a prole, trabalhos com a cera, construção e provisionamento das células. As mais velhas exercem a função de soldado, receptora, de preparo do mel, e de campeiras, na procura e coleta de alimento, de materiais de construção (barro, resina, etc.), e para a retirada do lixo da colônia (TEIXEIRA; CAMPOS, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Funções executadas pelas operárias de acordo com a idade.

Idade	Função
1º ao 5º dia	Realizam a limpeza dos alvéolos e de abelhas recém-nascidas.
5º ao 10º	São chamadas abelhas nutrizas porque cuidam da alimentação das larvas em desenvolvimento. Neste estágio elas apresentam grande desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, produtoras de geléia real.
11º ao 20º dia	Produzem cera para construção de favos, quando há necessidade, pois nessa idade as operárias apresentam grande desenvolvimento das glândulas ceríferas. Além disso, recebem e desidratam o néctar trazido pelas campeiras, elaborando o mel, e estocam o pólen nos favos.
18º ao 21º dia	Realizam a defesa da colmeia. Nesta fase, as operárias apresentam os órgãos de defesa bem desenvolvidos, com grande acúmulo de veneno. Podem também participar do controle da temperatura na colmeia.
22º dia até a morte	Realizam a coleta de néctar, pólen, resinas e água, quando são denominadas campeiras.

Fonte: (EMBRAPA, 2003a).

A termorregulação é uma característica interessante desses insetos. A abelha possui sua temperatura corporal próxima à temperatura ambiente, sendo capaz de regular sua temperatura corporal acima ou abaixo da temperatura ambiente. A manutenção e controle do abiótico dentro da colônia são essenciais para o desenvolvimento da prole e também para a sobrevivência dos jovens e adultos. A capacidade de termorregulação colonial é atribuída, em parte, as características estruturais do próprio ninho garantindo um bom isolamento térmico, e também através do processo endotérmico do inseto. A vida em sociedade contribui para a termorregulação individual da abelha, onde esta pode se agrupar-se com as outras abelhas da colônia, e através da vibração de seus músculos de vôo para se aliviar do desconforto térmico, também contribui para a manutenção da temperatura da colônia, que deve ficar entre 30°C a 34°C (CARVALHO, 2009).

Em relação à produção, o mel e o pólen são considerados produtos primários da colônia de *Apis mellifera*, são apreciados também a cera e a geléia real, entre outros (AMARAL; ALVES, 1979).

1.2 A Apicultura no Brasil

Com o desenvolvimento da apicultura européia, muitos apicultores no Brasil se mostraram insatisfeitos com os resultados obtidos no país, quando comparados ao de outros países. Por isso o objetivo da introdução de uma nova raça de abelhas melíferas no Brasil veio atender às necessidades da classe apícola brasileira, cujos anseios eram aumentar a resistência das abelhas às doenças e aumentar também a sua produção (RANGEL, 2006).

Em 1956, o professor Warwick Estevan Kerr realizou viagens de estudos à África do Sul, onde se deparou com a alta capacidade produtiva das abelhas *Apis* locais. A partir daí, ocorreu a introdução de rainhas africanas de duas raças (*Apis mellifera adansonii*, amarela, e *Apis mellifera capensis*, preta) no Brasil (BARROS, 1965). Porém, há relatos em literatura que reportam a introdução no País de outras raças africanas, como por exemplo, a *Apis meliifera scutellata*. O objetivo do Prof. Kerr era fazer um melhoramento e assim, uma posterior distribuição de rainhas selecionadas aos apicultores na intenção de aumentar a produção nacional de mel (GONÇALVES, 1998).

No entanto, o Setor de Apicultura não apoiou a africanização, incentivada pelo Prof. Kerr, que ministrou várias palestras sobre o assunto na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), porém o setor recebeu várias rainhas virgens das duas raças africanas já citadas (amarela e preta), e foi estabelecida a introdução destas em núcleos de européias formando assim, 20 colmeias. Após algum tempo, algumas colônias de africanas pretas se extinguíram, acreditava-se que eram mais fracas na competição com as européias. Após alguns anos, constatou-se que os enxames que se julgavam extintos, na verdade, fugiram e ocuparam ninhos naturais como, ocos de árvores, por exemplo, ou, invadiram colmeias européias, matando a rainha original e se estabelecendo na colmeia. Em pouco tempo, estas colônias dominaram o ambiente da UFRRJ e proliferaram para áreas vizinhas. O Setor de Apicultura, nessa época, importou diversas rainhas italianas fecundadas dos EUA para manter um estoque de abelhas italianas, mas, infelizmente não foi possível evitar o cruzamento das rainhas italianas puras, virgens, com zangões africanizados aumentando assim, a proliferação das abelhas africanizadas (RANGEL, 2006).

A africanização foi uma das mais extraordinárias invasões biológicas já relatada (TAYLOR, 1977). Não se sabe ao certo se o Setor de Apicultura da UFRRJ comercializava rainhas africanas, mas, esse fato foi um importante difusor desta raça no Rio de Janeiro.

Na década de 60, a presença das abelhas africanizadas era marcante em muitas regiões brasileiras, houve inúmeras queixas sobre seu comportamento, assim como, uma série de

campanhas com a intenção da sua erradicação (GONÇALVES, 1996). Após 40 anos, as abelhas africanizadas dominaram todas as raças de abelhas européias e ocuparam grande parte das Américas do Sul, Central e na década de 90 entraram nos Estados Unidos (GONÇALVES, 1998).

Hoje sabe-se que a abelha africanizada é um polihíbrido das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera lingustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata*. Este mestiço adquiriu alta variabilidade genética, facilidade de enxamear, resistência a doenças, produção e aclimação a diversos microclimas, sendo as subespécies européias extinguidas (EMBRAPA, 2003a).

Graças à abelha africanizada, o Brasil hoje, é reconhecido no cenário apícola mundial pelo domínio da metodologia de controle e manejo de sua criação. A grande diversidade de floradas naturais e silvestres dá ao Brasil uma grande vantagem competitiva em relação aos seus concorrentes, em razão do alto potencial de produção de mel orgânico para exportação (CARVALHO, 2009).

De acordo com o IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002), em 1990 a produção de mel que estava em 28º no *ranking* mundial cresceu e alcançou a 11º posição. Dados mais recentes mostram que em 2009 foi exportado cerca de três mil toneladas de mel, o que corresponde a US\$ 7.216 milhões, um aumento de 11,9% na exportação do mel. Isto indica um crescimento mais do que satisfatório na área comercial, apesar do segmento apícola ainda possuir uma infra-estrutura deficiente para processamento dos seus produtos apícolas (AGROSOFT BRASIL, 2009).

Nos últimos anos, a apicultura passou a ser mais uma alternativa para os núcleos de agricultura familiar, com boa representatividade na produção agropecuária de inúmeros outros produtos, ampliando a distribuição de trabalho e geração de renda (FIBGE, 1995-1996). Acompanhado ao crescimento da agricultura familiar no País, houve um aumento dos recursos de crédito aplicados neste setor. Segundo o Ministério de Desenvolvimento Agrário, os investimentos aumentaram de R\$ 2,3 bilhões no ano safra 2002/2003 para 15 bilhões no ano-safra 2009/2010. Neste ano-safra (2010/2011), os recursos disponibilizados pelo Governo Federal alcançaram o total de R\$ 16 bilhões. Apesar destes investimentos e do fato de representar um setor estratégico para o desenvolvimento do País, cerca de 50% dos agricultores familiares ainda não dispõem de qualquer assistência técnica e extensão rural. Assim, considera-se que um dos grandes problemas deste setor diz respeito à inadequação do modelo tecnológico para as condições particulares da produção em pequena escala gerida pelo trabalho familiar. Muitas das famílias rurais encontram-se desamparadas e se utilizam de formas rústicas de vida para sobreviver. Através da apicultura, as famílias rurais podem viver às expensas de áreas cobertas por floradas nativas e de alguns poucos cultivos. Atualmente, esta atividade se sustenta principalmente através da produção do mel que segue a mesma feição na maioria dos estados brasileiros (LORENZON; PEIXOTO; GONÇALVES, 2006).

Outro desafio, de âmbito global, é o avanço de enfermidades de abelhas em muitos países e, por conseqüência, o uso abusivo de medicamentos. Questões que envolvem a sanidade apícola devem ser consideradas com cautela, mesmo no caso do Brasil, cujas abelhas mostram-se ainda resistentes às doenças, resultando em poucos problemas nesta área (PACHECO, 2007).

1.3 Produtos Apícolas

O mel é um produto alimentício produzido pelas abelhas, que possui como matéria-prima o néctar das flores, secreções das partes vivas das plantas ou excreções de insetos sugadores que as abelhas coletam, transformam e combinam com suas substâncias próprias (secreções de várias glândulas), armazenando e deixando maturar nos favos da colmeia. Seus principais componentes são: os açúcares, ácidos, pólen, cera, proteínas, enzimas, minerais, dentre outros (APICULTURA, 2006).

Já a cera de abelha, material básico para a construção dos favos, é elaborado por glândulas ceríferas das abelhas que, após modificações, formam os favos de rigidez, resistência e flexibilidade razoáveis (SILVA et al., 2002).

A geléia real é uma substância viscosa, de coloração branco-amarelada ou branco-acinzentada, de odor característico. É secretada pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas operárias jovens, apresentando uma composição química de 63% de umidade; 1% de cinzas; 3,5% de lipídios; 13% de proteínas e 19,5% de carboidratos. Serve de alimento para as larvas somente durante o seu crescimento e para a abelha rainha por toda a sua vida. É um produto de difícil obtenção (geralmente em quantidades pequenas) e de grande procura, por conta dos benefícios que são atribuídos ao seu uso, tais como aumento de fertilidade, atividade antileucêmica, antibiótica, ajuda no combate a determinados tipos de tumores e é hipocolesterolemiantes (AMOEDO; MURADIAN, 2002).

O pão de abelhas é resultado da união de pólen, néctar e água, constituindo a base nutricional das abelhas. Assim que chega à colmeia, o pólen é colocado nos alvéolos, os quais são fechados com uma fina camada de mel. Na presença de calor e umidade, o pólen começa a sofrer fermentação láctica e vários processos bioquímicos que aumentam a sua acidez, passando a ser denominado de pão de abelhas. Para as abelhas adultas, o pão de abelhas é essencial na produção de diferentes secreções e na formação de corpos adiposos, que permite sua sobrevivência durante o inverno. Já as larvas, se alimentam deste produto a partir do quarto dia de vida, necessitando deste para crescerem, já que, a quantidade de vitamina K e açúcares é bem maior que no pólen, devido à adição de néctar e mel (RÍOS, 2010).

Em relação ao pólen, as abelhas dependem desse produto para o seu suprimento de proteínas, sais minerais e produtos biológicos especiais utilizados na sua alimentação. Por essa razão, a produção de mel, cera e geléia real de um apiário está diretamente relacionada com a quantidade de pólen necessária para a alimentação das colmeias. Na ausência de pólen, as abelhas recorrem à sua própria fonte de reserva, metabolizando tecidos de seus corpos, a fim de prolongar sua existência (MARCHINI; REIS; MORETI, 2006). O pólen contém a maioria dos nutrientes essenciais para a produção de geléia real, entre outros, com a qual são nutridas larvas da rainha e por 72 horas larvas de operárias e machos. É considerado essencial para o crescimento normal e o desenvolvimento de todos os indivíduos de uma colônia de abelhas, bem como, essencial para a reprodução das colônias (MORETI, 2006).

De acordo com o teor de umidade apresentado, o pólen apícola (Figura 4) pode ser classificado em: pólen apícola e pólen apícola desidratado. A Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) define pólen apícola como o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, recolhido no ingresso da colmeia em sua forma original. Já o pólen apícola desidratado é aquele submetido ao processo de desidratação, em temperatura não superior a 42°C e com teor de umidade não superior a 4% (BRASIL, 2001a). A importância do pólen para a colônia é, portanto, inquestionável (MARCHINI; REIS; MORETI, 2006).



Figura 4. Pólen apícola *in natura* coletado de uma colmeia.

Fonte: (APICULTURA, 2006).

Estes produtos apícolas desempenham um importante papel na proteção da colônia, possuem atividade antimicrobiana inibindo o desenvolvimento de organismos como bactérias, vírus e fungos saprófitos nos alimentos armazenados pelas abelhas (GLINSKI; BUCZEK, 2003).

1.4 Fungos

Durante muito tempo os fungos foram classificados como vegetais. A partir de 1960 passaram a ser reconhecidos como um reino a parte - Fungi. Os fungos são organismos eucarióticos unicelulares, como as leveduras, ou pluricelulares, como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002). São aeróbios em sua grande maioria, e sua reprodução pode ser sexuada ou assexuadamente; sua alimentação é por absorção e seu principal material de reserva é o glicogênio. Vivem como saprófitos, parasitas ou em mutualismo. Esse reino vem sofrendo mudanças no arranjo de seus filós nas últimas décadas, principalmente quando técnicas como RNA ribossômico e DNA se tornaram mais elaboradas e sucintas.

Desenvolvem-se em substratos cuja atividade de água (A_w) varia entre 0,65 e 0,90 sendo que, valores inferiores a 0,62 impedem a germinação de qualquer microorganismo. Por isso é de grande importância o momento da conservação de grãos e do processo de secagem, visando reduzir o teor de umidade dos produtos. A faixa de temperatura ideal para o seu crescimento varia de 20 a 30°C. Com relação ao potencial hidrogeniônico (pH), podem se desenvolver na faixa de 2 a 8, sendo o ótimo entre 4 e 6,5. O efeito da luz sobre esses microrganismos é essencial para que ocorra o processo germinativo de algumas espécies fúngicas (PITT; HOCKING, 1997).

Os fungos possuem grande relevância na decomposição da matéria orgânica na biosfera através de um conjunto de enzimas, sendo de vital importância na continuidade do ciclo vital (SAMSON et al., 2000). Além da habilidade deteriorante, os fungos quando presentes em produtos agrícolas e em condições adequadas são capazes de produzir durante o armazenamento, no campo e no processamento do alimento, metabólitos tóxicos chamados de micotoxinas (WAGACHA; MUTHOMI, 2008).

No entanto, o isolamento de fungos tóxicos a partir de alimentos não significa a princípio um risco para o consumo, uma vez que a cepa identificada pode não ter produzido toxina. Assim como, a ausência de fungos no alimento não significa ausência de micotoxinas, já que o fungo pode ter produzido toxina, mas por alguma razão, o processamento que o alimento sofreu, pode ter eliminado o fungo (PITT; HOCKING, 1997).

As principais espécies fúngicas produtoras de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (CAST, 2003).

1.4.1 *Aspergillus* spp.

O gênero *Aspergillus* possui mais de 200 espécies, é filamentoso e um respeitável contaminante de alimentos amplamente distribuído no mundo. É isolado de plantas, solo e ambientes fechados, típico de regiões tropicais e subtropicais (PITT; HOCKING, 1997), além de ser capaz de crescer em condições de baixa A_a e em temperaturas elevadas (MOSS, 1991). Algumas espécies desse gênero são relatadas também como patogênicas para insetos (como por exemplo, para as abelhas) e animais (PITT; HOCKING, 1997; SAMSON et al., 2000).

Diversas espécies têm atraído a atenção do homem pela capacidade de produção de produtos metabólicos, fermentação, aplicação industrial, na produção de ácidos orgânicos e enzimas (SAMSON et al., 2000). São conhecidas por ocasionarem infecções oportunistas, alergia e toxicoses. Suas infecções variam desde uma participação local até disseminação completa, denominada Aspergilose (PACHECO, 2007).

A principal característica microscópica das espécies desse gênero são os diferentes tipos de estruturas chamadas conidióforos, onde suas bases formam um “T” ou um “L” que os ligam a célula vegetativa ou a uma célula separada. O conidióforo se estende da célula vegetativa até o ápice chamado de vesícula. Os conídios podem ter origem de diferentes maneiras, isso vai depender da espécie, podendo nascer de estruturas ligadas à vesícula conhecidas como fiálides, formando as chamadas cabeças aspergulares unisseriadas, ou de uma segunda camada de células, que fica entre a vesícula e as fiálides conhecidas como métulas formando as cabeças aspergulares bisseriadas. Essas características somadas a outras formam o conjunto necessário para a taxonomia desse gênero. A cor, diâmetro, reverso das colônias, cor do micélio e formação de esclerócios (estruturas de sobrevivência) são as características macroscópicas mais importantes taxonomicamente. Quanto às características microscópicas, é importante ao se identificar, observar a formação de estruturas como, cleistotécios, esterigmas, conídios e parede dos cleistotécios e ascósporos (Figura 5).

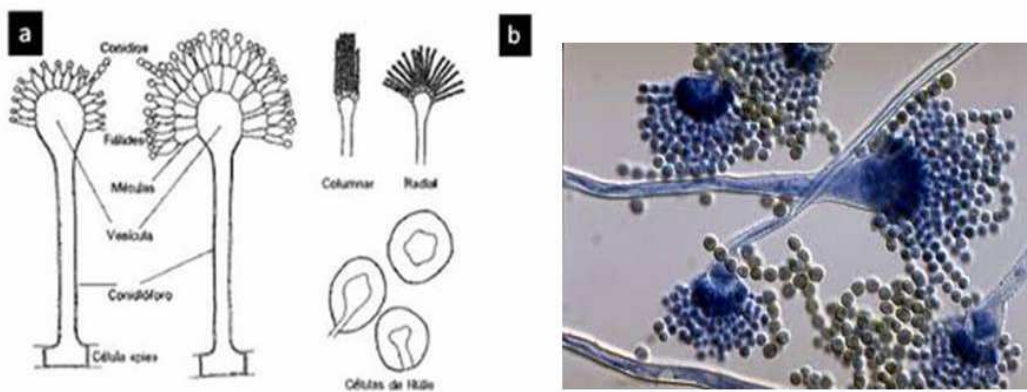


Figura 5. (a) Características morfológicas de *Aspergillus* spp. e (b) Microscopia da espécie *Aspergillus flavus*.

Fonte: (a) <http://www.uprm.edu/biology/profs/betancourt/Lab/Aspergilosis.htm>; (b) <http://www.moldbacteria.com/learnmore/aspergillus.html>.

Entre as principais micotoxinas produzidas pelo *Aspergillus*, podemos destacar as aflatoxinas e a ocratoxina A (Tabela 2).

Tabela 2. Potencial toxígeno das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam produtos vegetais.

Espécies de <i>Aspergillus</i>	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 B ₁ e B ₂ , 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> agregados	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 (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂), Ácido Aspergílico, Ácido Kójico, Aflavininas
<i>A. tamaritii</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).

1.4.2 *Penicillium* spp.

O gênero *Penicillium* assim como o gênero *Aspergillus*, também é um grande contaminante alimentar, também é economicamente importante, devido sua habilidade de deterioração do alimento e produção de micotoxinas. É capaz de se desenvolver em condições adversas como temperaturas e A_a baixas. Seu *habitat* é bem variado, sendo isolado tanto no solo quanto em alimentos, principalmente em grãos de cereais, vegetação em deterioração e no ar (SWEENEY; DOBSON, 1998).

As características macroscópicas mais importantes para a taxonomia desse grupo são: o diâmetro, textura e cor do reverso das colônias, a cor dos conídios e do micélio, a produção de pigmentos solúveis e/ou exsudatos. O fato de determinada cepa não apresentar pigmentação não deve ser visto de forma negativa para sua caracterização na espécie. Já a produção de exsudatos é considerada característica marcante para algumas espécies, sendo assim, considerada uma ferramenta taxonômica importante. Na hora da identificação também é importante observar a formação de esclerócios (estruturas de sobrevivência) e produção de gimnotécios ou cleistotécios, ambos estruturas características de reprodução.

Quanto às características microscópicas, devem-se observar estruturas como: o conidióforo (Figura 6), que se assemelha a um pincel, sendo assim, formado por uma estipe que se estende até o ápice formando em sequência as métulas, fiálides e por fim os conídios;

tipo de conidióforo, que pode ser monoverticilados, biverticilados, terverticilados ou quaterverticilados, de acordo com a formação das fiálides; o número e disposição das métulas por estipe; disposição do conidióforo, que pode ser irregular, de forma lateral e terminal sobre a estipe ou regular, de forma terminal sobre a estipe; o formato das fiálides, que podem ser ampuliformes (semelhantes a garrafas) e acerosas (semelhantes a agulhas de pinheiro); o tamanho relativo entre as fiálides e métulas, que é de fundamental importância na separação de subgêneros; o tamanho e textura da estipe e dos conídios (lisa ou rugosa); forma, ornamentação e tamanho dos ascos e ascosporos.

