

Ocorrência de micotoxinas em pólen e derivados de colméias de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) acometidas por Cria Ensacada Brasileira

Jhonnatha Paulo Oliveira¹; Sérgio Gaspar de Campos²; Glória Maria Direito²
& Maria Cristina Lorenzon³

1. Discente de Medicina Veterinária Bolsista PROIC/DPPG-UFRRJ; 2. Professor Adjunto, DMIV/IV/UFRRJ; 3. Professor Adjunto, IZ/UFRRJ.

Introdução

O pólen apícola componente da alimentação da abelha *Apis mellifera*, é depositado no favo e incorporado mel e saliva, formando o pão de abelha para alimentação suas crias, e esta sujeito às contaminações ambientais por microrganismos. O pólen apícola tem sido envolvido na etiologia da Cria Ensacada Brasileira (CEB). Há divergências quanto à sua etiologia. Para Carvalho (1998), é uma intoxicação, pela ingestão do pólen de *Stryphnodendron polyphyllum*. Entretanto a baixa ocorrência desta planta nas áreas afetadas pela CEB no estado do Rio de Janeiro, constatada por Pacheco (2005) e Tokarnia (2005), indicam envolvimento de outros agentes. Propágulos de fungos coletados acidentalmente pelas abelhas, podem se desenvolverem e produzirem micotoxinas. Gonzáles et. al. (2005) relatam a identificação de ampla micobiota natural, com capacidade toxigênica, produtores de Ocratoxina A e aflatoxinas B1 e B2, em pólen de *Apis mellifera*. Este estudo objetiva determinar a ocorrência de micotoxinas na etiopatogenia da CEB no Estado do Rio de Janeiro pela análise micotoxicológica do pão de abelha, por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Material e Métodos

As análises foram realizadas no laboratório de Micotoxicologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV-UFRRJ. As amostras constam de 25 alíquotas de pão de abelha coletadas em 5 apiários distintos da região serrana do Rio de Janeiro com mortalidade de larvas e/ou sintomatologia da CEB. Para a extração foram testados 2 métodos. No método A, uma alíquota de 500mg de pão de abelha é macerada em 5,0 ml de Clorofórmio e submetida à agitação por 40 min a 250 rpm, e então filtrado em papel *Whatman* nº 1, o extrato concentrado até resíduo em evaporador rotativo. No método B - proposto por GONZÁLEZ et. al. (2005), uma alíquota de 1,0g de pão de abelha foi homogeneizada em 2,0 ml de acetoneitrila/água 60:40 (v/v) em tubo Falcon 50ml, seguido de agitação por 40 min a 250 rpm e centrifugada a 3.000 rpm por 10 min., e o sobrenadante filtrado em membrana (FHLP 01300, Millipore®), e o extrato concentrado até resíduo, em evaporador rotativo ou banho-maria 60°C. Os resíduos de ambos os métodos, foram diluídos em 0,5 ml de clorofórmio e homogeneizados por ultra-som e então aplicados em cromatofolhas de sílica gel 60 – (Merck nº 5553), ativadas a 120°C/1hr. Utilizando-se como fase móvel tolueno:clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico 90%, 70:50:50:20 (v/v/v/v) (SOARES;AMAYA,1989). Os extratos que apresentaram compostos fluorescentes próximos ao Rf do padrão de Aflatoxina B₁ na CCD foram submetidos à análise por CLAE, eluídos a 0,7ml/min, com metanol:água (45:55, v/v), em coluna de fase reversa C18 (25x4,6cm, 5µ). Com detecção a 350nm.

Resultados e Discussão

Alguns aspectos interferiram na aplicação dos métodos, como a quantidade da amostra, e a presença de mel puro impregnado ao pão de abelha. A ausência de literatura sobre metodologia de extração de micotoxinas em pão de abelha limita a escolha de metodologias a serem testadas. A interferência foi mais significativa no método A que evidenciou a ausência de micotoxinas, porém este resultado não é conclusivo, o clorofórmio demonstrou ser ineficaz quanto à solubilização do pão de abelha, nas amostras analisadas, o que pode ter interferido na extração e na detecção de aflatoxinas, embora um experimento anterior, tenha gerado resultados satisfatórios, com detecção de AFB₁. No método B houve completa dissolução do pão de abelha, extrato final límpido e eficácia na eliminação de interferentes para CCD. Avaliando a qualidade dos extratos, a análise por CLAE demonstrou a presença de interferentes que comprometem a identificação e quantificação das aflatoxinas. Nos cromatogramas a elevada concentração dos compostos interferentes comprometeu a utilização destes métodos em CLAE, demonstrando que a metodologia de extração precisa ser aprimorada.

Conclusões

O método B foi capaz de mostrar a presença de aflatoxinas nas amostras avaliadas, principalmente AFB₁. São necessários estudos complementares e ajustes na metodologia de extração para este tipo de amostra. Os resultados obtidos não foram suficientes para atribuir a etiologia da CEB à contaminação das colméias por micotoxinas.

Bibliografia

CARVALHO, A. C. P. Pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* como agente causador da cria ensacada brasileira em *Apis mellifera* L. 60p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. 2005. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. Journ. Food Microbiology*, aceito em 2005.

PACHECO, M. Intoxicação Natural de Abelhas Melíferas pelo “Barbatimão” no Estado do Rio de Janeiro. Anais 3º Fórum de Desenvolvimento da Apicultura do Estado do Rio de Janeiro, Seropédica, UFRRJ, p. 21, 2005.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenona and sterigmatocystin in some Brazilian foods by multitoxin thin layer chromatographic method. *J. Assoc. Anal. Chem.*, v. 72, p.22-26, 1989.

TOKARNIA, C. 2005. Contribuição ao estudo sobre a mortalidade de cria em colméia de *Apis mellifera* no Estado do Rio de Janeiro. Anais 3º Fórum de Desenvolvimento da Apicultura do Estado do Rio de Janeiro, Seropédica, UFRRJ, p. 22-23.