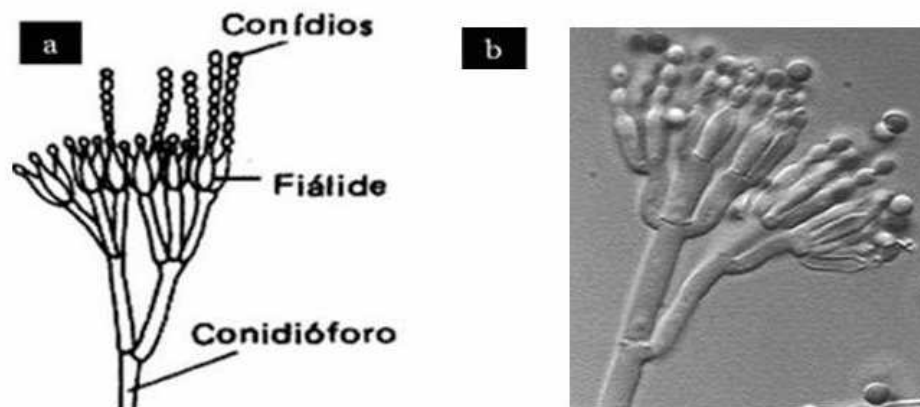


Figura 6. (a) Características morfológicas do gênero *Penicillium* e (b) Microscopia do gênero.

Fonte: (a) <http://viseufunghi.blogspot.com/2007/11/fungos-cogumelos.html>;
(b) <http://biologia.laguia2000.com/protistas/microorganismos-en-los-reinos-protistas-y-fungi-hongos>.

Diversas espécies desse gênero são conhecidas como potenciais produtoras de micotoxinas (Tabela 3).

Tabela 3. Potencial toxígeno das principais espécies de *Penicillium* que contaminam produtos vegetais.

Espécies de <i>Penicillium</i>	Micotoxinas
<i>P. aethiopicum</i>	Griseofulvina, Viridicatumtoxina
<i>P. aurantiogriseum</i>	Ácido Penicílico, Roquefortina C, Xantomegnina, Viomeleim, Verrucosidina
<i>P. brevicompactum</i>	Ácido Micofenólico
<i>P. camemberti</i>	Ácido Ciclopiazônico
<i>P. chrysogenum</i>	Roquefortina C, Ácido Ciclopiazônico
<i>P. citreonigrum</i>	Citreoviridina
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. commune</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Ciclopáldico, Ácido Ciclopólico, Ciclopamina, Palitantina, Rugulovasinas
<i>P. crustosum</i>	Penitrem A
<i>P. expansum</i>	Patulina, Citrinina
<i>P. funiculosum</i>	Patulina
<i>P. griseofulvum</i>	Patulina, Ácido Ciclopiazônico, Roquefortina C, Griseofulvina
<i>P. hirsutum</i>	Roquefortina C, Ácido Ciclopiazônico
<i>P. islandicum</i>	Cicloclorotina, Islanditoxina, Leuteoskyrina, Eritroskyrina
<i>P. janczewskii</i>	Griseofulvina, Penitrem A
<i>P. janthinellum</i>	Toxinas Tremorgênicas
<i>P. oxalicum</i>	Ácido Secalônico D
<i>P. paxilli</i>	Verruculogem, Paxiline (Toxinas Tremorgênicas)
<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoxinas
<i>P. raistrickii</i>	Griseofulvina, Toxinas Tremorgênicas
<i>P. roqueforti</i>	PR Toxina, Patulina, Ácido Penicílico, Roquefortina C, Ácido Micofenólico
<i>P. rugulosum</i>	Rugulosina
<i>P. simplicissimum</i>	Verruculogem, Fumitremorgem B, Ácido Penicílico, Viridicatumtoxina
<i>P. variabile</i>	Rugulosina
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A, Citrinina
<i>P. viridicatum</i>	Xantomegnina, Viomeleim, Vioxantina

Fonte: (PITT; HOCKING, 1997).

1.4.3 *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium*, assume também grande importância na contaminação. Este gênero abrange também espécies fitopatogênicas, sendo isolado em matérias-primas como arroz, feijão, soja e grãos em geral. Além disso, são responsáveis por diversas infecções em seres humanos, conhecidas como fusarioses.

Como características macroscópicas, colônias algodonosas, de crescimento com cores variadas quando cultivado em agar batata dextrose (BDA), cores variadas observadas também no reverso da colônia. Podem apresentar um conjunto de hifas com conidióforos em sua superfície, em diversas cores chamado de esporodóquios. Suas características microscópicas revelam estruturas conhecidas como hifas septadas, conidióforos, fiáldes, macroconídios e microconídios com a presença ou não de estruturas chamadas clamidosporos que quando presentes são vistos em forma de cadeia, em pares ou soltas. As fiáldes são cilíndricas, únicas ou produzidas em forma de ramos, sendo assim, chamadas de monofiáldes ou polifiáldes (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983).

Todas essas características tanto macroscópicas quanto microscópicas são essenciais para a identificação taxonômica desse grupo (Figura 7).

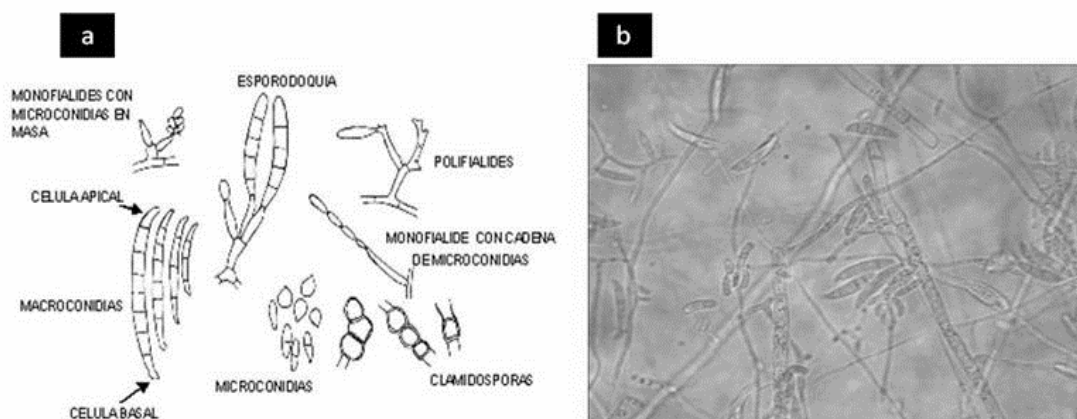


Figura 7. (a) Características morfológicas de *Fusarium* spp. e (b) Microscopia do gênero.

Fonte: (a) http://www.seimc.org/control/revi_Mico/fig1_fusarium.gif; (b) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1f/Fusarium_conidiophores_and_macroconidia_160X.png.

Entre as principais micotoxinas produzidas por *Fusarium*, as mais importantes são: fumonisinas, zearalenona e tricotecenos (Tabela 4). No grupo dos tricotecenos, podemos destacar a toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS), neosolaniol, nivalenol, diacetilnivalenol, deoxinivalenol (DON), HT-2 toxina, fusarenona X e a roridina.

Tabela 4. Potencial toxígeno das principais espécies de *Fusarium* que contaminam produtos vegetais.

Espécies de <i>Fusarium</i>	Micotoxinas
<i>F. acuminatum</i>	T-2 toxina, Moniliformina, HT-2 Toxina, Diacetoxiscirpenol, Monoacetoxiscirpenol, Neosolaniol, Beauvericina
<i>F. anthophilum</i>	Beauvericina
<i>F. avenaceum</i>	Moniliformina, Beauvericina
<i>F. cerealis</i>	Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Zearalenona, Zearalenoles (α e β isômeros)
<i>F. chlamydosporum</i>	Moniliformina
<i>F. culmorum</i>	Deoxinivalenol (Vomitoxina), Zearalenona, Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Zearalenoles (α e β isômeros), Monoacetildeoxinivalenol (3-AcDON, 15-AcDON)
<i>F. equiseti</i>	Zearalenona, Zearalenoles (α e β isômeros), Monoacetoxiscirpenol, Diacetoxiscirpenol, Nivalenol, Diacetilnivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Fusarocromanona, Beauvericina
<i>F. graminearum</i>	Deoxinivalenol (Vomitoxina), Zearalenona, Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Mono-acetildeoxinivalenol (3-AcDON, 15-AcDON), Diacetildeoxinivalenol, Diacetilnivalenol
<i>F. heterosporum</i>	Zearalenona, Zearalenoles (α e β isômeros)
<i>F. nygamai</i>	Beauvericina, Fumonisina B ₁ , Fumonisina B ₂
<i>F. oxysporum</i>	Moniliformina, Beauvericina
<i>F. poae</i>	Diacetoxiscirpenol, Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Monoacetoxiscirpenol, T-2 toxina, HT-2 Toxina, Neosolaniol, Beauvericina
<i>F. proliferatum</i>	Fumonisina B ₁ , Beauvericina, Moniliformina, Fusaproliferina, Fumonisina B ₂
<i>F. sambucinum</i>	Diacetoxiscirpenol, T-2 toxina, Neosolaniol, Zearalenona, Monoacetoxiscirpenol, Beauvericina
<i>F. semitectum</i>	Zearalenona, Beauvericina
<i>F. sporotrichioides</i>	T-2 toxina, HT-2 Toxina, Neosolaniol, Monoacetoxiscirpenol, Diacetoxiscirpenol
<i>F. subglutinans</i>	Beauvericina, Moniliformina, Fusaproliferina
<i>F. tricinctum</i>	Moniliformina, Beauvericina
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisina B ₁ , Fumonisina B ₂ , Fumonisina B ₃

Fonte: (LOGRIECO et al. 2002).

1.5 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos tóxicos de baixo peso molecular, produzidas como resultado do metabolismo secundário de fungos filamentosos, principalmente pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e que exercem efeitos nocivos sobre os animais e o homem (SASSAHARA; YANAKA; NETTO, 2003). Segundo a FAO - *Food and Agriculture Organization* (1990), as micotoxinas podem levar ao óbito, o que depende da quantidade inalada, ingerida, tempo de exposição, idade, raça, sexo, ou toxinas envolvidas. São responsáveis pela contaminação de grande parte das safras agrícolas no mundo, principalmente em países de clima tropical úmido, em que não há tecnologias agrícolas adequadas, principalmente durante a colheita e pós-colheita (RUSTOM, 1997).

As micotoxicoses podem ser classificadas como primárias, quando ocorre o consumo direto de produtos contaminados, ou secundárias, que ocorre ao ingerir leite, carnes, ovos ou derivados de animais contaminados (LILLEHOJ, 1991).

A melhor maneira de prevenir a contaminação por micotoxinas consiste em detectar e eliminar as matérias-primas contaminadas de produtos destinados ao consumo animal e humano, identificando as regiões geográficas onde as micotoxinas constituem um problema recorrente. Uma vez que o problema relacionado às micotoxinas é difícil de ser evitado, as medidas mais efetivas de controle dependem de um rigoroso programa para monitorar a contaminação em alimentos (ONO et al., 2004).

1.5.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas (Afs) são toxinas produzidas pelas espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*. O fungo *A. flavus* é capaz de produzir as aflatoxinas B₁ e B₂, sendo a aflatoxina B₁ a mais freqüente e mais tóxica, é também reconhecida como o mais potente hepatocarcinógeno para o homem e os animais. Já *A. parasiticus* é capaz de produzir as Afs B₁, B₂, G₁ e G₂ ocorrendo principalmente nas Américas e na África. A exposição a essa micotoxina ocorre principalmente através da ingestão de milho e amendoim contaminados, são toxinas consideradas contaminantes naturais dos cereais (IARC, 1993b).

As Afs atuam de forma aguda ou crônica, são as substâncias mutagênicas e carcinogênicas mais poderosas da natureza (THANABORIPAT et al., 2007) além de ações teratogênicas, hepatotóxicas e imunossupressores, são apontadas como responsáveis por casos de alta mortalidade em animais de produção e até em seres humanos (SALUNKHE; ADSULE; PADULE, 1987; ALLOCRAFT, 1969).

Em relação às abelhas, foi observado por Hilldrup; Llewellyn (1979) que as Afs incorporadas à dieta de abelhas adultas provocaram mortalidade das abelhas, mesmo em concentrações inferiores a cinco partes por milhão, sendo mais sensíveis a aflatoxina B₁, que causou mortalidade sempre que esteve presente nas colmeias *Apis*.

Hoje em dia, já foi comprovada que as Afs agem diretamente no sistema nervoso central, afetando o sistema endócrino e, muito provavelmente, o sistema de defesa interno das abelhas diminuindo assim, a resistência das abelhas à infecção micótica (GLINSKI; BUCZEK, 2003).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde estabelece o limite de 20µg/Kg de aflatoxinas totais (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) no amendoim, na pasta de amendoim, no milho em grão, na farinha ou sêmola de milho para consumo humano (BRASIL, 2002).

1.5.2 Ocratoxinas

As principais espécies produtoras de ocratoxina são *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*. Os principais tipos dessa micotoxina são: “A”, “B” e “C”.

A ocratoxina do tipo “A” (OTA) é considerada a mais tóxica e abundante. Possui ação nefrotóxica afetando principalmente suínos e aves, a nefrotoxicidade é vista de várias formas, desde a alteração do volume dos rins, alteração da osmolaridade da urina, acréscimo do volume da mesma, alterações na função renal, tumores renais e outros. A sua principal via de contaminação é o trato gastrointestinal, por onde é absorvida ao logo do trajeto (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006). É vista como a segunda maior de importância toxicológica, perdendo apenas para as Afs (BRAGULAT; ABARCA; CABAÑES, 2001).

Em relação às abelhas, já foi comprovado que o pólen é altamente eficiente para estimular a produção de OTA quando é adicionado em meio de cultura adequado e até mesmo de maneira natural quando é submetido à condições de armazenamento inadequadas (MEDINA et al., 2004; VILLALOBOS et al., 2010;).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, a OTA foi classificada como pertencente à categoria 2b, como um possível carcinógeno para o homem e outros animais (IARC, 1993a).

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO MICOTOXICOLÓGICA EM COLMEIAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS SUJEITAS À ENFERMIDADE CRIA ENSACADA BRASILEIRA

RESUMO

A Cria Ensacada Brasileira (CEB) é uma doença com alta e rápida mortalidade das larvas pré-pupas. A sintomatologia é semelhante a da Cria Ensacada Européia, porém, os motivos da alta ocorrência da CEB se mostram indeterminados já que o *Sac Brood Virus* (SBV) causador da Cria Ensacada Européia, não foi detectado em nosso país. Foi verificado então que o motivo de alta mortalidade da cria em várias regiões era o pólen de *Stryphnodendron* spp. Embora comprovada a toxidez do pólen dessas plantas para as abelhas, é possível que estas espécies florais não estejam envolvidas na etiologia da CEB no estado do Rio de Janeiro, já que a doença está ocorrendo em regiões onde a presença deste pólen é insignificante para provocar tão alta mortalidade. Estudos revelam que durante o forrageamento as abelhas podem coletar acidentalmente propágulos fúngicos, que são depositados e acabam se desenvolvendo na colmeia levando a queda da imunidade desses insetos facilitando a entrada na colmeia de diversos vetores causando doenças como a CEB. O objetivo desse trabalho foi avaliar, através de estudo de caso, amostras de pão de abelhas, abelhas adultas e pólen apícola em regiões atingidas e não atingidas pela CEB, diagnosticando a presença de fungos, visando fornecer informações importantes para a elucidação do agente etiológico da CEB no estado do Rio de Janeiro. Um total de 48 amostras de pão de abelhas, 15 de abelhas adultas e 12 de pólen apícola, foram adquiridas de regiões endêmicas (Barra do Piraí, Mendes e Itaipava) e regiões não endêmicas (Barra Mansa) da CEB no estado do Rio de Janeiro. As coletas ocorreram nos meses que antecederam, durante e após o período da doença. A enumeração da microbiota (ufc g⁻¹) foi realizada através do método de diluição decimal com semeadura em placas utilizando-se meios de cultivo gerais e seletivos. Foram determinadas a frequência de isolamento dos gêneros fúngicos e a densidade relativa das espécies. Foi determinado o perfil toxígeno de cepas isoladas e foi feita a detecção e quantificação de aflatoxina B₁ no pão de abelhas e pólen apícola. Nos resultados obtidos das amostras do estudo de caso, o pão de abelhas mostrou ser o melhor substrato para o veículo de contaminação para a colmeia. Observou-se também altas contagens fúngicas, além da presença de micotoxinas e fungos entomopatogênicos, como *Aspergillus flavus*, *A. niger* agregados e *A. fumigatus*, que favorecem a queda da imunidade desses insetos deixando-os suscetíveis a diversas doenças, entre elas a própria CEB.

Palavras chave: Sanidade apícola, Cria Ensacada Brasileira, fungo, micotoxina.

ABSTRACT

The The Brazilian Sac Brood (BSB) is a disease with high and fast mortality of larvae in pre-pupae stage. The symptoms are similar to those of European Sac brood (ESB) however, the reasons for BSB's high occurrence it's unknown once that the Sac Brood Virus (SBV), causer of the ESB was not detected in our country. It was observed a high mortality of broods in several regions which contained pollen from *Stryphnodendron* spp. While the pollen of these plants was proven to be toxic for bees, it is possible that these floral species are not etiologically involved with BSB in Rio de Janeiro's state, since the disease is occurring in regions where this pollen is insignificant to cause so high mortality. Studies show that during foraging, bees may accidentally collect fungal conidia, which are deposited into the hive, where its development leads to an immune system decrease of these insects, besides facilitate the entry of several vectors in the hive, causing diseases such as BSB. The aim of this study was to assess, through case study, samples of bee bread, adult bees and bee pollen in regions affected and not affected by the BSB, verifying the presence of fungi in order to provide important data for the elucidation of BSB's etiologic agent in Rio de Janeiro. A total of 48 samples from bee bread, 15 of adult bees and 12 of pollen, were acquired in endemic areas (Barra do Pirai, Mendes and Itaipava) and non-endemic regions (Barra Mansa) of BSB in Rio de Janeiro state. These samples were collected in months before, during and after the period of the disease. The mycoflora enumeration (cfu g⁻¹) was performed by the decimal dilution method using Petri dishes containing both selective and general culture media. The isolation frequency of fungi and relative density of species were determined. It was evaluated the toxigenic strains profile and was made the detection and quantification of aflatoxin B₁ in bee bread and pollen. The results obtained from studied samples showed that the bee bread was the best substrate serving as vehicle for hive contamination. It was also observed high fungal counts and the presence of mycotoxins and entomopathogenic fungi such as *Aspergillus flavus*, *A. niger* aggregate and *A. fumigatus*, which favors a weakened immune system of these insects leaving them susceptible to various diseases, including the BSB itself.

Keywords: Health beekeeping, brood Brazilian, fungus, mycotoxin.

1 INTRODUÇÃO

As abelhas são alvo de diversos inimigos naturais, que podem atacar as crias e/ou os adultos da colmeia (BEZERRA, 2009).

O ambiente interno de uma colônia de abelhas é caracterizado por altas temperaturas e baixa umidade; há intensa comunicação e contato entre os seus indivíduos, o que pode controlar ou favorecer a disseminação de patógenos de doenças (WILKES; OLDROYD, 2002).

Entre as doenças mais comuns que afetam as crias de *Apis mellifera*, destaca-se a Loque Pútrida Americana causada pela bactéria *Paenibacillus larvae larvae*, que é a doença mais difundida no mundo, recentemente detectada no Brasil. A Loque Pútrida Européia é outra doença causada por bactéria, a *Melissococcus pluton*. Essas doenças caracterizam-se pela alta mortalidade de larvas, na maioria das vezes antes de serem operculadas. Particulariza-se que no segundo tipo de Loque, os sintomas podem ser atenuados, e por vezes a disseminação do bacilo é controlada pelas abelhas (EMBRAPA, 2003b).

Dos vetores de doenças de abelhas destacam-se os fungos, organismos saprófitas comuns de abelhas e de favos. Os fungos quando em condições de temperatura e umidade adequadas são capazes de produzir substâncias tóxicas denominadas micotoxinas. As micotoxinas são produzidas durante o metabolismo secundário de algumas espécies fúngicas, causam efeitos adversos, podendo levar à morte de acordo com a quantidade ingerida, inalada ou por contato. A maioria dos fungos são coletados acidentalmente pelas abelhas quando forrageiam e são comumente incapazes de estabelecer-se no interior da colmeia. No entanto, algumas espécies fúngicas, como os do gênero *Aspergillus* são consideradas patógenas para abelhas. Esses fungos iniciam sua infecção através da germinação dos conídios; suas hifas penetram no corpo da abelha desenvolvendo-se rapidamente e comprometendo seus órgãos. Essa invasão também pode ocorrer através da ingestão acidental de esporos fúngicos presentes em sua alimentação, que por sua vez também acabam germinando em seu intestino. Alguns fatores como: estresse, condições abióticas, poluição ambiental, envenenamento por pesticidas, entre outros, ajudam no desenvolvimento de infecções fúngicas em abelhas. Esses fatores somados a uma barreira de proteção pouco eficiente presente no corpo e no aparelho digestivo das abelhas, podem reduzir a resistência do inseto, comprometendo assim, o sistema imunológico o que acaba deixando as abelhas suscetíveis a diversas doenças (GLINSKI; BUCZEK, 2003).

É relatado em literatura que espécies fúngicas como *Aspergillus flavus*, *A. niger* agregados e *A. fumigatus* são consideradas espécies entomopatogênicas, quando presentes em colmeias, podem causar a queda da imunidade desses insetos deixando-as propícias a entrada de outros vetores e agentes causadores de doenças.

O fungo *Ascospaera apis*, é conhecido por causar a Cria Giz levando à mumificação de larvas e pupas; as larvas infectadas morrem geralmente logo após a operculação das células. No Brasil, a Cria Giz foi relatada em casos isolados em alguns estados do Brasil. A Aspergilose, também conhecida como Cria Pedra, é outra doença causada por certas espécies de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* agregados, que provocam a mortalidade de larvas, pupas e abelhas adultas. É importante destacar que estas espécies causadoras da aspergilose são também importantes produtoras de micotoxinas (PACHECO, 2007).

As abelhas adultas também podem ser atingidas pela Aspergilose, além da Nosemose, Acariose e algumas viroses. Os patógenos *Nosema apis* e *Acarapis woodi*, praticamente não tem sido detectadas nos últimos anos no Brasil (EMBRAPA, 2003b).

A Varroatose é outra doença existente em todo o mundo, considerada difícil de erradicar, e gera grandes prejuízos para os apicultores em todo o mundo. No Brasil é causada pelo ácaro *Varroa destructor*, que originalmente parasita uma espécie silvestre do gênero *Apis*, a *Apis cerana* (CAP, 2007).

Atualmente, um fenômeno que vêm chamando a atenção mundial é o Distúrbio do Colapso das Colônias (DCC), tratado como um misterioso desaparecimento de abelhas nos Estados Unidos e na Europa e que começa a ser motivo de preocupação também no Brasil. O fenômeno teve início em 2006 e até hoje os cientistas não conseguem explicar suas causas. As abelhas saem em busca de néctar e pólen e não retornam mais às colmeias. Enxames inteiros somem sem motivo aparente. Por serem importantes polinizadoras naturais, as abelhas têm papel fundamental no equilíbrio ambiental e na agricultura, levando o pólen de uma flor a outra e assim, induzindo a formação de frutos e sementes. Só nos Estados Unidos calcula-se que os prejuízos econômicos por falta de polinização das abelhas podem chegar a US\$ 14 bilhões. Lá o problema é conhecido como “Desordem de Colapso de Colônias” (CCD). No Brasil, essa desordem já foi observada na região Sudeste, porém com algumas diferenças, as abelhas aparecem mortas perto das colméias, não se descarta a hipótese da morte durante o forrageamento. No domínio de nossos pastos apícolas, a abelha africanizada, é ainda bem mais resistente à doenças, do que as subespécies européias, podendo nesse caso apresentar sintomatologia diferente (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2010).

Atualmente um dos principais problemas que aflige a apicultura em algumas regiões do Brasil, trata-se da enfermidade conhecida como Cria Ensacada Brasileira.

A CEB é uma doença com alta e rápida mortalidade das larvas pré-pupas. Os sintomas dessa doença são muito semelhantes aos da Cria Ensacada Européia, uma virose conhecida mundialmente, onde a larva acumula o líquido ecdisial abaixo da cutícula, não conseguindo realizar muda para o estágio pupal, gerando um escurecimento da região cefálica e, com o passar do tempo, de todo o seu corpo (Figura 1) (MESSAGE, 2002).

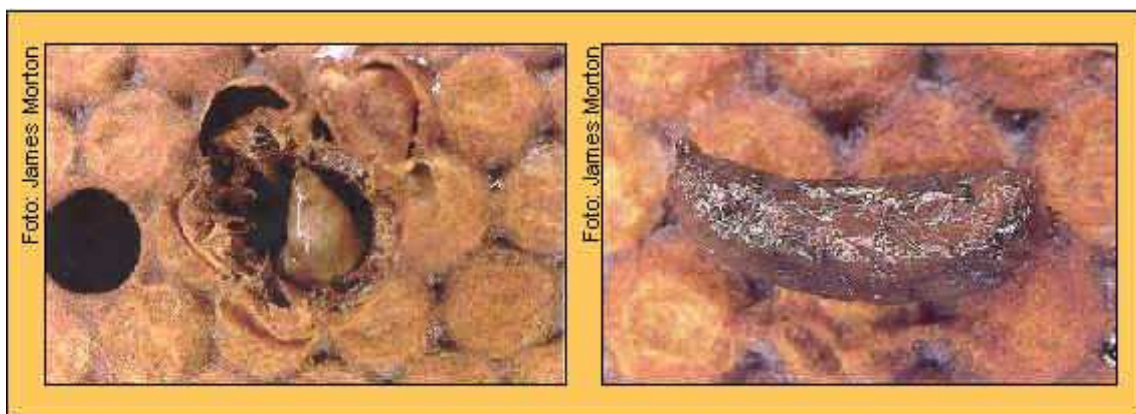


Figura 1. Pré-pupas com sintomas de Cria Ensacada Européia semelhantes à Cria Ensacada Brasileira.

Fonte: EMBRAPA (2003b).

Porém, os motivos da CEB no Brasil se mostram indeterminados já que o *Sac Brood Virus* (SBV) causador da Cria Ensacada Européia, não foi detectado em nossos país. Foi verificado então que o motivo de alta mortalidade da cria em várias regiões era o pólen de *Stryphnodendron*, conhecida comumente como “barbatimão” (GONÇALVES, 2008).

O barbatimão é uma árvore da família das leguminosas, possui casca adstringente e é rica em tanino, uma substância considerada tóxica (Figura 2) (PLANTAS MEDICINAIS, 2009).



Figura 2. Imagem da planta *Stryphnodendron*.

Fonte: <http://plantas-medicinais.me/wp-content/uploads/2009/06/espiga2.jpg>.

Embora comprovada a toxidez do pólen dessas plantas para as larvas de abelhas, é possível que estas espécies florais não estejam envolvidas na etiologia da CEB no estado do Rio de Janeiro, já que a doença está ocorrendo em regiões onde a presença do barbatimão é insignificante para provocar tão alta mortalidade. Entre os anos de 2005-2006 foi realizado um estudo com base na análise palinológica de amostras provenientes de apiários com sintomatologia da CEB no estado do Rio de Janeiro, que permitiu verificar os tipos polínicos utilizados como o recurso floral na colônia e, portanto, se havia algum consumo de pólen tóxico em condições naturais. Neste estudo foi observada a ausência do tipo polínico *Stryphnodendron* na alimentação das larvas afetadas pela CEB (PACHECO; BARTH; LORENZON, 2009).

Em um estudo preliminar, a partir de amostras de pólen apícola com sintomatologia da CEB, foram isolados os fungos: *Alternaria alternata* e *Claviceps purpurea*. Sendo detectada, por cromatografia de camada fina, a presença de micotoxinas fluorescentes (PACHECO; FREIRE; LORENZON, 2006).

No ano de 2007, em amostras de pólen apícola e pão de abelhas originárias de colmeias com sintomatologia da CEB, foram encontradas aflatoxinas B₁ e G₁. Sendo observado que a colonização do pólen apícola e do pão de abelhas, por fungos potencialmente toxígenos pode acabar resultando em contaminação do alimento da larva com micotoxinas (PACHECO, 2007).

É relatada na literatura a presença de fungos, principalmente produtores de ocratoxina A (OTA) e aflatoxinas no pólen das abelhas. Tais considerações fazem surgir a suspeita de que a CEB seja causada por um fungo, micotoxina ou ambos, presente no pólen e pão de abelhas, já que estes são produtos essenciais para as abelhas.

E já se sabe que micotoxinas, como as aflatoxinas, quando incorporadas à dieta de abelhas adultas (colmeias de *Apis*) provocam mortalidade dessas abelhas, mesmo em concentrações baixas, sendo esses insetos mais sensíveis a aflatoxina B₁ (AFB₁). A AFB₁ é a mais comum e tóxica dentre as aflatoxinas, que são micotoxinas hepatotóxicas e imunossupressoras em homens e animais, e são produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. E já está comprovado que as aflatoxinas agem diretamente no sistema nervoso central das abelhas, afetando o sistema endócrino e, muito provavelmente, o seu sistema de

defesa interno, diminuindo assim, a resistência desses insetos possibilitando a ocorrência de outras doenças.

Portanto, estudos indicam que as micotoxinas podem estar relacionadas com a mortalidade de larvas devido a CEB no estado do Rio de Janeiro. Em razão destes fatos, se torna necessária a investigação da ocorrência de microrganismos e micotoxinas em colmeias afetadas por esta doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais

Os apiários amostrados pertenciam aos seguintes municípios do estado do Rio de Janeiro: a) Barra Mansa, pertencente à mesorregião Sul fluminense (microrregião do Médio Paraíba) (22°32'39"S; 44°10'17"W, a 381 metros de altitude); b) Barra do Piraí, pertencente à mesorregião Sul fluminense (microrregião do Médio Paraíba) (22°28'12"S; 43°49'32"W, a 363 metros de altitude); c) Mendes, pertencente a mesoregião Metropolitana (microrregião Centro Sul fluminense), (22°31'36"S; 43°43'58"W, 446 metros de altitude; d) Itaipava, distrito de Petrópolis, pertencente à mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro (microrregião Serrana) (22°30'18"S; 43°10'44"W, 845 metros de latitude. A divisão em mesoregiões do estado do Rio de Janeiro está apresentada na Figura 3.

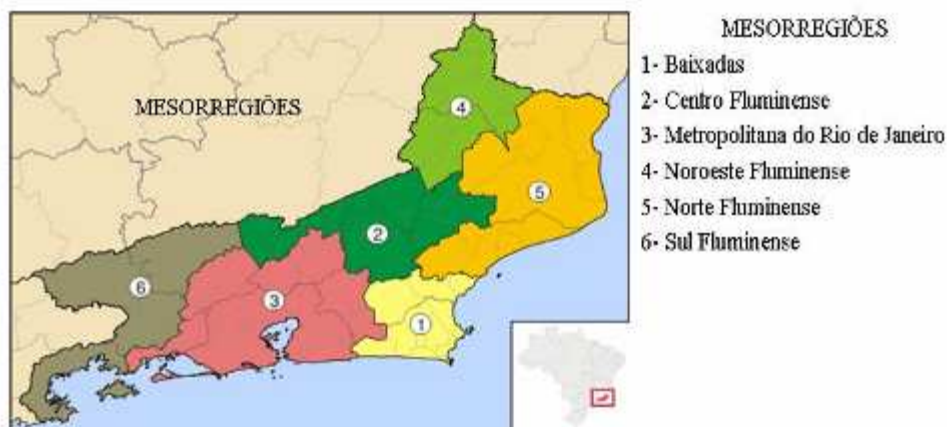


Figura 3. Imagem das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista_de_mesorregi%C3%B5es_do_Rio_de_Janeiro.

A escolha dos locais de amostragem obedeceu aos seguintes critérios: proximidade (100 km) do local de manipulação (laboratório); disponibilidade do apicultor para colaborar nas revisões durante a amostragem; de regiões endêmicas (Barra do Piraí, Mendes e Itaipava) e não endêmicas (Barra Mansa) da CEB; e de colméias de região não endêmica (Barra Mansa) transladadas para região endêmica (Mendes); criações (apiários) com condições mínimas de higiene e do uso da tecnologia apícola.

2.2 Instalações

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). Em todos os apiários a distância de construções era inferior a 50 metros. Cada apiário apresentava no mínimo 15 colmeias de abelhas africanizadas, onde foram selecionadas cinco colmeias ao acaso; todas as colmeias amostradas eram populosas, com ninho completo de 10 favos e mais uma a duas melgueiras, com 10 favos cada (Figura 4).

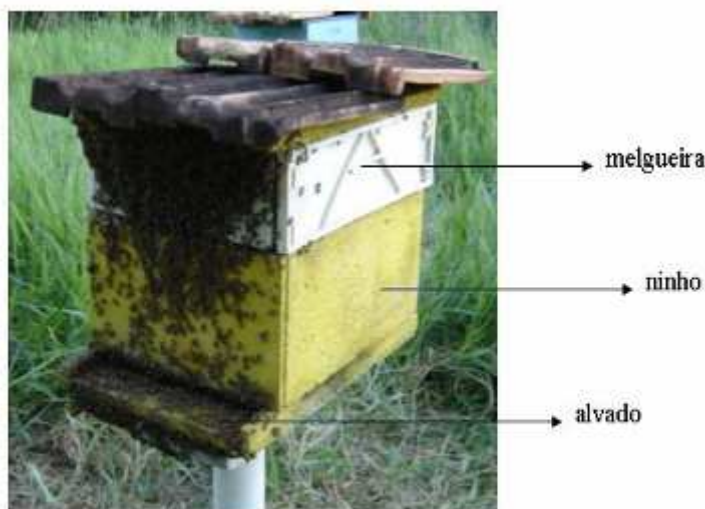


Figura 4. Imagem de uma colmeia de abelhas africanizadas populosa, com ninho e melgueira, apresentando seu alvado repleto de abelhas.

2.3 Amostragem

As coletas ocorreram nos meses que antecederam, durante e após o período de doença, que sempre corresponde no estado do Rio de Janeiro a um período de safra de mel, com provável coleta de mel para o produtor.

A amostragem era feita até duas vezes por colmeia, independente da colmeia apresentar ou não os sintomas da CEB, já que este procedimento provocava grande dano no ninho das colmeias. Nem sempre foi possível se obter amostras de colmeias com sintomas da CEB, como ocorreu com o município de Barra do Piraí, sendo possível que a doença tenha ocorrido pós-amostragem. Considera-se que, mesmo sem os sintomas, é provável a presença do vetor, assim, a metodologia incidiu a amostragem em colmeias com e sem a sintomatologia aparente da CEB.

2.3.1 Material amostrado

A origem, os tipos, quantidades e o período de coleta das amostras estão listadas na Tabela 1. A disponibilidade de cada colmeia foi um ponto crucial para a obtenção da amostragem.

Tabela 1. Origem, tipo, quantidades e período de coleta das amostras. 2009 – 2010.

AMOSTRAGEM	REGIÕES DE COLETA	QUANTIDADE DE AMOSTRAS	PERÍODO DE COLETA (mês e ano)
Pólen apícola	Itaipava	10	12/2009 a 01/2010
	Mendes	2	09/2010 a 10/2010
	Itaipava	19	12/2010 a 01/2010
	Mendes	15	09/2009 a 09/2009
Pão de abelhas	Barra do Pirai	6	08/2009 a 10/2009
	Barra Mansa	4	08/2010 a 10/2010
	Barra Mansa transladada	4	08/2010 a 10/2010
	Itaipava	3	12/2010 a 01/2010
	Mendes	1	09/2009 a 09/2009
Abelha adulta	Barra do Pirai	3	08/2009 a 10/2009
	Barra Mansa	4	08/2010 a 10/2010
	Barra Mansa transladada	4	08/2010 a 10/2010

Dentro da colmeia foram retiradas amostras de pão de abelhas e abelhas adultas. O pão de abelhas (pólen depositado nos favos) foi coletado na base de favos com crias (do ninho), com cortes de aproximadamente cinco centímetros de diâmetro, feito com o auxílio de bisturi estéril e as abelhas adultas coletadas foram aquelas aderentes aos favos de ninho (Figura 5).

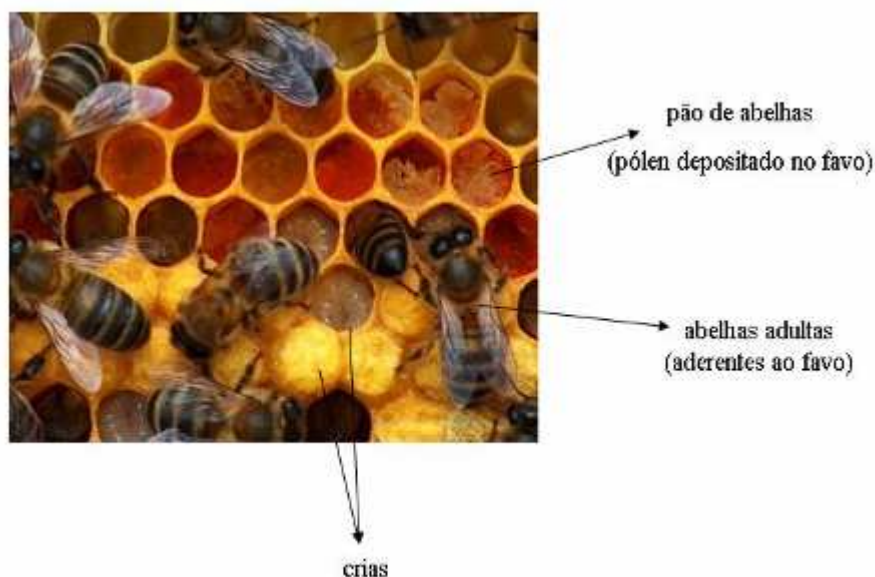


Figura 5. Imagem de um favo com crias e alimento de uma colmeia de abelhas africanizadas.

Fonte: <http://www.serradocaraca.com.br/adesb-capacita-apicultores-para-processamento-de-polen/>

Externo as colmeias, foi obtido o pólen apícola, que foi tomado através de um coletor (caça-pólen). Dois tipos de coletores foram usados: o de alvado e o de melgueira.

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 da CEB nas regiões de estudo, descritos por Pacheco (2007). A amostragem nos municípios de Barra do Pirai e Mendes ocorreu de setembro a outubro/2009, que correspondeu ao período de “seca” e a do município de Itaipava, de dezembro/2009 a janeiro/2010, que correspondeu ao período chuvoso.

Nos dias de amostragem utilizou-se equipamento de proteção individual (EPIS), próprio para manejo de colmeias, e exigiu que esta manipulação fosse feita por pelos menos dois técnicos. As amostras foram imediatamente acondicionadas em recipientes próprios de uso laboratorial (recipientes estéreis, isopor, gelo, papel laminado), armazenadas em isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ. Este processo transcorreu em período máximo de 24 horas. No laboratório, as amostras foram discriminadas por município, com e sem sintomatologia aparente da CEB.

2.4 Determinação da A_a das Amostras

As amostras de pão de abelhas e pólen apícola, foram imediatamente analisadas quanto a A_a , em equipamento AquaLab[®] modelo CX 2 (Decagon Devices Inc., Pullman, Washington, USA) (Figura 6). Para sua mensuração, cada amostra foi colocada em um recipiente próprio do aparelho, 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 6. Visualização do aparelho AquaLab[®] modelo CX 2 (Decagon Devices Inc., Pullman, Washington, USA).

Fonte: <http://www.laboscientifica.it/eng/prodotti/scheda.jsp?codice=82>

2.5 Isolamento e Identificação da Microbiota Contaminante

A análise das amostras realizou-se através do método de diluição decimal seriada em placa para isolamento e contagem da microbiota total (PITT; HOCKING, 1997).

Para a enumeração quantitativa de fungos filamentosos em unidades formadoras de colônias por grama de alimento (ufc g^{-1}) obedeceu-se ao seguinte procedimento:

- Foram pesadas em balança calibrada 0,1g das amostras de pólen apícola, pão de abelhas e abelhas adultas. Em seguida, verteu-se em microtubo estéril contendo 900 μL de água peptonada 0,1% estéril (diluição 10^{-1}) onde foram devidamente homogeneizadas.

- Para as abelhas adultas da mesma colmeia, este procedimento foi realizado de duas formas: Após maceração - com a finalidade de se observar se esses insetos ingerem conídios presentes nas colmeias - e após lavagem - com a finalidade de se observar se esses insetos carregam em seu corpo conídios, levando-os para dentro das colmeias. No caso das abelhas maceradas utilizou-se graal e pistilo, devidamente esterilizados com álcool iodado a 2% e flambados em bico de Bunsen. Quanto ao conjunto de abelhas lavadas, cada amostra foi levada ao vórtex e agitado por cinco minutos (Figura 7).



Figura 7. Procedimento anterior a diluição decimal seriada, (a) macerado das abelhas adultas e (b) lavado das abelhas adultas.

Após a diluição inicial (10^{-1}) foram feitas diluições decimais seriadas até 10^{-4} . Em seguida, inoculou-se em triplicata alíquotas de $100\mu\text{L}$ de cada uma das diluições em três meios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (PITT; HOCKING, 1997); é o que melhor expressa a qualidade higiênica dos alimentos, já que possui condições ideais que permite o crescimento da microbiota se presente no alimento, por isso é utilizado para contagem geral, agar dicloran glicerol a 18% (DG18) (HOCKING; PITT, 1980) que é seletivo para fungos xerofílicos, ou seja, fungos que conseguem crescer em condições de baixa A_a e Nash Snyder agar (NSA) (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983) citado na literatura como um meio seletivo para fungos do gênero *Fusarium* (Figura 8).

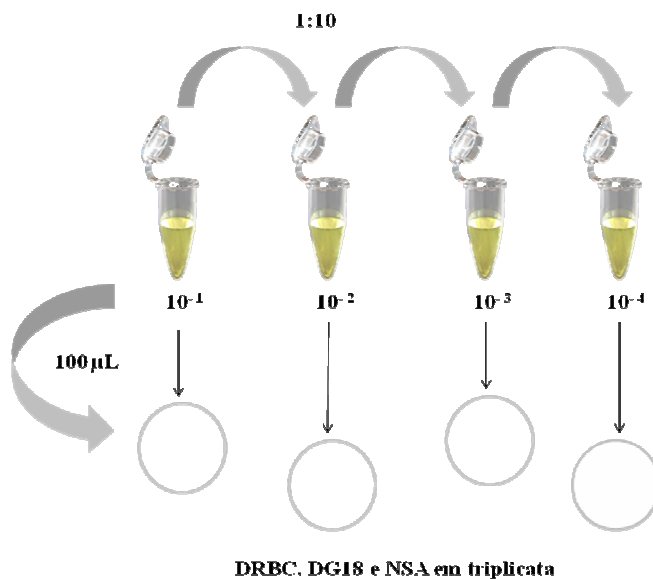


Figura 8. Diluição decimal seriada do pólen apícola, pão de abelhas, lavado e macerado de abelhas adultas.

Logo após a diluição, as placas foram incubadas por cinco a sete dias em estufas microbiológicas de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dotadas de controle eletrônico de temperatura ambiente. Todas as placas foram observadas diariamente, e foram selecionadas para a enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 ufc g^{-1} . O período para leitura não ultrapassou sete dias.

A identificação do táxon gênero, de todas as colônias consideradas diferentes (características macroscópicas e microscópicas) foi realizada segundo Samson et al. (2000). As colônias fúngicas identificadas como *Aspergillus* e *Penicillium* foram cultivadas em tubos contendo meio agar extrato de malte (MEA) e as de *Fusarium* o meio utilizado foi o agar V8 (V8). Todos os tubos foram conduzidos para estufas apropriadas para cada táxon gênero, para posterior identificação do táxon espécie.

Para a identificação do táxon espécies, utilizaram-se chaves taxonômicas apropriadas de cada grupo particular: Klich (2002) para *Aspergillus*, Pitt (1988) para *Penicillium* e Nelson; Toussoun; Marasas (1983), com modificações para *Fusarium*.

A classificação do táxon espécies de *Aspergillus* foi baseada na sementeira padrão em três meios básicos: agar Czapek extrato de levedura (CYA); agar Czapek extrato de levedura sacarose a 20% (CY20S) e agar extrato de malte (MEA). Preparou-se uma suspensão de conídios a partir de cada cepa, em $0,5\text{ mL}$ de meio agar semi-sólido, que foi obtido a 0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuídos em microtubos estéreis. Nessa suspensão de conídios, introduziu-se uma alça de platina em forma de agulha inoculando-a nos meios de cultivo (Figura 9).

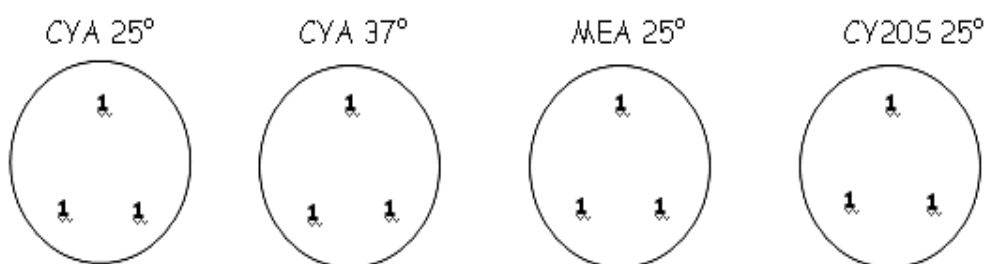


Figura 9. Inoculação e incubação de cepas de *Aspergillus* de acordo com os meios de cultura e temperaturas indicados pela chave correspondente.

Fonte: (KLICH, 2002).

A chave utilizada para a identificação do táxon espécies de *Penicillium*, foi baseada na sementeira em três meios básicos como: CYA; MEA e G25N (agar nitrato glicerol a 25%); para maior eficiência e aproveitamento do sistema, inoculou-se as placas de Petri com duas cepas diferentes a serem testadas (Figura 10).

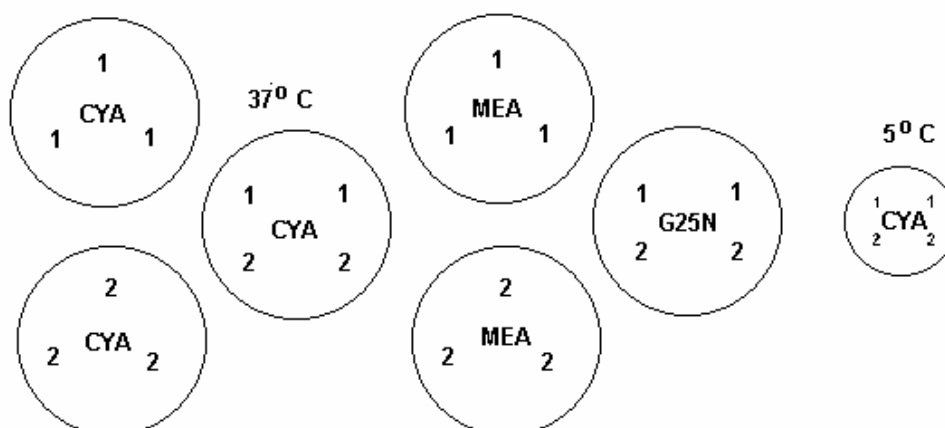


Figura 10. Inoculação e incubação de cepas do gênero *Penicillium* de acordo com os meios de cultura e temperaturas indicadas pela chave correspondente.

Fonte: (PITT, 1988).

Já para a identificação do táxon espécies de *Fusarium*, depois de um período em que as colônias foram cultivadas em tubos com o meio agar (V8), foi realizado o cultivo monospórico, onde, recolheu-se uma pequena quantidade de micélio da colônia subcultivada e agitou-se em um tubo com cerca de 10mL de água destilada estéril. O conteúdo foi então vertido sobre a placa de Petri contendo agar água a 2% e homogenizado em movimentos em forma de “oito” sobre a bancada. O sobrenadante foi descartado e a placa incubada, em temperatura ambiente, inclinada em um ângulo aproximado de 45°. Após 12 horas foi utilizada a lupa para a procura de conídios germinados isolados. Foram recortados dois conídios, um conídio foi transferido para o meio agar folhas de bananeira (BLA) em placa, modificando a metodologia original que utiliza o meio agar folhas de cravo (CLA) e o outro conídio transferido para o meio agar batata dextrose (BDA) em tubo inclinado. As colônias foram então, incubadas por sete dias a 24°C, obedecendo fotoperíodo de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra (Figura 11).

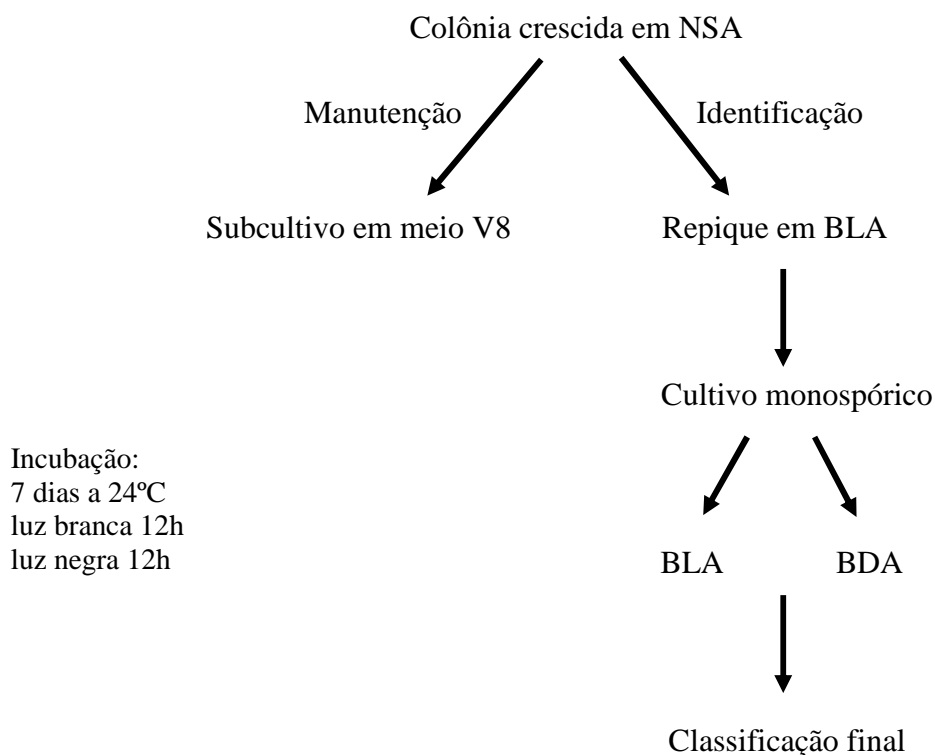


Figura 11. Modelo de identificação de espécies de *Fusarium* de acordo com a chave taxonômica indicada.

2.6 Caracterização do Perfil Toxígeno das Espécies Isoladas

As cepas das seções *Flavi* e *Nigri* do gênero *Aspergillus* foram analisadas quanto a capacidade toxígena segundo metodologia descrita por Geisen (1996) e Bragulat; Abarca; Cabañes (2001), respectivamente.

Para a caracterização do perfil toxígeno realizou-se o seguinte procedimento:

- as espécies potencialmente produtoras de aflatoxinas isoladas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio cultivo agar extrato de malte (MEA);
- as espécies potencialmente produtoras de ocratoxina A isoladas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo agar Czapek extrato de levedura (CYA);
- as placas inoculadas foram incubadas em estufas com temperatura de 25°C por sete dias;

Após o período de sete dias, foram retirados três fragmentos equidistantes da colônia pertencente a seção *Flavi* e transferidos para microtubos contendo 1mL de clorofórmio. Paralelamente, foram retirados três fragmentos equidistantes da colônia pertencente a seção *Nigri* e também transferidos para microtubos com 1mL de metanol. Os microtubos foram centrifugados por 10 min a 4.000 rotações por minuto (rpm), transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo, permanecendo abertos por 24h para evaporação passiva. Depois de seco, os extratos foram armazenados a -4°C até o momento da análise, quando foram então ressuspensos em 1mL de cada um dos seus respectivos solventes de extração.

A detecção por CCD consistiu em uma corrida unidimensional, onde foram aplicados 10µL de cada extrato amostral, assim como dos padrões em placas 20x20 cm de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura (G60 Merck), utilizando-se como fase móvel tolueno: clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (70: 50: 50: 10 v/v). Após a evolução, a cromatoplaça foi observada em cromatovisor sob radiação UV de $\lambda = 365\text{nm}$, para evidenciação das manchas

fluorescentes características de cada toxina. Foram considerados positivos os extratos analisados com manchas fluorescentes semelhantes ao padrão na cor e com o mesmo deslocamento (Rf). Os extratos positivos para aflatoxinas B₁ foram submetidas à quantificação por CLAE.

2.7 Quantificação de Aflatoxina B₁ Produzida *In Vitro* pelas Cepas Tóxicas Isoladas

As cepas detectadas por CCD como produtoras de AFB₁ tiveram sua produção quantificada por CLAE. Foi utilizada CLAE em fase reversa com um detector UV-Vis em comprimento de onda igual a 360nm e coluna C18 (Microsorb-MV, Varian®; 150mm x 4,6 mm x 5µm). Como fase móvel utilizou-se água:metanol:acetoneitrila (60:20:20) com fluxo de 0,7mL/min. O volume de injeção foi de 20µL. Foi obtido um tempo de retenção de 14min ± 1 e o limite de detecção da técnica foi de 2ng g⁻¹ (ppb).

2.8 Detecção e Quantificação de Aflatoxina B₁ das Amostras

A ausência de literatura sobre métodos de extração de micotoxinas a partir de pólen apícola e pão de abelhas, limitou a escolha de metodologias a serem aplicadas. A metodologia de eleição no presente estudo foi o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), comumente usados para quantificar toxinas em diferentes substratos.

Em matrizes consideradas complexas é importante realizar uma etapa prévia de purificação, por isso utilizou-se colunas de imunoafinidade (IAC), método baseado em interações biológicas fortemente específicas, como, reações antígeno-anticorpo (Figura 12).

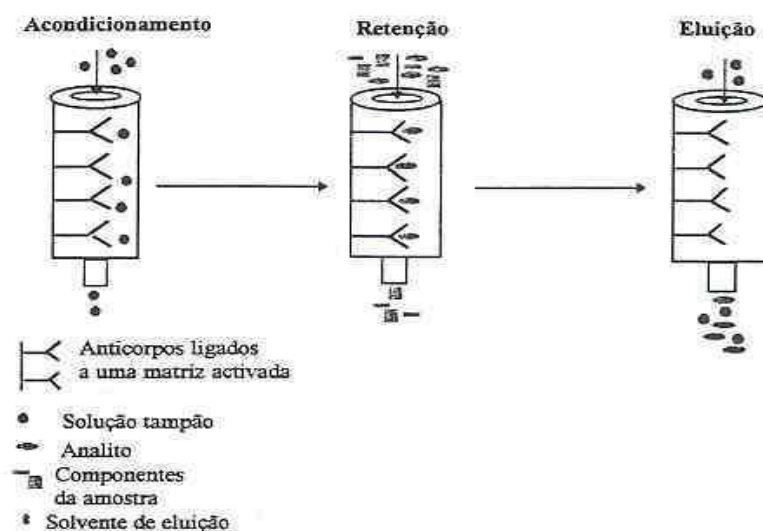


Figura 12. Princípio de purificação das colunas de imunoafinidade.

Fonte: (AMADO, 2008).

Para verificação intralaboratorial do desempenho do método proposto IAC seguido de ELISA foram realizados testes de recuperação. Nestes testes, fez-se a adição do componente de interesse à matriz seguida da execução do método que está sendo avaliado. Em nosso estudo, nas triplicatas de cada substrato foram adicionados 23,7 ng de AFB₁ (amostras fortificadas). O teor medido do componente adicionado foi dividido pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100, obtendo-se assim a percentagem de recuperação. As amostras fortificadas e *in natura* foram processadas seguindo metodologia indicada pelo fabricante - *Romer Labs Singapore Pte. Ltd.* (Singapura) com adaptações para cada substrato.

O método para o pólen e pão de abelhas sofreu adaptações, pois, a quantidade de amostras de pólen apícola e de pão de abelhas precisou ser reduzida devido a dificuldade de se conseguir estes substratos em quantidades suficientes sem que causassem danos à colméia. Assim, utilizaram-se 10g de pólen apícola e 5g de pão de abelhas, sempre mantendo a proporção de amostra-solvente/diluyente recomendada.

As colunas de imunoafinidade (Star™ IAC) continham anticorpos que se ligavam seletivamente à toxina de interesse (AFB₁) do extrato bruto. Durante a limpeza, os interferentes presentes na amostra eram lavados enquanto a toxina, quando presente, ia sendo imobilizada na coluna. Na última etapa, a toxina foi eluída da coluna para posterior determinação por ELISA. O extrato obtido foi seco com o auxílio de nitrogênio líquido e armazenado em frascos âmbar a -4°C até o momento da análise. Todos os extratos foram ressuspendidos em 1mL de metanol grau espectroscópico no momento em que foram submetidos à determinação de aflatoxinas por ELISA.

O *kit* AgraQuant® utiliza o método de ELISA competitivo direto para análise quantitativa de AFB₁. Dentro de cada poço de diluição do *kit* foram adicionados e homogeneizados 200µL do conjugado enzimático e 100µL do extrato ou padrões calibradores. Desta mistura foram transferidos 100µL para os micropoços revestidos de anticorpos. Após 15min, o conteúdo foi descartado e os micropoços lavados cinco vezes com água destilada. Depois de totalmente secos foram adicionados 100µL de substrato enzimático em cada um, desenvolvendo uma coloração azul proporcional à presença de aflatoxinas nos extratos. Decorridos cinco minutos, foram pipetados 100µL da solução Stop e a coloração do conteúdo mudou de azul para amarelo (Figura 13). Assim, as tiras encontravam-se prontas para serem lidas opticamente em um leitor de micropoços com filtro de absorvância de 450nm e um filtro diferencial de 630nm.

Utilizando os valores de absorvância expressos para os seis padrões calibradores fornecidos pelo *kit* foi construída uma curva dose-resposta. As densidades ópticas das amostras foram comparadas às absorvâncias dos padrões e os resultados foram calculados usando a tabela Romer® Log/ Logit que foi fornecida pelo fabricante.

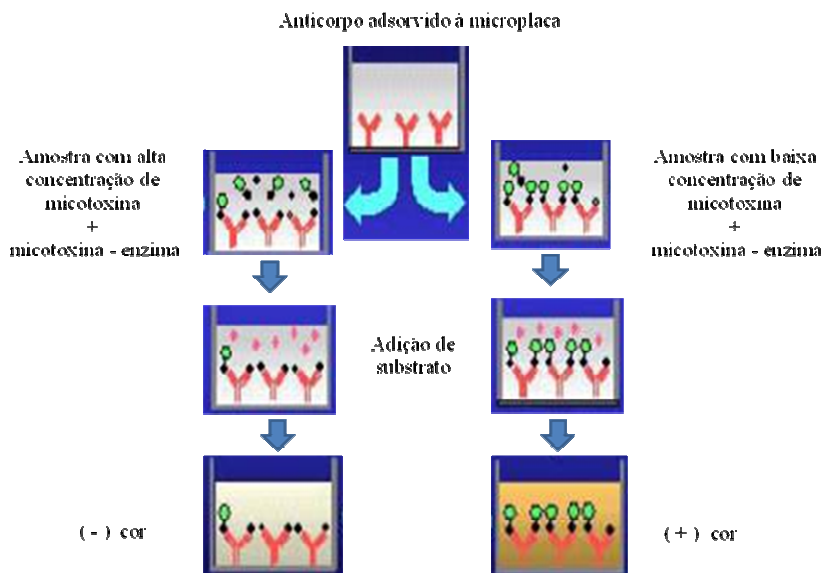


Figura 13. Esquema do ELISA competitivo direto.

2.9 Análises Estatísticas

A tabulação dos dados obedeceu a várias categorias, conforme mostra a Tabela 2. A análise estatística se resumiu a análise de variância (ANOVA). Os dados foram submetidos previamente ao teste de *Shapiro Wilk*, adotando-se um nível de probabilidade de 5%. Para os resultados que não seguiram a normalidade, a análise foi apenas descritiva.

Tabela 2. Categorias que os substratos foram submetidos para a análise da estatística.

Substratos	Categorias Analisadas
Pólen Apícola	Sintomas Não Aparentes x Sintomas Aparentes
Pão de Abelhas	Sintomas Não Aparentes x Sintomas Aparentes Região Não Endêmica x Região Endêmica Barra Mansa transladada x Barra Mansa
Abelha Adulta	Lavado Região Endêmica x Macerado Região Endêmica Macerado Região Não Endêmica x Macerado Região Endêmica

As seguintes hipóteses foram submetidas à ANOVA:

- 1) a contaminação da colmeia pode ter vindo do campo através do pólen e do néctar.
- 2) a abelha adulta pode ter em seu corpo conídios aderidos e/ou já ter ingerido esses conídios através de alimentos, como por exemplo, pão de abelhas.
- 3) espera-se que a contaminação seja maior em colmeias saudáveis do que em colmeias doentes.
- 4) as abelhas ingerem conídios de fungos presentes em colmeias de regiões endêmicas, favorecendo a queda de resistência o que a deixa propícia a doenças como a CEB.
- 5) considerando-se que há localidades endêmicas da CEB no estado do Rio de Janeiro é possível que essas localidades apresentem maior contaminação fúngica.

3 RESULTADOS

3.1 Determinação da A_a das Amostras de Pólen Apícola e Pão de Abelhas do Estudo de Caso

Foi verificada a A_a de acordo com cada categoria para os substratos pólen apícola e pão de abelhas, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Apresentação da mediana da A_a das amostras de pólen apícola e pão de abelhas de acordo com cada categoria.

Pólen Apícola	Sintomas Não Aparentes	Sintomas Aparentes
	0,921	0,695
Pão de Abelhas	Sintomas Não Aparentes	Sintomas Aparentes
	0,730	0,686
	Região Não Endêmica	Região Endêmica
	0,680	0,695
	Barra Mansa transladada	Barra Mansa
	0,642	0,680

3.2 Avaliação da Contaminação Fúngica do Pólen Apícola

A Tabela 4 apresenta a carga fúngica contaminante e a microbiota presente nas amostras de pólen apícola no meio de cultivo DRBC, expressa através de unidades formadoras de colônia (ufc) por grama de amostra analisada.

Tabela 4. A carga fúngica no meio de cultivo DRBC (ufc g⁻¹), micobiota isolada, frequência e densidade relativa, em amostras de pólen apícola a partir de colmeias com sintomas aparentes e não aparentes de região endêmica (Itaipava - RJ. 2009).

	Sintomas Não Aparentes		Sintomas Aparentes	
	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹
Pólen Apícola	Frequência (%)	2,0 x 10 ⁵ A	Frequência (%)	1,0 x 10 ⁵ A
	<i>Penicillium</i> spp. (100%)		<i>Cladosporium</i> spp. (80%)	
	<i>Cladosporium</i> spp. (86%)		<i>Aspergillus</i> spp. (60%)	
	<i>Aspergillus</i> spp. (57%)		<i>Penicillium</i> spp. (60%)	
	<i>Fusarium</i> spp. (14%)		<i>Wallemia</i> spp. (40%)	
	<i>Eurotium</i> spp. (14%)		<i>Trichoderma</i> spp. (40%)	
	<i>Wallemia</i> spp. (14%)		<i>Alternaria</i> spp. (20%)	
	<i>Trichoderma</i> spp. (14%)			
	<i>Alternaria</i> spp. (14%)			
	<i>Monillia</i> spp. (14%)			
Densidade Relativa (%)		Densidade Relativa (%)		
<i>A. niger</i> agregados (25%)		<i>A. versicolor</i> (50%)		
<i>A. flavus</i> * (25%)		<i>A. niger</i> agregados (25%)		
<i>A. versicolor</i> (25%)		<i>A. fumigatus</i> (25%)		
<i>A. fumigatus</i> (17%)		<i>P. citrinum</i> (100%)		
<i>A. ochraceus</i> (8%)				
<i>P. citrinum</i> (89%)				
<i>P. citreonigrum</i> (11%)				
<i>F. oxysporum</i> (100%)				

ufc g⁻¹ resultados expressos em mediana. * Cepas com perfil toxígeno positivo.

Letras iguais maiúsculas seguidas na mesma coluna não foram diferentes entre si ($\alpha=5\%$).

OBS: Devido à dificuldade da obtenção de uma quantidade satisfatória deste substrato, analisou-se somente a categoria sintomas não aparentes x sintomas aparentes para o pólen apícola.

A contaminação do pólen apícola foi alta, o que mostrou ser um substrato em potencial para a contaminação da colmeia (Tabela 4).

Porém, estatisticamente não houve diferença significativa entre as ufc g⁻¹. Sendo assim, a contaminação da colmeia pode não ter vindo do campo que neste caso foi analisado através do pólen apícola. Mas, observa-se que nas colmeias de sintomas não aparentes, a micobiota isolada é maior, provavelmente, o número baixo de amostras dificultou a obtenção de um melhor resultado.

Em relação à micobiota isolada de colmeias sintomas não aparentes, o gênero *Penicillium* foi isolado em todas as amostras.

As espécies mais isoladas de *Aspergillus* foram: *A. flavus* e *A. niger* agregados (25%), destaca-se a presença de espécies potencialmente produtoras de Afs, de acordo com o perfil toxígeno.

Na micobiota isolada de colmeias com sintomas aparentes, o gênero mais isolado foi *Cladosporium* (80%). Do gênero *Aspergillus*, *A. versicolor* foi à espécie mais isolada (50%) e do gênero *Penicillium*, *P. citrinum* foi à única espécie encontrada.

3.3 Avaliação da Contaminação Fúngica do Pão de Abelhas e Abelha Adulta

A carga fúngica contaminante e a microbiota presentes em amostras de pão de abelhas no meio de cultivo DRBC estão na Tabela 5 até Tabela 9.

Tabela 5. A carga fúngica no meio de cultivo DRBC (ufc g⁻¹), microbiota isolada, frequência e densidade relativa, em amostras de pão de abelhas em colmeias com sintomas não aparentes e sintomas aparentes de região endêmica (Barra do Piraí, Mendes e Itaipava - RJ. 2009).

	Sintomas Não Aparentes		Sintomas Aparentes	
	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹
	Frequência (%)	7,0 x 10 ⁴ A	Frequência (%)	4,8 x 10 ⁴ A
	<i>Aspergillus</i> spp. (90%)		<i>Aspergillus</i> spp. (88%)	
	<i>Cladosporium</i> spp. (76%)		<i>Penicillium</i> spp. (63%)	
	<i>Penicillium</i> spp. (67%)		<i>Cladosporium</i> spp. (63%)	
	<i>Wallemia</i> spp. (33%)		<i>Wallemia</i> spp. (29%)	
	<i>Fusarium</i> spp. (24%)		<i>Fusarium</i> spp. (4%)	
	<i>Eurotium</i> spp. (24%)		<i>Eurotium</i> spp. (4%)	
	<i>Phoma</i> spp. (5%)		<i>Phoma</i> spp. (4%)	
	<i>Curvularia</i> spp. (5%)		<i>Mucor</i> spp. (4%)	
			<i>Trichoderma</i> spp. (4%)	
			<i>Alternaria</i> spp. (4%)	
			<i>Curvularia</i> spp. (4%)	
Pão de Abelhas	Densidade Relativa (%)		Densidade Relativa (%)	
	<i>A. flavus</i> * (28%)		<i>A. flavus</i> * (33%)	
	<i>A. niger</i> agregados (26%)		<i>A. niger</i> agregados*(31%)	
	<i>A. versicolor</i> (17%)		<i>A. fumigatus</i> (21%)	
	<i>A. fumigatus</i> (15%)		<i>A. versicolor</i> (13%)	
	<i>A. ochraceus</i> * (11%)		<i>A. ochraceus</i> (2%)	
	<i>A. ozyae</i> (4%)		<i>P. citrinum</i> (74%)	
	<i>P. citrinum</i> (100%)		<i>P. citreonigrum</i> (5%)	
	<i>F. oxysporum</i> (100%)		<i>P. miczynskii</i> (5%)	
			<i>P. decumbens</i> (5%)	
			<i>P. implicatum</i> (5%)	
			<i>P. corylophilum</i> (5%)	
			<i>F. lateritium</i> (100%)	

ufc g⁻¹ resultados expressos em mediana. * Cepas com perfil toxígeno positivo.

Letras iguais maiúsculas seguidas na mesma coluna não foram diferentes entre si ($\alpha=5\%$).

A alta contaminação e a quantidade de fungos encontrados no pão de abelhas, possivelmente, a partir do pólen apícola, mostram que é um substrato em potencial para a contaminação da colmeia (Tabela 5).

Estatisticamente não houve diferença significativa entre as ufc g⁻¹ comparadas, apesar de se esperar que a colmeia propensa à doença (sintomas não aparentes) fosse a mais contaminada. A maior diversidade de gêneros e espécies fúngicas isoladas nas colmeias de

sintomas aparentes é maior e previsível, tendo em vista que a mortandade das larvas as sujeita a mais patógenos.

Verifica-se também um aumento da micobiota isolada no pão de abelhas quando comparado ao pólen apícola, esse fato pode ser explicado pelo processo fermentativo que o pólen recebe na colmeia ao se transformar em pão de abelhas, as Tabela 4 e Tabela 5, mostram claramente a relação existente entre esses dois substratos.

Na micobiota isolada do pão de abelhas, originário de colmeias de sintomas não aparentes, o gênero mais isolado foi *Aspergillus* (90%), destaca-se *A. flavus* (28%) como a espécie mais isolada e a presença de espécies potencialmente produtoras de Afs e OTA.

Na micobiota isolada do pão de abelhas, originário de colmeias de sintomas aparentes, *Aspergillus* (88%) foi também o mais isolado, destaca-se *A. flavus* (33%) como a espécie mais isolada. Já o *P. citrinum* (74%) foi à espécie mais isolada do *Penicillium*.

A alta contagem da carga fúngica apresentada na Tabela 6, confirma o pão de abelhas como um bom veículo de contaminação para a colmeia. Porém, estatisticamente não houve diferença quando comparadas as ufc g⁻¹ das categorias região não endêmica e região endêmica.

A categoria região não endêmica apresentou uma ufc g⁻¹ alta, porém, se o número da amostragem fosse maior, mais se aproximaria do valor esperado (baixo) da carga fúngica. Nessa categoria foram isolados especificamente espécies tóxicas o que difere da região não endêmica, onde a maioria da micobiota isolada foram fungos de contaminação ambiental. Há de se considerar que na região endêmica as abelhas estão mortas nas colmeias, o que aumenta a possibilidade de encontrar-se uma carga fúngica alta em relação a fungos de contaminação ambiental e entomopatogênicos, propiciando a baixa resistência desses insetos deixando-os susceptíveis a doenças como a CEB, por exemplo.

Portanto, os resultados apresentados na tabela acima afirmam que as localidades endêmicas da CEB no estado do Rio de Janeiro apresentam maior contaminação fúngica.

Na região endêmica, o gênero *Aspergillus* (90%) foi o mais isolado, destacando-se *A. flavus* (30%) como a espécie mais isolada. *P. citrinum* (84%) foi à espécie mais isolada de *Penicillium*. Ressalta-se a presença de espécies potencialmente produtoras de Afs e OTA.

Da região não endêmica, *Cladosporium* spp. (75%) foi o mais isolado. Aparecem também as espécies *A. flavus* e *A. niger* agregados (50%) e espécies positivas para Afs.

Tabela 6. A carga fúngica no meio de cultivo DRBC (ufc g⁻¹), micobiota isolada, frequência e densidade relativa, em amostras de pão de abelhas em colmeias originárias de região não endêmica (Barra Mansa - RJ. 2010) e de região endêmica da CEB (Barra do Pirai, Mendes e Itaipava - RJ. 2009).

	Região Não Endêmica		Região Endêmica	
	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹
Pão de Abelhas	Frequência (%)	3,0 x 10 ⁵ A	Frequência (%)	5,0 x 10 ⁵ A
	<i>Cladosporium</i> spp. (75%)		<i>Aspergillus</i> spp. (90%)	
	<i>Aspergillus</i> spp. (50%)		<i>Cladosporium</i> spp. (71%)	
	<i>Fusarium</i> spp. (50%)		<i>Penicillium</i> spp. (68%)	
	<i>Penicillium</i> spp. (25%)		<i>Wallemia</i> spp. (34%)	
			<i>Eurotium</i> spp. (12%)	
			<i>Fusarium</i> spp. (7%)	
			<i>Phoma</i> spp. (5%)	
			<i>Curvularia</i> spp. (5%)	
			<i>Trichoderma</i> spp. (2%)	
		<i>Alternaria</i> spp. (2%)		
		<i>Mucor</i> spp. (2%)		
	Densidade Relativa (%)		Densidade Relativa (%)	
	<i>A. niger</i> agregados (50%)		<i>A. flavus</i> * (30%)	
	<i>A. flavus</i> * (50%)		<i>A. niger</i> agregados* (29%)	
	<i>P. citrinum</i> (100%)		<i>A. fumigatus</i> (18%)	
			<i>A. versicolor</i> (17%)	
			<i>A. ochraceus</i> * (6%)	
			<i>P. citrinum</i> (84%)	
			<i>P. citreonigrum</i> (3%)	
			<i>P. miczynskii</i> (3%)	
			<i>P. decumbens</i> (3%)	
			<i>P. implicatum</i> (3%)	
			<i>F. oxysporum</i> (67%)	
			<i>F. lateritium</i> (33%)	

ufc g⁻¹ resultados expressos em mediana. * Cepas com perfil toxígeno positivo.

Letras iguais maiúsculas seguidas na mesma coluna não foram diferentes entre si ($\alpha=5\%$).

O translado consiste no transporte da colmeia de uma região para outra. Portanto, no intervalo de uma semana, entre a obtenção de amostras e o translado (Barra Mansa para Mendes), verificou-se uma contaminação fúngica significativamente maior entre as colmeias (p -valor < 0,05) (Tabela 7) mostrando que a região endêmica de CEB favorece a contaminação.

Estatisticamente houve diferença entre as ufc g⁻¹ comparadas. Denota-se ainda a diferença da diversidade de gêneros e espécies fúngicas isoladas em maior quantidade na região de Barra Mansa transladada.

Esses resultados mostram que o pão de abelhas é o melhor substrato para a verificação do veículo de contaminação para a colmeia. E afirma a hipótese, que é possível que as localidades endêmicas da CEB no estado do Rio de Janeiro apresentem maior contaminação fúngica além de micotoxinas.

Na micobiota isolada da categoria de Barra Mansa transladada, o *Cladosporium* spp. foi isolado em todas as amostras.

O gênero *Aspergillus* (75%) foi o segundo mais isolado destacando-se a presença do *A. flavus* que se mostrou produtor de Afs.

Em relação à micobiota isolada das amostras de pão de abelhas de Barra Mansa o gênero *Cladosporium* (75%) foi o mais encontrado.

Dentro do *Aspergillus* spp, foram isolados as seguintes espécies: *A. flavus* e *A. niger* agregados (50%). Espécies potencialmente produtoras de Afs foram encontradas nas amostras.

Tabela 7. A carga fúngica no meio de cultivo DRBC (ufc g⁻¹), micobiota isolada, frequência e densidade relativa, em amostras de pão de abelhas de colmeias originárias de Barra Mansa e de colmeias transladadas de Barra Mansa para região endêmica de CEB (Mendes - RJ. 2010.).

	Barra Mansa transladada		Barra Mansa	
	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹	Gêneros e Espécies	ufc g ⁻¹
	Frequência (%)	3,8 x 10 ⁶ ^A	Frequência (%)	3,0 x 10 ⁵ ^B
Pão de Abelhas	<i>Cladosporium</i> spp. (100%)		<i>Cladosporium</i> spp. (75%)	
	<i>Aspergillus</i> spp. (75%)		<i>Aspergillus</i> spp. (50%)	
	<i>Trichoderma</i> spp. (50%)		<i>Fusarium</i> spp. (50%)	
	<i>Wallemia</i> spp. (50%)		<i>Penicillium</i> spp. (25%)	
	<i>Penicillium</i> spp. (25%)			
	<i>Paecilomyces</i> spp.(25%)			
	Densidade Relativa (%)		Densidade Relativa (%)	
	<i>A. flavus</i> * (50%)		<i>A. niger</i> agregados (50%)	
	<i>A. niger</i> agregados (25%)		<i>A. flavus</i> * (50%)	
	<i>A. versicolor</i> (25%)		<i>P. citrinum</i> (100%)	
	<i>P. citrinum</i> (100%)			

ufc g⁻¹ resultados expressos em mediana. * Cepas com perfil toxígeno positivo.

Letras iguais maiúsculas seguidas na mesma coluna não foram diferentes entre si (α=5%).

A carga fúngica contaminante e a micobiota presentes em amostras de abelhas adultas no meio de cultivo DRBC encontra-se na Tabela 8 e na Tabela 9.

Tabela 8. A carga fúngica no meio de cultivo DRBC (ufc g⁻¹), micobiota isolada, frequência e densidade relativa, em amostras de macerado e do lavado de abelha adulta originárias de colmeias de região endêmica da CEB (Barra do Pirai, Mendes e Itaipava - RJ. 2009).

	Macerado Região Endêmica		Lavado Região Endêmica	
	Gêneros e Espécies	ufc g⁻¹	Gêneros e Espécies	ufc g⁻¹
	Frequência (%)	9,0 x 10 ² A	Frequência (%)	4,0 x 10 ² A
Abelha Adulta	<i>Aspergillus</i> spp. (86%)		<i>Aspergillus</i> spp. (86%)	
	<i>Cladosporium</i> spp. (57%)		<i>Penicillium</i> spp. (71%)	
	<i>Penicillium</i> spp. (43%)		<i>Cladosporium</i> spp. (43%)	
	<i>Wallemia</i> spp. (14%)			
	<i>Trichoderma</i> spp. (14%)			
	<i>Curvularia</i> spp. (14%)			
	Densidade Relativa (%)		Densidade Relativa (%)	
	<i>A. flavus</i> (33%)		<i>A. flavus</i> * (33%)	
	<i>A. fumigatus</i> (33%)		<i>A. niger</i> agregados (22%)	
	<i>A. niger</i> agregados (25%)		<i>A. versicolor</i> (22%)	
	<i>A. ochraceus</i> (8%)		<i>A. fumigatus</i> (11%)	
	<i>P. citrinum</i> (67%)		<i>A. terreus</i> (11%)	
	<i>P. corylophilum</i> (33%)		<i>P. citrinum</i> (67%)	
			<i>P. decumbens</i> (17%)	
			<i>P. variable</i> (17%)	

ufc g⁻¹ resultados expressos em mediana. * Cepas com perfil toxigênico positivo.

Letras iguais maiúsculas seguidas na mesma coluna não foram diferentes entre si ($\alpha=5\%$).

Embora a ufc g⁻¹ tenha se mostrado alta, estatisticamente não houve diferença.

Descritivamente, os resultados da Tabela 8 afirmam a seguinte hipótese: a abelha adulta pode ter em seu corpo conídios aderidos e/ou já ter ingerido esses conídios através de alimentos, como por exemplo, o pão de abelhas.

O macerado da região endêmica apresentou uma carga fúngica maior, enfatizando que a alimentação pode estar servindo de porta de entrada para o agente etiológico, favorecendo a queda de resistência deixando-a propícia à doenças como a CEB. A presença do gênero *Aspergillus* (86%), especificamente as espécies, *A. fumigatus*, *A. niger* agregados e *A. flavus*, fungos entomopatogênicos confirmam essa hipótese.

Porém, para se descobrir qual seria o substrato que melhor representa essa ingestão de conídios pelas abelhas, há a necessidade de estudos comparativos entre o pão de abelhas e o mel.

Em relação ao macerado, os resultados afirmam outra hipótese: as abelhas ingerem conídios de fungos presentes em colmeias de regiões endêmicas, favorecendo a queda de resistência o que a deixa propícia à doenças como a CEB.

Tabela 9. A carga fúngica no meio de cultivo DRBC (ufc g⁻¹), micobiota isolada, frequência e densidade relativa, em amostras em amostras do macerado de abelha adulta originárias de colmeias de região endêmica (Barra do Pirai, Mendes e Itaipava - RJ. 2009) e de região não endêmica (Barra Mansa - RJ. 2010) da CEB.

	Macerado Região Não Endêmica		Macerado Região Endêmica	
	Gêneros e Espécies	ufc g⁻¹	Gêneros e Espécies	ufc g⁻¹
Abelha Adulta	Frequência (%)	8,0 x 10 ³ ^A	Frequência (%)	9,0 x 10 ² ^A
	<i>Aspergillus</i> spp. (50%)		<i>Aspergillus</i> spp. (86%)	
	<i>Penicillium</i> spp. (50%)		<i>Cladosporium</i> spp. (57%)	
	<i>Cladosporium</i> spp. (50%)		<i>Penicillium</i> spp. (43%)	
	<i>Wallemia</i> spp. (25%)		<i>Wallemia</i> spp. (14%)	
		<i>Trichoderma</i> spp. (14%)		
		<i>Curvularia</i> spp. (14%)		
	Densidade Relativa (%)		Densidade Relativa (%)	
	<i>A. niger</i> agregados (50%)		<i>A. flavus</i> (33%)	
	<i>A. flavus</i> (50%)		<i>A. fumigatus</i> (33%)	
	<i>P. corylophilum</i> (50%)		<i>A. niger</i> agregados (25%)	
	<i>P. citreonigrum</i> (25%)		<i>A. ochraceus</i> (8%)	
	<i>P. canescens</i> (25%)		<i>P. citrinum</i> (67%)	
			<i>P. corylophilum</i> (33%)	

ufc g⁻¹ resultados expressos em mediana. * Cepas com perfil toxígeno positivo.

Letras iguais maiúsculas seguidas na mesma coluna não foram diferentes entre si ($\alpha=5\%$).

A estatística não mostrou diferença entre as categorias, porém descritivamente a carga fúngica do macerado da região não endêmica foi maior. Devemos levar em consideração a quantidade de amostras adquiridas dessa região, que é pequena, o que favorece esse resultado.

A riqueza em espécies fungicas é bem maior na região endêmica, fato que sugere maior ingestão de propágulos fúngicos pelas abelhas, favorecendo a queda da imunidade destas predispondo à doenças. É o que mostra a Tabela 9, onde o gênero mais isolado foi o *Aspergillus* (86%), assim como espécies entomopatogênicas.

Esses resultados confirmam então, as seguintes hipóteses: as abelhas ingerem conídios de fungos presentes em colmeias de regiões endêmicas, favorecendo a queda de resistência o que a deixa propícia a doenças como a CEB e que localidades endêmicas da CEB no estado do Rio de Janeiro apresentam maior contaminação fúngica.

Ressalta-se que na região endêmica já ocorrem perdas de colmeias associada com alta mortalidade de larvas, o que favorece o surgimento de mais fungos, como os saprófitas, predispondo a colmeia a invasores o que pode culminar no abandono da colônia de abelhas.

3.4 Perfil Toxígeno dos Fungos Isolados de Amostras do Estudo de Caso: Habilidade como Produtor

Um total de 19%, 67% e 13% das cepas de *A. flavus* isoladas das amostras de pão de abelhas, pólen apícola e abelha adulta, respectivamente, foram produtoras de aflatoxinas; tendo apresentado uma produção média de AFB₁, em condições *in vitro*, de 1317,93 ng g⁻¹.

3.5 Análises Micotoxicológicas: Aflatoxina B₁

Os valores de referência utilizados em nosso estudo como aceitáveis para resultados quantitativos são os estabelecidos pelo CODEX e MERCOSUL: (R) teste de recuperação (70-110%) e (CV) coeficiente de variação (20%). As amostras de pólen apícola e pão de abelhas apresentaram valores médios de R = 76% e CV = 8%; R = 57% e CV = 27%, respectivamente. Verificou-se que apenas as amostras de pão de abelhas estão com valores não aceitáveis. Ao analisar os substratos percebe-se que a redução na quantidade de amostra influenciou negativamente na taxa de recuperação do método. A porcentagem de recuperação varia conforme o método de extração e a matriz sob análise, devido aos interferentes presentes. Os valores médios de AFB₁ encontrados nas amostras *in natura* de pólen apícola e pão de abelhas foram de 6,19 ng g⁻¹ e 4,03 ng g⁻¹, respectivamente.

4 DISCUSSÃO

A discussão em torno da Cria Ensacada Brasileira envolve o pólen de *Stryphnodendron* como agente etiológico já descrito por Message (2002) no estado de Minas Gerais. Pacheco; Barth; Lorenzon (2009), não observaram a presença deste tipo polínico em colmeias oriundas de regiões acometidas pela CEB no estado do Rio de Janeiro.

A ausência do pólen de barbatimão pode ser explicada pela alta disponibilidade de pólen de outras espécies florais e pela baixa chance de forrageamento dessa planta pelas abelhas, já que não possui uma ampla distribuição geográfica no estado do Rio de Janeiro (PACHECO; BARTH; LORENZON, 2009).

Indaga-se que outros agentes possam estar causando a CEB no estado do Rio de Janeiro. A contaminação fúngica pode ser a responsável pela etiologia já que há relato de ocorrência deste vetor na década de 60 com sintomas similares (HILLDRUP; EADIE; LLEWELLYN, 1977).

A obtenção de amostras de colmeias acometidas pela CEB no campo é um grande desafio, pela rapidez dos sintomas na colmeia e da colonização de microrganismos, a ponto de conduzirem a migração, fato muito comum nesta doença, restando na colmeia abandonada muito material contaminado. Além disso, é muito difícil se efetuar comparações entre regiões, pela carência de se obter amostras de apiários não endêmicos da CEB no mesmo período e com certa proximidade das regiões endêmicas.

As análises realizadas com vários substratos das colmeias revelam contaminação fúngica preocupante nas inúmeras regiões endêmicas analisadas. Revelam ainda, condições ideais para a colonização desses organismos nas colmeias, que no período da doença dispõem de substratos ricos em nutrientes e uma faixa ótima de A_a para o crescimento de diversos gêneros fúngicos. Nestas condições, este estudo é pioneiro na identificação de tamanha carga fúngica o que leva a uma forte suspeita de que algumas espécies fúngicas possam estar desencadeando CEB.

Uma ampla faixa de A_a foi encontrada, resultado preocupante, já que a maioria dos microrganismos, responsáveis por deteriorações nos alimentos, não se desenvolve em limites baixos de A_a . Para a germinação, por exemplo, de fungos em substratos a A_a pode variar entre 0,65 e 0,90 (PITT; HOCKING, 1997), abaixo deste limite pode haver seleção de espécies xerofílicas.

Entre os substratos estudados, destaca-se o pólen apícola, que é rico em nutrientes destinado ao suprimento alimentar das abelhas jovens (larvas) para prover seu rápido crescimento (MODRO et al., 2007). O pólen apícola, originário das flores, trata-se de um produto coletado pelas abelhas onde grande parte é recolhido pelo apicultor na entrada da colmeia, antes que as abelhas ingressem na colmeia (LENGLER, 2002). Os resultados mostram uma alta contaminação nesse substrato, resultado já esperado por se tratar de um produto exposto ao meio ambiente.

Destaca-se a presença de espécies potencialmente produtoras de micotoxinas, como Afs e OTA. Ressalta-se que só foi isolado *Aspergillus flavus* produtor de AFB₁. Porém, não foi isolado *A. parasiticus* produtor de todas as aflatoxinas. Fato semelhante ocorre com o pão de abelhas, que é o pólen armazenado nos favos aguardando o processo de fermentação sendo transformado em alimento para as abelhas. É considerado essencial para a sobrevivência da colmeia. Portanto, nos favos, este alimento sofre uma série de reações ao ser submetido ao calor e a umidade do novo ambiente, se houver condições favoráveis certamente é um bom substrato para colonização de microrganismos como os fungos (RÍOS, 2010).

Porém, as abelhas são consideradas eficientes vigilantes sanitárias, pois possuem o *grooming*, um mecanismo de defesa usado por insetos eussociais que utilizam suas glândulas salivares com o objetivo de impedir infecções microbiológicas (TRANIELLO; ROSENGAUS; SAVOIE, 2001). No entanto, os resultados mostram que essa barreira foi vencida pelos fungos que se apresentam em alta colonização no período de até 15 dias.

Esperava-se que o ambiente interno da colmeia preservasse a higiene no interior da colmeia, especialmente no período em que a colmeia encontra-se populosa e é intensa a produção de mel, pois, se a colmeia está bem alimentada, as colônias aumentam seu hábito higiênico e, portanto, deveriam ser mais resistentes. Porém os patógenos certamente se estabelecem pela rapidez de sua ação colonizadora e toxígena, provavelmente agindo de forma sutil e imperceptível as sentinelas das abelhas, o que desencadeia alta mortalidade das crias. Daí explica-se a alta contaminação por fungos, inclusive saprófitas, em quantidade e em riqueza de espécies. Esta invasão é tão rápida e a contaminação é tão extrema que dificulta qualquer ação sanitária das abelhas, como a retirada dos seus mortos, o que pode levar a migração dessas abelhas.

É possível que o patógeno entre na colmeia através do pólen apícola, devido a sua alta carga fúngica, e que a sua transformação em pão de abelhas, possa favorecer a rápida colonização. Essa rápida e ampla colonização também pode estar ocorrendo através das próprias abelhas adultas, através ingestão de conídios de fungos que já se encontram nas colmeias.

Ao se transladar colmeias de região não endêmica (Barra Mansa) para região endêmica (Mendes), que se distanciam entre si cerca de 50 km, observou-se no período de apenas uma semana uma alta contaminação das colmeias da região não endêmica. Esse fato reforça a rapidez de patógenos na colonização, mas também, sugere que algum outro elemento da colmeia possa estar favorecendo a propagação. A cera de abelhas, por exemplo, foi o produto que mais se diferenciava dos enxames das duas regiões analisadas, a das colmeias de Barra Mansa (região não endêmica) apresentavam ninhos com favos recentemente utilizados pelas abelhas e as de Mendes (região endêmica) os favos eram mais escuros e envelhecidos. A combinação de favos de ninho escuros (reutilizado pelas abelhas) e pão de abelhas contaminado pode estar acumulando micotoxinas e desencadeando a rápida ação da doença. Isso é demonstrado pelos perfis potencialmente produtores de Afs e OTA apresentados nesse estudo confirmando os resultados parciais de Pacheco (2007).

Uma outra situação observada no trabalho, é o período da doença que é muito rápido, no máximo duas semanas, tempo suficiente para o aparecimento e ação dos fungos, como os oportunistas, o gênero *Aspergillus*, por exemplo, foi o mais isolado e já se sabe que algumas espécies fúngicas pertencentes a esse gênero são consideradas patógenas para abelhas. Assim como Pacheco (2007) no nosso trabalho também foram isolados algumas dessas espécies, como, *A. fumigatus*, *A. niger* agregados e *A. flavus*, na maior parte isoladas em colmeias doentes.

A maioria dos resultados do perfil toxígeno de todas as categorias analisadas, destacaram-se as micotoxinas Afs e OTA. As Afs, por exemplo, ao serem incorporadas à dieta de abelhas adultas provocam sua mortalidade, mesmo em concentrações inferiores a cinco partes por milhão, sendo mais sensíveis a aflatoxina B₁, que causou mortalidade sempre que esteve presente nas colmeias *Apis* (HILLDRUP; LLEWELLYN, 1979).

Atualmente, já foi comprovada que as aflatoxinas agem diretamente no sistema nervoso central, afetando o sistema endócrino e, muito provavelmente, o sistema de defesa interna das abelhas reduzindo assim, a resistência das abelhas à infecção micótica (GLINSKI; BUCZEK, 2003).

No trabalho anterior sobre a CEB realizado por Pacheco (2007), também foram detectadas assim como no presente trabalho aflatoxinas B₁.

Em relação à OTA, também já foi comprovado que o pólen é altamente eficiente para estimular a produção dessa micotoxina quando é submetido às condições inadequadas de armazenamento (MEDINA et al., 2004; VILLALOBOS et al., 2010).

Porém, há pouquíssimas informações, em nível mundial, sobre a detecção de aflatoxinas em produtos apícolas. Hilldrup; Eadie, Llewellyn (1977), estudou a presença de aflatoxinas em amostras de mel não-processado, pólen, favo (ninho), larvas e abelhas adultas, e verificaram a produção destas micotoxinas em baixos níveis em todos os substratos, exceto no mel não-processado.

Este é um estudo pioneiro, único no País, na determinação de micotoxinas nestas matrizes e faz parte de um amplo estudo multidisciplinar em desenvolvimento.

Um fator observado durante a amostragem nas colmeias é que a colonização fúngica foi favorecida por condições inadequadas de manejo por parte dos apicultores. O manejo inadequado mais os patógenos no ambiente predispõem certamente essa colonização.

Portanto, a presença de fungos patogênicos permite atestar que a microbiota interfere na imunidade das abelhas, deixando-as propícias a entrada de outros vetores, como as micotoxinas, que podem ser responsáveis pela CEB.

É importante destacar que há pouquíssimos trabalhos publicados sobre o assunto o que dificultou ampliar a discussão.

Conclui-se então, que o pão de abelhas mostrou ser o melhor substrato para o veículo de contaminação para a colmeia, apresentando uma alta carga fúngica e uma diversidade de gêneros e espécies fúngicas. Entre a carga fúngica contaminante, foram isoladas espécies patogênicas para as abelhas, o que favorece a queda da imunidade desses insetos deixando-os suscetíveis a diversas doenças. Esse fato se torna ainda mais grave, quando observamos que foram isoladas micotoxinas, o que já é citado em literatura que muitas dessas substâncias também são imunossupressoras e dependendo da micotoxina, mesmo em concentrações baixas, acabam provocando a mortalidade desses insetos.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO MICOTOXICOLÓGICA DE PÓLEN APÍCOLA DESIDRATADO COMERCIALIZADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

Uma preocupação atual e mundial é a busca pela alimentação saudável, o que é bem notado em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Com isso, o uso de produtos ditos naturais, orgânicos e funcionais é crescente, e dentre eles, encontram-se produtos apícolas, como o mel, própolis e pólen. A qualidade final do pólen depende totalmente de uma produção bem planejada, como condições adequadas de manejo e armazenamento. Fatores como temperatura, pH e umidade, quando não ideais, e a manipulação inadequada favorecem a proliferação de microrganismos, como os fungos, com possível produção de micotoxinas. O objetivo geral desse trabalho foi verificar a qualidade higiênica das amostras de pólen desidratado comercializado no estado do Rio de Janeiro. Foram adquiridas 27 amostras de pólen apícola desidratado de estabelecimentos comerciais do estado do Rio de Janeiro. A enumeração da micobiota (ufc g^{-1}) foi realizada através do método de diluição decimal com semeadura em placas utilizando-se meios de cultivo gerais e seletivos. Foi determinada a atividade de água (Aa) das amostras. Foram determinadas a frequência de isolamento dos gêneros fúngicos e a densidade relativa das espécies. Foi determinado o perfil toxígeno de espécies isoladas potencialmente produtoras de aflatoxina (AFB_1) e ocratoxina A (OTA) através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) e foi quantificada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a produção *in vitro* de AFB_1 das cepas toxígenas isoladas. Os resultados mostraram uma alta carga fúngica com 92% das amostras em condições higiênicas insatisfatórias segundo os padrões legais consultados e 25% das cepas de *A. flavus* mostraram-se potencialmente produtoras de aflatoxinas. Os altíssimos percentuais de reprovação das amostras para a qualidade higiênica, aliado à presença de grande variedade de fungos contaminantes, incluindo espécies produtoras de micotoxinas, é uma evidência de que a legislação necessita ser atualizada, para que este produto possa ser comercializado com segurança. Considera-se que toda a linha de produção do pólen apícola, desde sua coleta até o armazenamento deva ser monitorada, a fim de minimizar os riscos para a saúde humana.

Palavras chaves. Pólen, fungo, aflatoxina B_1 , ocratoxina A, alimentação.

ABSTRACT

A major global and current concern is the search for healthy eating, which is well noticed in developed and developing countries. Thus, the use of natural, organic and functional products is increasing, including bee products such as honey, propolis and pollen. The final quality of pollen production is totally dependent on well-planned and adequate conditions of handling and storage. A wrong set of temperature, pH and humidity conditions, added to the mishandling, favors the microorganisms proliferation such as fungi, with possible production of mycotoxins. The aim of this study was to assess the hygienic quality of dehydrated pollen samples sold in Rio de Janeiro state. A total of 27 samples of dehydrated pollen were obtained from shops in Rio de Janeiro state. The enumeration of the mycoflora (cfu g⁻¹) was performed by decimal dilution method using Petri dishes containing both selective and general culture media. The water activity (Aw) was determined for all samples, as well as the isolation frequency and relative density of fungi species. It was evaluated the toxigenic strains profile potentially producing aflatoxin B₁ (AFB₁) and ochratoxin A (OTA) using the technique of thin layer chromatography (TLC). The *in vitro* AFB₁ production from toxigenic strains isolated was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed several samples with high fungal counts where 92% of these samples were in unsatisfactory hygienic conditions, according to legal standards. It was also demonstrated that 25% of *A. flavus* strains isolated shown to be potentially aflatoxin B₁ producers. The high percentage of samples with lack of hygienic quality, combined with the presence of a large variety of fungal contaminants, including mycotoxin-producing species, consist in important evidence that the legislation needs to be updated so that bee pollen could be marketed safely. It is crucial that the whole production line of bee pollen, from his collection to the storage, should be monitored in order to minimize risks to human health.

Keywords: Pollen, fungi, aflatoxin B₁, ochratoxin A, food.

1 INTRODUÇÃO

Uma preocupação atual e mundial é a busca pela alimentação saudável, o que é bem notado em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Com isso, o uso de produtos ditos naturais, orgânicos e funcionais é crescente, e dentre eles, encontram-se produtos apícolas, como o mel, própolis e pólen.

Considerado um alimento altamente nutritivo e saudável, o consumo de pólen apícola desidratado vem se destacando, tanto por suas propriedades terapêuticas, através de sua atividade antioxidante, quanto pela sua utilização na indústria alimentícia, na forma de alimentos funcionais. É considerado fonte de energia e de nutrientes para os seres humanos, pois contém em sua composição carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, minerais e traços de nutrientes, além de possuir também quantidades significativas de substâncias polifenólicas, principalmente flavonóides (CARPES, 2008).

O consumo deste alimento costuma ser recomendado para pessoas com problemas de visão, anemia, alterações no aparelho digestivo, cardiovascular e urinário. Agindo também na regulação da flora intestinal e regenera a hemoglobina, contribuindo para uma melhor oxigenação do sangue e dos tecidos. É considerado um coadjuvante no combate ao estresse, da úlcera, além de estimular as funções gástricas, tratar de diarreias crônicas, servir como medicamento em certos casos de diabetes, além de muitas outras indicações (OLEGÁRIO; SANTOS; TRINDADE, 2008).

Segundo a Normativa nº 03, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura e do Abastecimento, define-se pólen apícola desidratado como produto submetido ao processo de desidratação, em temperatura não superior a 42°C, e com teor de umidade não superior a 4% (BRASIL, 2001a).

O processamento do pólen apícola desidratado é feito através de várias etapas que serão descritas a seguir:

Coleta e transporte do pólen. O pólen apícola é coletado através de equipamentos denominados coletores de pólen (caça-pólen), constituído de uma tela com orifícios adequados ao tamanho das abelhas. Este aparato é colocado na entrada da colmeia, sobre o ninho ou embaixo da câmara de cria. A abelha, ao entrar na colméia, passa através dos orifícios da tela do coletor e acaba perdendo a carga de pólen acumulado na corbícula (depressões localizadas nas tíbias das pernas posteriores), devido ao orifício do coletor ser estreito, apenas permitindo a passagem da abelha. O pólen fica depositado nas gavetas, que se encontram na parte inferior do equipamento (Figura 1). Pode-se coletar de uma colônia de abelhas até 2 Kg de pólen por ano, onde uma parte do pólen é recolhida e transportada para a sala de beneficiamento e a outra parte é usado para a alimentação das crias (APICULTURA, 2006).



Figura 1. Imagem do coletor de pólen colocado na entrada da colmeia.

Fonte: (LEGLER, 2002).

Beneficiamento do pólen. Ao chegar à sala de beneficiamento, é realizada uma pré-limpeza onde são coletadas impurezas grosseiras, como pedaços de asas de abelhas, formigas, etc. Na seqüência, é realizado o congelamento do pólen, em freezers por pelo menos 48h. O frio age como destruidor de ácaros, ovos e larvas de traça que possam estar junto com o pólen, além de funcionar também como controlador e estabilizador do desenvolvimento e proliferação de microorganismos que possam ter vindo junto do campo. O pólen é retirado então do freezer e deixado na temperatura ambiente por 3 a 4 horas, sendo depois colocado na secadora (Figura 2), onde permanece por um período de 12 a 48h. A secadora não deve ultrapassar os 40°C, até atingir no máximo 4% de umidade (LEGLER, 2002).

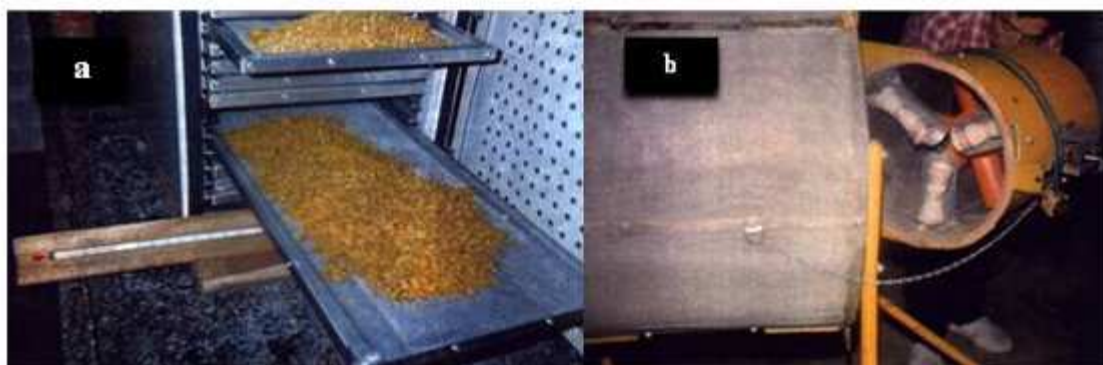


Figura 2. (a) Imagem do pólen sendo retirado do freezer e deixado em temperatura ambiente e (b) Imagem da secadora que é utilizada no processo de secagem do pólen.

Fonte: (LEGLER, 2002).

Com o pólen já seco, a limpeza final do produto é realizada com o auxílio de pinça e sistemas de ventilação para a retirada de impurezas como, fragmentos de abelhas, resíduos vegetais, poeiras, própolis, etc. Em seguida é realizada a seleção dos grãos por diâmetro com auxílio de peneiras granulométricas. Após a limpeza final e a seleção dos grãos, o pólen é envasado em sacos plásticos, hermeticamente fechados, com capacidades de 1,2 ou 3 Kg para estocagem em geladeira para uma boa conservação ou pode ir direto para o comércio atacadista, ou em recipientes de vidro de 50g, 100g ou 150g para o varejo. Pode ser conservado por até um ano se mantiver sua umidade estabilizada em 4% (LEGLER, 2002).

É importante destacar que, embora o pólen seja um produto totalmente natural e de grande valor nutricional, são necessários cuidados de manipulação na coleta e beneficiamento dos grãos para uma maior garantia da qualidade do produto final. O estabelecimento que promove esse processamento deve estar de acordo com o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos/Industrializadores de Alimentos do MAPA (BRASIL, 1997a).

Um dos primeiros países a estabelecer normas para a padronização do pólen apícola foi a Espanha. No Brasil, os dados a respeito das condições higiênico-sanitárias e da composição do pólen produzido e comercializado são escassos (RIBEIRO; SILVA, 2007).

Porém, segundo a Instrução Normativa n. 3 de 19 de janeiro de 2001, o Brasil possui regulamentos que devem ser seguidos. Na Tabela 1 estão descritos os limites preconizados pela legislação brasileira para produção do pólen apícola (BRASIL, 2001a).

Tabela 1. Composição química e física para o pólen apícola de acordo com legislação brasileira.

Requisitos	Resultados
Aroma	Característico, de acordo com origem floral.
Cor	Característica, de acordo com origem floral.
Aspecto	Grãos heterogêneos de forma e tamanhos variados, tendendo a esféricos.
Sabor	Característico
Umidade	Pólen apícola: máximo 30% Pólen apícola desidratado: máximo 4 %
Cinzas	Máximo de 4%; m/m, na base seca.
Lipídeos	Mínimo de 1,8%; m/m, na base seca.
Proteínas	Mínimo de 8%; m/m, na base seca.
Açúcares totais	14,5% a 55,0%; m/m, na base seca.
Fibra bruta	Mínimo de 2%; m/m, na base seca.
Acidez livre	Máximo de 300 mEq/kg.
pH	4 a 6

Fonte: (BRASIL, 2001a).

Quando a manipulação, processamento e armazenamento desse produto ocorre em más condições higiênicas, este produto pode se tornar um ótimo substrato para a colonização de microrganismos, como os fungos por exemplo.

Os fungos são microorganismos com alta capacidade deletéria quando presentes em alimentos. Esses microorganismos podem desenvolver-se em produtos cuja atividade de água (Aa) vai de 0,65 a 0,90, com temperatura ideal de crescimento de 20 a 30°C e com relação ao pH, em uma ampla faixa, que vai de 1,5 a 11, sendo o ótimo entre 5 a 7 (PITT; HOCKING, 1997).

A contaminação fúngica de alimentos, além de diminuir sua qualidade, destinados pode levar a formação das micotoxinas, substâncias estas que constituem um problema em saúde pública de grande importância. A FAO - *Food and Agriculture Organization* (1990), define micotoxinas como produtos tóxicos do metabolismo secundário fúngico que podem causar alterações patológicas como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, nefrotoxicidade e imunossupressão, tanto no homem quanto em animais. Entre os principais gêneros fúngicos produtores de micotoxinas podemos citar: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Entre as principais micotoxinas produzidas por esses gêneros podemos citar as aflatoxinas (Afs) e ocratoxina A (OTA).

As análises microbiológicas refletem de forma fiel as condições de higiene do ambiente e das etapas do processo produtivo, e devem ser uma prioridade. Sendo assim, se torna necessário a análise microbiológica do pólen apícola desidratado para a verificação se este produto se encontra ou não nos padrões microbiológicos recomendados para alimentos, evitando assim a ocorrência de problemas relacionados à saúde pública.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais e Amostragem

Para verificação da qualidade do pólen apícola desidratado, foram adquiridas 27 amostras de estabelecimentos comerciais da região metropolitana do Rio de Janeiro durante o ano de 2009 e 2010, sendo algumas marcas provenientes de outros estados (Tabela 2).

Tabela 2. Marcas de pólen apícola desidratado presentes nos principais estabelecimentos comerciais no estado do Rio de Janeiro. 2009 - 2010.

AMOSTRAGEM	PROCEDÊNCIA DA MARCA
	São Paulo: Olímpia, Piracaia
Pólen apícola desidratado	Rio de Janeiro: Paracambi, São Gonçalo, Nova Friburgo, Teresópolis, Barra Mansa, Barra do Piraí, Saquarema, Volta Redonda, Valença, Silva Jardim, Petrópolis
	Minas Gerais: Santa Bárbara, Manejo Lima Duarte
	Paraná

2.2 Determinação da A_a das Amostras

As amostras de pólen apícola desidratado, foram imediatamente analisadas quanto a A_a , em equipamento AquaLab[®] modelo CX 2 (Decagon Devices Inc., Pullman, Washington, USA). Para sua mensuração, cada amostra foi colocada em um recipiente próprio do aparelho, 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.

2.3 Isolamento e Identificação da Microbiota Contaminante

A análise das amostras realizou-se através do método de diluição decimal seriada em placa para isolamento e contagem da microbiota total (PITT; HOCKING, 1997).

Para a enumeração quantitativa de fungos filamentosos em unidades formadoras de colônias por grama de alimento (ufc g⁻¹) obedeceu-se ao seguinte procedimento:

- Foram pesadas 10g das amostras e em seguida, verteu-se em Erlenmeyer estéril contendo 90mL de água peptonada 0,1% estéril (diluição 10⁻¹) onde foram devidamente homogeneizadas.

Após a diluição inicial (10⁻¹) foram feitas diluições decimais seriadas até 10⁻⁴. Em seguida, inoculou-se em triplicata alíquotas de 100µL de cada uma das diluições em três meios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (PITT; HOCKING, 1997); é o que melhor expressa a qualidade higiênica dos alimentos, já que possui condições ideais que permite o crescimento da microbiota se presente no alimento, por isso é utilizado

para contagem geral, agar dicloran glicerol a 18% (DG18) (HOCKING; PITT, 1980) que é seletivo para fungos xerofílicos, ou seja, fungos que conseguem crescer em condições de baixa A_a e Nash Snyder agar (NSA) (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983) citado na literatura como um meio seletivo para fungos do gênero *Fusarium* (Figura 3).

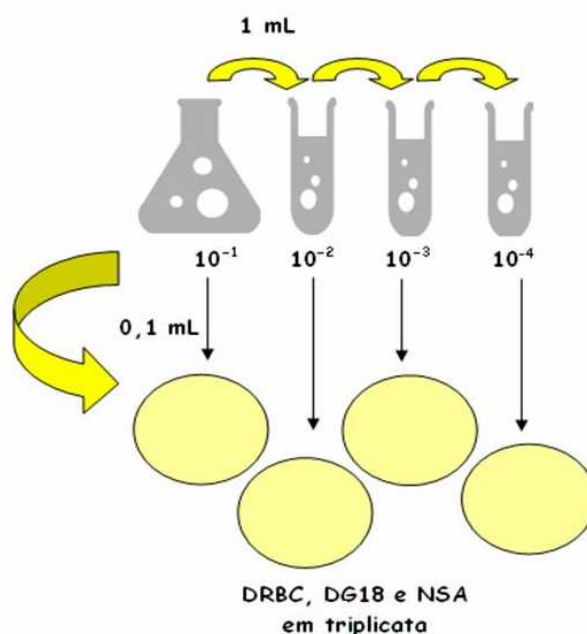


Figura 3. Diluição decimal seriada do pólen apícola desidratado.

Logo após a diluição, as placas foram incubadas por cinco a sete dias em estufas microbiológicas de 25 °C dotadas de controle eletrônico de temperatura ambiente. Todas as placas foram observadas diariamente, e foram selecionadas para a enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 ufc g^{-1} . O período para leitura não ultrapassou sete dias.

A identificação do táxon gênero, de todas as colônias consideradas diferentes (características macroscópicas e microscópicas) foi realizada segundo Samson et al. (2000). As colônias fúngicas identificadas como *Aspergillus* e *Penicillium* foram cultivadas em tubos contendo meio agar extrato de malte (MEA) e as de *Fusarium* o meio utilizado foi o agar V8 (V8). Todos os tubos foram conduzidos para estufas apropriadas para cada táxon gênero, para posterior identificação do táxon espécie.

Para a identificação do táxon espécies, utilizaram-se chaves taxonômicas apropriadas de cada grupo particular: Klich (2002) para *Aspergillus*, Pitt (1988) para *Penicillium* e Nelson; Toussoun; Marasas (1983), com modificações para *Fusarium*.

2.4 Caracterização do Perfil Toxígeno das Espécies Isoladas

As cepas das seções *Flavi* e *Nigri* do gênero *Aspergillus* foram analisadas quanto a capacidade toxígena segundo metodologia descrita por Geisen (1996) e Bragulat; Abarca; Cabañes (2001), respectivamente.

A detecção por CCD consistiu em uma corrida unidimensional, onde foram aplicados 10 μ L de cada extrato amostral, assim como dos padrões em placas 20x20 cm de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura (G60 Merck), utilizando-se como fase móvel tolueno: clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (70: 50: 50: 10 v/v). Após a evolução, a cromatoplaça foi observada em cromatovisor sob radiação UV de $\lambda = 365$ nm, para evidenciar as manchas fluorescentes características de cada toxina. Foram considerados positivos os extratos

analisados com manchas fluorescentes semelhantes ao padrão na cor e com o mesmo deslocamento (Rf). Os extratos positivos para aflatoxinas B₁ foram submetidas à quantificação por CLAE.

2.5 Quantificação de Aflatoxina B₁ Produzida *In Vitro* pelas Cepas Toxígenas Isoladas

As cepas detectadas por CCD como produtoras de AFB₁ tiveram sua produção quantificada por CLAE. Foi utilizada CLAE em fase reversa com um detector UV-Vis em comprimento de onda igual a 360nm e coluna C18 (Microsorb-MV, Varian®; 150mm x 4,6 mm x 5µm). Como fase móvel utilizou-se água:metanol:acetonitrila (60:20:20) com fluxo de 0,7mL/min. O volume de injeção foi de 20µL. Foi obtido um tempo de retenção de 14min ± 1 e o limite de detecção da técnica foi de 2ng g⁻¹ (ppb).

3 RESULTADOS

3.1 Apresentação do Pólen Comercial

As amostras de pólen presentes no comércio não apresentavam alteração de cor e cheiro e nem apresentavam presença visual de bolores no momento em que foram recepcionadas no laboratório para a realização das análises.

3.2 Determinação da A_a

A A_a do pólen apícola desidratado foi baixa, com média de $0,393 \pm 0,056$, o valor mínimo determinado foi de 0,287 e o máximo foi de 0,489; o valor da mediana foi de 0,404.

3.3 Determinação da Carga Fúngica

A carga fúngica contaminante (valor da mediana) encontrada no meio de cultivo DRBC foi de $5,0 \times 10^3$ ufc g^{-1} , no meio de cultivo DG18 foi $2,0 \times 10^3$ ufc g^{-1} e no NSA o valor encontrado foi $8,0 \times 10^2$ ufc g^{-1} (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem total (ufc g^{-1}) de fungos filamentosos isolados de amostras de pólen comercial apícola desidratado. 2009 – 2010.

Tipo de Amostra		DRBC ufc g^{-1}	DG18 ufc g^{-1}	NSA ufc g^{-1}
Pólen apícola desidratado (n = 27)	Média	$6,09 \times 10^4$	$1,54 \times 10^8$	$3,85 \times 10^7$
	Desvio Padrão	$1,61 \times 10^5$	$7,84 \times 10^8$	$1,96 \times 10^8$
	Valor Mínimo	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
	Valor Máximo	$8,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$

Limite de detecção da técnica: 10^2 ufc g^{-1} .

A variação na enumeração da carga fúngica contaminante não mostra relação com a vida de prateleira (Tabela 4).

Tabela 4. Vida de prateleira das amostras de pólen apícola desidratado comercializado no estado do Rio de Janeiro. 2009 - 2010.

Vida de Prateleira (anos)	DRBC ufc g ⁻¹	
	Mínimo	Máximo
1	1 x 10 ²	8 x 10 ⁵
2	1 x 10 ²	2 x 10 ⁵
3	1 x 10 ²	5 x 10 ⁴

3.4 Determinação da Micobiota das Amostras de Pólen

O gênero *Aspergillus* (85%) foi o mais isolado, destacando-se também a presença de *Cladosporium* (63%), *Penicillium* (44%), *Alternaria* (19%), *Wallemia* (15%), *Eurotium* e *Mucor* (7%) e *Curvularia*, *Paecilomyces* e *Fusarium* (4%) (Figura 4).

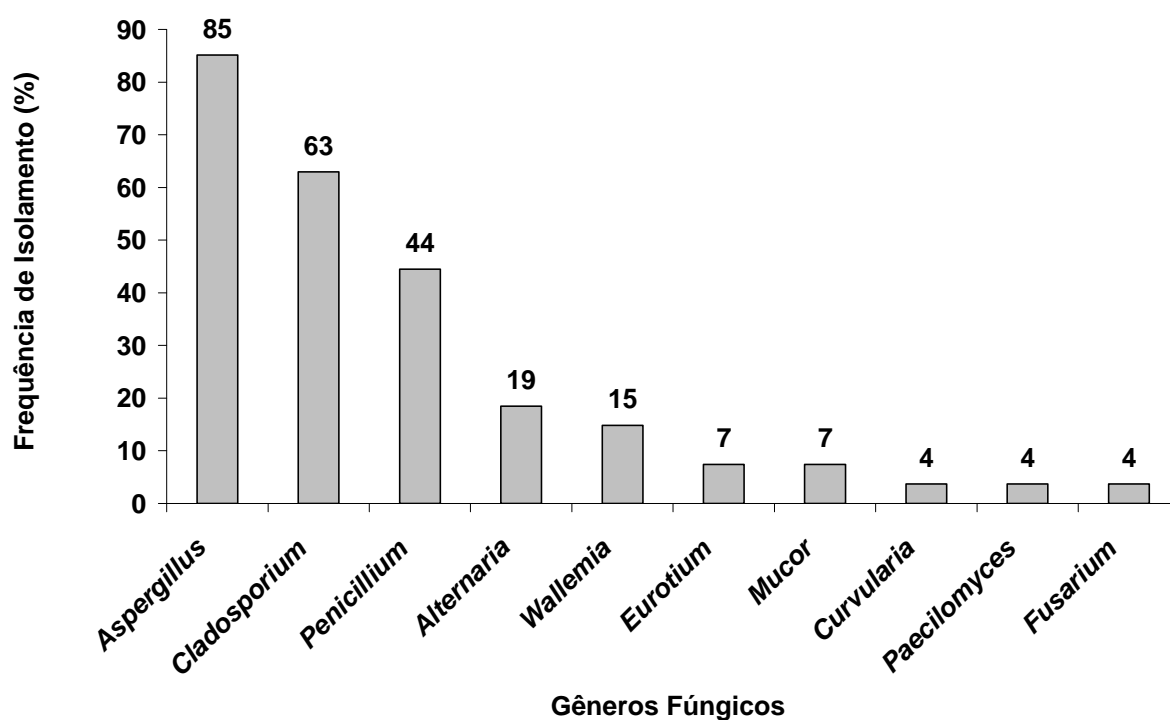


Figura 4. Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados de amostras de pólen apícola comercializadas no estado do Rio de Janeiro. 2009 - 2010.

Foram isoladas nesse estudo oito espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*: *A. niger* agregados (42%), *A. flavus* (19%), *A. versicolor* (6%), *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. terreus* e *A. carbonarius* (3%) (Figura 5).

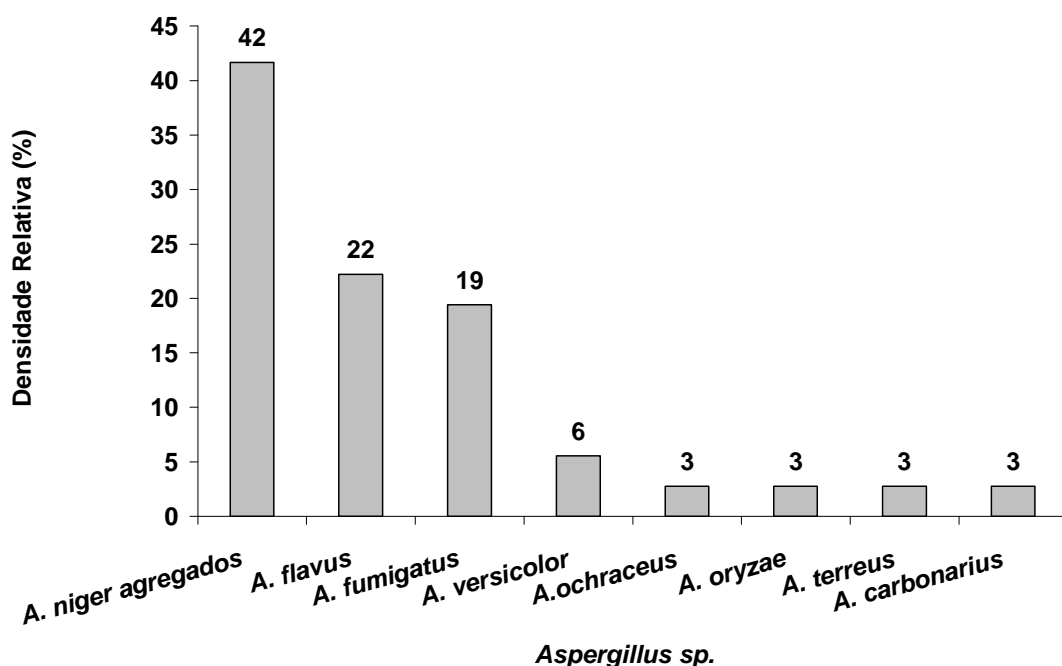


Figura 5. Densidade relativa (%) de *Aspergillus* isolados de amostras de pólen apícola comercializadas no estado do Rio de Janeiro. 2009 - 2010.

Quanto ao *Penicillium*, as espécies isoladas foram: *P. citrinum* (54%), *P. citreonigrum* (31%), *P. glabrum* e *P. oxalicum* (8%) (Figura 6).

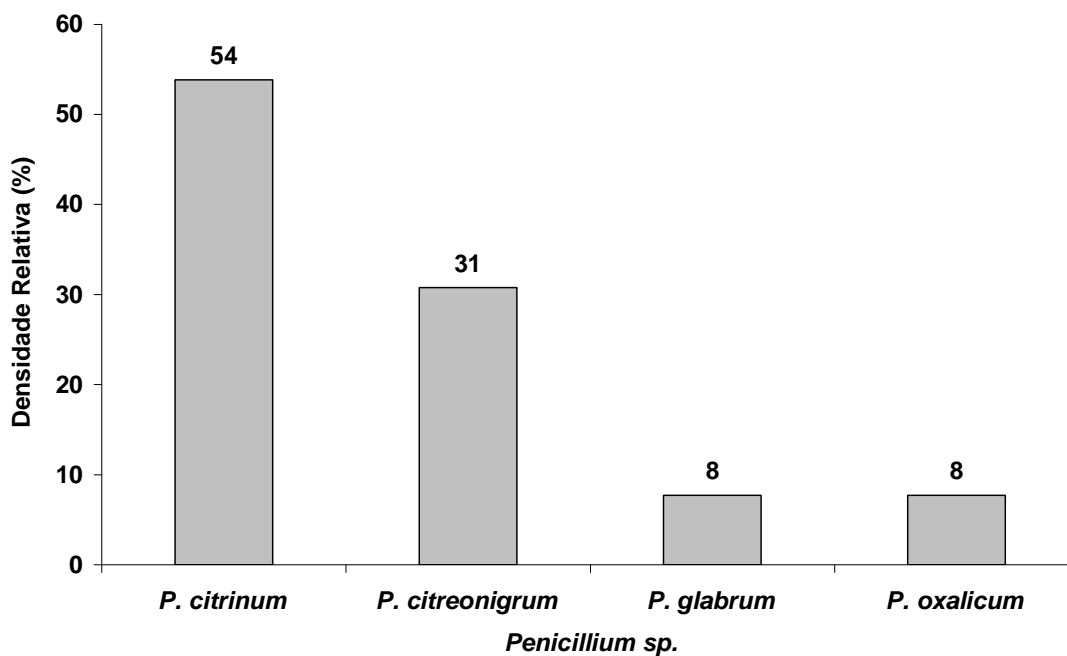


Figura 6. Densidade relativa (%) de *Penicillium* isolados de amostras de pólen apícola comercializadas no estado do Rio de Janeiro. 2009 - 2010.

Quanto ao *Fusarium* foi isolada uma única cepa, *F. camptoceras* (100%).

3.5 Perfil Toxígeno dos Fungos Isolados de Amostras do Pólen Apícola Desidratado: Habilidade como Produtor

Em relação às cepas de *A. niger* agregados, nenhuma se mostrou produtora de OTA. Porém, 25% das cepas de *A. flavus* se mostraram produtoras de aflatoxinas. Nas condições *in vitro* (AFB₁), os níveis médios de produção foram de 1024,14 ng g⁻¹ de meio de cultivo.

3.6 Determinação da Qualidade Higiênica

A Figura 7 apresenta a classificação das amostras segundo os critérios microbiológicos para qualidade higiênico sanitária de alimentos destinados ao consumo humano. Observa-se que a carga fúngica contaminante esteve frequentemente acima do limite recomendado (10² ufc g⁻¹). Atualmente, a Portaria SVS/MS nº 451 (BRASIL, 1997b) encontra-se revogada pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001b), que não apresenta os critérios microbiológicos como parâmetro obrigatório de avaliação. Este resultado ressalta a necessidade de revisão da legislação e maior cautela no consumo deste produto.

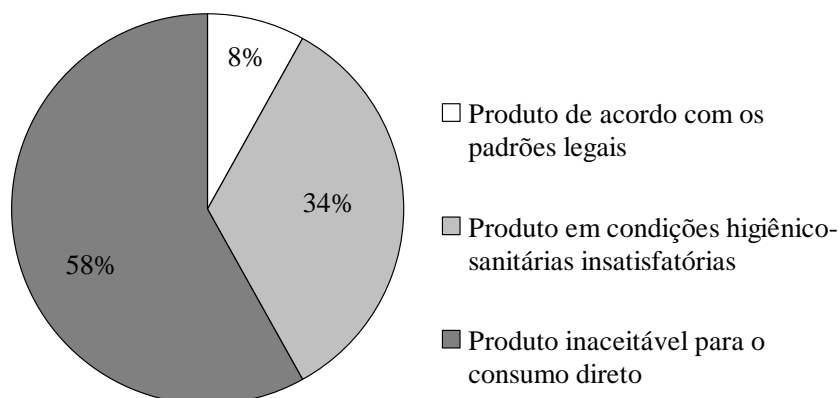


Figura 7. Classificação percentual da qualidade higiênica de amostras de pólen apícola desidratado de acordo com os critérios microbiológicos consultados (BRASIL, 1997b; BRASIL, 2001b).

4 DISCUSSÃO

Com o advento da produção orgânica, o consumo humano de pólen apícola desidratado vêm aumentando a cada dia. Descobertas de suas propriedades terapêuticas, atividade antioxidante, entre outras, vêm afirmando o consumo deste alimento (CARPES, 2008). Em face a amplitude de seu comércio, há necessidade de um maior controle de qualidade deste produto.

O tempo de vida do produto (vida de prateleira), bem como textura, consistência e viscosidade estão diretamente relacionados ao teor de água presente, que é avaliado através da A_a , a principal responsável pela deterioração do produto (CORREIA-OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, a legislação brasileira não possui qualquer informação sobre os limites aceitáveis para a A_a para pólen apícola desidratado, apesar de ser um bom indicador de qualidade de alimentos. Assim, utilizando-se este indicador nos limites recomendados de 0,65 e 0,90 (PITT; HOCKING, 1997), a A_a para pólen apícola é baixa. Análises do pólen desidratado originárias do estado de Sergipe e da região Sul do Brasil estão em consonância com nosso estudo e confirmam valores baixos de A_a (CORREIA-OLIVEIRA et al., 2008; CARPES, 2008).

Particulariza-se a baixa A_a do pólen por ser um alimento com alto teor de açúcar, que o torna estável, por outro lado, a higroscopicidade gerada pelos açúcares pode favorecer a absorção de umidade em ambientes impróprios decorrente do seu processamento e da embalagem (CARPES, 2008). É fato que a alta carga fúngica presente nas amostras de nosso estudo sugere um maior controle de qualidade do produto, desde sua coleta até o processamento. Há a necessidade também do monitoramento da vida da prateleira deste alimento para que seja determinado o período ideal de armazenamento.

Com relação aos critérios microbiológicos utilizados para o controle da qualidade deste alimento, o regulamento técnico de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis (BRASIL, 2001a) recomenda a aplicação de regulamento específico. Por ser um produto consumido *in natura*, em pequenas porções, adotou-se para fins comparativos o limite utilizado na determinação da qualidade higiênica de mel (BRASIL, 1997b) e de geléia real (BRASIL, 2001a), que foi o de 1×10^2 ufc g^{-1} .

Em meio DRBC, 25 das 27 amostras coletadas do produto encontraram-se fora dos padrões legais consultados, em condições insatisfatórias ou impróprias para o consumo humano direto. Estudos realizados com pólen apícola desidratado presentes no comércio do Distrito Federal, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Sergipe e Bahia alertam também sobre contaminações altas deste produto ($>1,3 \times 10^4$ ufc g^{-1}) em cerca de 12% das amostras (BARRETO et al., 2004).

Foram isoladas 77 cepas fúngicas pertencentes a dez gêneros filamentosos. O gênero *Aspergillus* foi o mais isolado (85%), seguido de *Cladosporium* (63%), *Penicillium* (44%), *Alternaria* (19%), *Wallemia* (15%), *Eurotium* e *Mucor* (7%), *Curvularia*, *Paecilomyces* e *Fusarium* (4%).

De acordo com a Tabela 5, que compara a micobiota presente no pólen comercial no Brasil e em outros países verifica-se maior riqueza de espécies nas amostras brasileiras, o que é preocupante em se tratando das condições tropicais, que é grande vilã da qualidade de alimentos *in natura*.

Tabela 5. Comparação da micobiota isolada em relação ao gênero de amostras de pólen comercial conforme o País de estudo.

País de Estudo (número de amostras)	Micobiota Isolada (gêneros fúngicos)	Autores dos Estudos
Nosso estudo (27)	<i>Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Alternaria, Wallemia, Eurotium, Mucor, Curvularia, Paecilomyces, Fusarium</i>	(DEVEZA et al., 2011)
Argentina e Espanha (90)	<i>Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Mucor, Penicillium, Rhizopus</i>	(GONZÁLEZ et al., 2005)
México (19)	<i>Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Mucor, Penicillium, Rhizopus</i>	(VILLALOBOS et al., 2010)

O gênero mais isolado em nosso estudo foi *Aspergillus*, destacando-se as espécies *A. niger* agregados, *A. flavus* e *A. fumigatus* (Tabela 6). Esse gênero, também foi altamente isolado (80%) em estudo com pólen apícola na Argentina e Espanha (GONZÁLEZ et al., 2005) e no México (VILLALOBOS et al., 2010) onde não foi mencionado a frequência. Ressalta-se o isolamento de *A. parasiticus*, um dos principais produtores de aflatoxinas, no estudo de González et al. (2005), o que não aconteceu nas amostras brasileiras.

Tabela 6. Presença de espécies de *Aspergillus* isoladas em amostras de pólen comercial provenientes de vários países.

País de Estudo	Espécies de <i>Aspergillus</i>	Autores dos Estudos
Nosso estudo	<i>A. niger</i> agregados, <i>A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. carbonarius</i> .	(DEVEZA et al., 2011)
Argentina e Espanha	<i>A. niger</i> agregados, <i>A. flavus</i> <i>A. ochraceus</i> , <i>A. parasiticus</i> .	(GONZÁLEZ et al., 2005)
México	<i>A. flavus</i>	(VILLALOBOS et al., 2010)

Em relação a *Penicillium*, que foi o terceiro gênero mais isolado, os estudos divergem (Tabela 7). Em González et al. (2005), esse gênero foi o predominate (90%), para Villalobos et al. (2010), *Penicillium* foi o quinto mais isolado e não é mencionada a espécie.

Tabela 7. Presença de espécies de *Penicillium* isoladas em amostras de pólen comercial provenientes de vários países.

País de Estudo	Espécies de <i>Penicillium</i>	Autores dos Estudos
Nosso estudo	<i>P. citrinum</i> , <i>P. citreonigrum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. oxalicum</i>	(DEVEZA et al., 2011)
Argentina e Espanha	<i>P. verrucosum</i>	(GONZÁLEZ et al., 2005)

A única espécie de *Fusarium* isolada neste estudo foi *F. camptoceras*. Esse gênero também foi isolado em menor frequência nas amostras analisadas por González et al. (2005) e Villalobos et al. (2010) e as espécies isoladas não foram citadas.

Foi realizada a determinação do perfil toxígeno para as espécies *A. niger* agregados, *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, potenciais produtores de ocratoxina A (OTA), porém todas as cepas foram negativas, o que diverge do estudo de González et al. (2005) que encontrou, 53,3% das cepas de *A. ochraceus* e 25% das cepas de *A. niger* agregados como produtoras de OTA. Ressalta-se que o pólen é um substrato que estimula a produção de OTA quando adicionado ao meio de cultivo adequado para o crescimento de *A. ochraceus*, o que deve ocorrer sob condições inadequadas de armazenamento deste produto (MEDINA et al., 2004; VILLALOBOS et al., 2010).

Destaca-se a presença de 25 % das cepas de *A. flavus* isoladas terem sido capazes de produzir aflatoxinas em condições *in vitro*, cujos resultados se assemelham aos descritos por González et al. (2005), em amostras da Espanha e Argentina. Villalobos et al. (2010) não avaliou esta condição de *A. flavus*.

Os altíssimos percentuais de reprovação das amostras para a qualidade higiênica, aliado à presença de grande variedade de fungos contaminantes, incluindo espécies produtoras de micotoxinas, é uma evidência de que a legislação necessita ser atualizada, para que este produto possa ser comercializado com segurança. Considera-se que toda a linha de produção do pólen apícola, desde sua coleta até o armazenamento deva ser monitorada, a fim de minimizar os riscos para a saúde humana (CAST, 2003; RODRIGUES et al., 2008).

Conclui-se então, que existe um grave problema de qualidade higiênico-sanitária no pólen apícola desidratado comercializado no Estado do Rio de Janeiro.

Este alimento encontra-se com uma carga fúngica acima dos limites recomendados pelos padrões microbiológicos para alimentos, inclusive com fungos potencialmente produtores de micotoxinas, aumentando a possibilidade da ocorrência de micotoxicoses de evolução crônica em seres humanos.

CONCLUSÕES GERAIS

- O pão de abelhas mostrou ser o melhor substrato para o veículo de contaminação para a colmeia, apresentando uma alta carga fúngica e uma diversidade de gêneros e espécies fúngicas.
- Entre a carga fúngica contaminante, foram isoladas espécies patogênicas para as abelhas o que favorece a queda da imunidade desses insetos deixando-os suscetíveis a diversas doenças.
- Foram isoladas espécies potencialmente produtoras de micotoxinas, entre elas Afs e OTA.
- Os resultados presentes neste estudo demonstram que: o método proposto de IAC seguido de ELISA foi eficiente para a quantificação de AFB₁ em pólen apícola. Porém, para a eficiência do método há necessidade de uma quantidade mínima de amostra maior ou igual a 10 g.
- A ocorrência de AFB₁ é positiva, como contaminante natural de produtos apícolas.
- A contaminação fúngica é sim aparente e tem grande probabilidade de ser o veículo de contaminação da colmeia. Porém, a avaliação palinológica deve ser realizada para descartar a presença do pólen de barbatimão da amostragem.
- Existe um grave problema de qualidade higiênico-sanitária no pólen apícola desidratado comercializado no Estado do Rio de Janeiro.
- Este alimento encontra-se com uma carga fúngica acima dos limites recomendados pelos padrões microbiológicos para alimentos, inclusive com fungos potencialmente produtores de micotoxinas, aumentando a possibilidade da ocorrência de micotoxicoses de evolução crônica em seres humanos.
- As análises microbiológicas refletem de forma fiel as condições de higiene do ambiente e das etapas do processo produtivo, e devem ser uma prioridade. Há necessidade de revisão da legislação específica deste produto e de uma maior fiscalização da qualidade destas amostras de pólen destinadas ao consumo humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROSOFT BRASIL. Exportação brasileira de mel cresce quase 12% em março. **Jornal Agrosoft**. 2009. Disponível em: <<http://74.220.207.63/~agrosoft/pdf.php/?node=210122>>. Acesso em: 10 jul. 2010.

ALLOCRAFT, R. Aflatoxicosis in farm animals. In: GOLDBLAT, L.A. **Aflatoxin: scientific background, control and implications**. New York: Academic Press, 1969. p. 231-269.

AMBIENTE BRASIL. As abelhas. **Ambiente Brasil**. 2010. Disponível em: <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/natural/abelhas/as_abelhas.html>. Acesso em: 14 jul. 2010.

AMARAL, E.; ALVES, S.B. **Insetos Úteis**. São Paulo: Franciscana, 1979. 188 p.

AMOEDO, L.H.G.; MURADIAN, L.B.A. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real. **Química nova**, v. 25, n. 4, p. 676-679, 2002.

APICULTURA – **Manual do Agente de Desenvolvimento Rural**. 2. ed, 2006. Piauí: SEBRAE, 2006. 186 p. Disponível em: <[http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/E1FB6C78922890F8325739200634514/\\$File/NT00037DA.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/E1FB6C78922890F8325739200634514/$File/NT00037DA.pdf)> Acesso em: 22 jun. 2010.

RPA – Revista Planeta Apicultura. **Apicultura o reino mágico das abelhas**, São Paulo, v. 1, n. 1, 1986.

BARRETO, L.M.R.C.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. **Pólen apícola: perfil da produção no Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/polen/14_poleno_apicola_brasil.pdf> Acesso em: 20 dez. 2010.

BARROS, M.B. **Apicultura**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1965. Monografia (Zootecnia).

BEZERRA, D.S.S. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas *Apis mellifera***. Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, 2009. Dissertação de Mestrado (Química).

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 Abastecimento – MAPA. Portaria nº 368, de 04 de set. 1997a. Aprova o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília. 8 set. 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Portaria nº 451, de 19 set. 1997b. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília. 02 jul. 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 3, de 19 jan. 2001a. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**. Brasília. 23 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 jan. 2001b. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília. 10 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 274, de 15 out. 2002. Aprova o regulamento técnico mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. **Diário Oficial da União**. Brasília. 16 out. 2010.

CAP – Confederação dos Agricultores de Portugal. **Manual de Sanidade Apícola**. Portugal: Federação Nacional de Apicultores de Portugal, 2007. 36 p. Disponível em: <http://www.fnap.pt/gestor/doc_up/documento_cnt_projectos_23.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2007.

CARPES, S.T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2008. Tese de Doutorado (Tecnologia de alimentos).

CARVALHO, M.D.F. **Temperatura da superfície corpórea e perda de calor por convecção em abelhas (*Apis mellifera*) em uma região semi-árida**. Rio Grande do Norte: Universidade Federal Rural do Semi Árido, 2009. Dissertação de Mestrado (Zootecnia).

CAST - Council for Agricultural Science and Technology. **Micotoxins: risks in plant, animal and humans systems**. USA, Iowa: Task Force Report nº 139, 2003. 199 p.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes**. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling. Documento CX/MAS 98/5, 1998.

CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; FERREIRA, A.F.; PODEROSO, J.C.M.; LESSA, A. C. V.; ARAÚJO, E.D.; CARNELOSSI, M.A.G.; RIBEIRO, G.T. Atividade de água (A_a) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do estado de Sergipe. **Revista da Fapese**, v. 4, n. 2, p. 27-36, 2008.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Organização social e desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera***. 2003a. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/organizacao.htm>>. Acesso em: 14 jul. 2010.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Doenças e inimigos naturais das abelhas.** 2003b. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/organizacao.htm>>. Acesso em: 14 jul. 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Training in Mycotoxin Analysis Manuals of Food Quality Control.** Rome: FAO, 1990.

FIBGE – FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário: Rio de Janeiro, 1990-2005.** 2005. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=peo=19ei=P>>. Acesso em: 29 dez. 2010.

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.

GLINSKI, Z.; K, BUCZEK. Resposta da Apoidea a infecções fúngicas. **Apiacta**, v. 38, p. 183-189, 2003.

GONÇALVES, L.S. Abelhas africanizadas: uma praga ou um benefício para a apicultura brasileira. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 5, 1996, Uruguai. **Anais...** Uruguai: 1996. p. 11-13.

GONÇALVES, L.S. Principais impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e perspectivas da apicultura brasileira. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS DE RIBEIRÃO PRETO, 3, 1998, Ribeirão Preto.. **Anais...** Ribeirão Preto: 1998. p. 31-36.

GONÇALVES, J.C. **Mecanismos de defesa comportamental e anatômico contra doenças e ectoparasitas em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*).** Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2008. Tese de Doutorado (Entomologia).

GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2005.

HILLDRUP, J.A.L.; EADIE, T.; LLEWELLYN, G. C. Fungal growth and aflatoxin production on apiarian substrates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 60, n. 1, p. 96-99, 1977.

HILLDRUP, J. L.; LLEWELLYN, G. C. Acute toxicity of the mycotoxin aflatoxin B₁ in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 18, n. 3, p. 217-221, 1979.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Ochratoxin A.** Lyon: IARC, 1993a. p. 489-521. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56).

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Aflatoxins Naturally Occurring Aflatoxins (Group 1), Aflatoxin M₁ (Group 2B).** Lyon: IARC, 1993b. p. 245. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56).

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de mel nos estados brasileiros.** 2002. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=258&id_pagina=1>. Acesso em: 21 jul. 2010.

KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species.** Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2002. 122 p.

LENGLER, S. **Pólen Apícola.** Rio Grande do Sul: UFSM, 2002. 18 p.

LILLEHOJ, E.B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and Animal Foods.** Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 1-35.

LORENZON, M.C.; PEIXOTO, E.L.T.; GONÇALVES, E.A.G.B. **Censo Apícola do estado do Rio de Janeiro – análise conjuntural.** Rio de Janeiro: SESCOOP-RIO, 2006. 104 p.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 949-953, 2006.

MEDINA, A.; GONZÁLEZ, G.; SÁEZ, J.M.; MATEO, R.; JIMÉNEZ, M. Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* wilh. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 261-7, 2004.

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

MORETI, A.C.C.C. **Pólen: alimento protéico para as abelhas: complemento alimentar para o homem.** 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Polen/index.htm>. Acesso em: 09 jun. 2010.

MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage.** Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 23-51.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A; MARASAS, W.F.O. (Eds.). ***Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification.** USA: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e conseqüentes problemas de segurança alimentar. **Revista da SPCNA**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

OLEGÁRIO, T.G.; SANTOS, J.T.; TRINDADE, J.L.F. Pólen: propriedades nutricionais e benefícios à saúde humana. In: SEMANA DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 6, 2008, Paraná. **Anais...** Paraná: UTFPR, 2008. 7p. Disponível em: <<http://www.pg.utfpr.edu.br/setal/docs/artigos/2008/a1/014.pdf>> Acesso em: 15 jan. 2011

ONO, E.Y.S.; MENDES, A.M.; MEIRELLES, P.G.; HIROOKA, E.Y.; ONO, M.A. Micotoxinas em alimentos: progressos na imunodeteção. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 69-80, 2004.

PACHECO, M. R.; FREIRE, R.B.; LORENZON, M.C.A. Ocorrência de micotoxinas no pólen e nas larvas de apiários com cria ensacada brasileira. In: FÓRUM DE DESENVOLVIMENTO DA APICULTURA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 3, 2005, Seropédica. **Anais...** Seropédica: EDUR/UFRRJ, 2006. 78p.

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. Dissertação de Mestrado (Zootecnia).

PACHECO, M.R.; BARTH, O.M.; LORENZON, M.C.A. Tipos polínicos encontrados em colônias de abelhas africanizadas sujeitas à doença cria ensacada brasileira. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2141-2145, 2009.

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

PITT, J.I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2nd ed. Sydney, Australia: CSIRO, Division of Food Processing. 1988. 186 p.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. Desaparecimento de abelhas no hemisfério norte intriga cientistas. **Portal do Agronegócio** 2010. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=7221>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

PLANTAS MEDICINAIS - Enciclopédia completa das plantas medicinais. **Plantas Mediciniais** 2009. Disponível em: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://plantasmediciniais.me/wpcontent/uploads/2009/06/espiga2.jpg&imgrefurl=http://plantasmediciniais.me/tag/barbimao&usg=__ETw6fHp68DuXGcur2r9erLsEW0A=&h=374&w=568&sz=28&hl=ptBR&start=1&um=1&itbs=1&tbnid=fhh7exeoy2_YpM:&tbnh=88&tbnw=134&prev=/images%3Fq%3Dbarbatim%25C3%25A3o%26um%3D1%26hl%3DptBR%26sa%3DX%26tbs%3Disch:1>. Acesso em: 14 jul. 2010.

RAMOS, J.S.; CARVALHO, N.C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n. 10, p. 1-21, 2007.

RANGEL, M.A. **A História do Setor de Apicultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. 2006. Disponível em:<http://www.ufrj.br/abelhanatureza/paginas/monografias_dissertacoes/historia_apicultura.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2011.

RIBEIRO, J.G.; SILVA, R.A. Estudo comparativo da qualidade do pólen apícola fresco, recém-processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas. **Tecnologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 1, n. 1, p. 33-47, 2007.

RÍOS, C.A.R. Pólen-pan de abejas: composición, nutrición, acción en la salud humana y microbiología. **Apicultura Wiki**. Disponível em: < http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/alimentacion/35_polen_pan_de_abejas.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2010.

RODRIGUES, M.A.A.; KELLER, K.M.; KELLER, L.A.M.; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X.; MARASSI, A.C.; KRUGER, C.D.; BARBOSA, T.S.; LORENZON, M.C.A.; ROSA, C.A.R. Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 30, n. 4, p. 249-253, 2008.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SALUNKHE, D.K.; ADSULE, R.N.; PADULE, D.N. Occurrence of aflatoxin. In: SALUNKHE, D.K.; ADSULE, R.N.; PADULE, D.N. **Aflatoxins in foods and feeds**. New Delhi: Metropolitan, 1987. p. 44-92.

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. 388 p.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K.; NETTO, D.P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 63-72, 2003.

SILVA, C.R.; RIBEIRO, L.R.; TOLEDO, V.A.A.; TOLEDO, J.O.A. Uso da parafina incorporada à cera alveolada em colônias de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas para produção de mel. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p. 875-879, 2002.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas Brasileiras Sistemática e Identificação**. 1 ed., Belo Horizonte: IDM Composição e Arte, 2002.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 141-158, 1998.

TEIXEIRA, L.V.; CAMPOS, F.N.M. Início da atividade de vôo em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae): influência do tamanho da abelha e da temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 7, n. 2, p. 195-202, 2005.

TAYLOR, J.; O. R. The past and possible future spread of africanized honeybees in the Americas. **Bee World**, v. 58, p. 19-30, 1977.

THANABORIPAT, D.; SUVATHI, Y.; SRILOHASIN, P.; SRIPAKDEE, S.; PATTHANAWANITCHAI, O.; CHAROENSETTASILP, S. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. **King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Science and Technology Journal**, v. 7, n. 1, p.1-7, 2007.

TRANIELLO, J.F.A.; ROSENGAUS, R.B.; SAVOIE, K. The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, n. 10, p. 6838-6842, 2001.

VILLALOBOS, C.M.B.; PRECIADO, G.L.; JAIME, O.A.M.; MORALES, J.J.T. Mycoflora asociated to bee pollen collected by domesticated bees (*Apis mellifera* L). **Revista Electrónica Nova Scientia**, v. 2, n. 4, p. 93-103, 2010.

WAGACHA, J.M.; MUTHOMI, J.W. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 1-12, 2008.

WILKES, K.; OLDROYD, B. Breeding hygienic disease resistant bees. **Rural Industries Research and Development Corporation**, v. 2 , n. 48, p. 1-35, 2002.

ZMITROWICZ, W. As estruturas territoriais dos insetos. **Estudos Avançados**, v. 15, n. 41, p. 193-212, 2001.