

AVALIAÇÃO MICOLÓGICA E MICOTOXICOLÓGICA DO PÓLEN DA ABELHA JATAÍ (*Tetragonisca angustula*) PROVENIENTE DE ILHA GRANDE, ANGRA DOS REIS, RJ*

MYCOLOGICAL AND MYCOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE POLLEN OF JATAÍ BEE (*Tetragonisca angustula*) FROM ILHA GRANDE, ANGRA DO REIS, RJ

Marco Antonio Andrade Rodrigues¹; Kelly Moura Keller²; Luiz Antonio Moura Keller²; Águida Aparecida de Oliveira²; Tatiana Xavier Almeida²; Ana Cláudia Marassi³; César Daniel Krüger⁴; Tatiana Salomão Barbosa³; Maria Cristina Affonso Lorenzon⁵ e Carlos Alberto da Rocha Rosa⁶

ABSTRACT. Rodrigues, M.A.A.; Keller, K.M.; Keller, L.A.M.; Oliveira, A.A.; Almeida, T.X.; Marassi, A.C.; Krüger, C.D.; Barbosa, T.S.; Lorenzon, M.C.A.; Rosa, C.A.R. [Mycological and mycotoxicological evaluation of the pollen of jataí bee (*Tetragonisca angustula*) from Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.] Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 30(4):249-253, 2008. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: shalako@ufrj.br

The objectives of this work were to isolate and to identify toxigenic mycobiota in pollen of the bee jataí (*Tetragonisca angustula*), and to characterize the ability for production of mycotoxins from *Aspergillus* and *Penicillium* isolated strains. Were analyzed a total of 30 samples of pollen collected from 5 beehives of the bee jataí, located in Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro State, in the period understood between March 2007 to December 2007. The mycological analyses had been carried through the methodology of dilution serial in plate and the isolated fungi had been identified in genera and species in accordance with the corresponding taxonomic keys. The results confirm that mycobiota contamination in the pollen includes the main toxigenic genera, and/or pathogenic for the animals and human beings. Were isolated strains of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* and *Curvularia*. All isolated strains of *P. citrinum* were citrinin producers when cultivated in CAM and confirmed by TLC. In relation to the *Aspergillus* species, none of *A. flavus* strains produced aflatoxins whereas 40% of the *A. niger* aggregate complex produced ochratoxin A (OTA), what would be indicating a high risk of contamination. Doesn't have specific microbiological criteria for this analyzed product, but in accordance with the existing normatives, all the analyzed samples of pollen in this work exceeded the limit of 10² UFC/g. Thus, these results determine a low hygienical quality of this food and, therefore, highlight the necessity of application of good manufacture practices, specially in the manipulation, to prevent the fungi proliferation in this substrate.

KEY WORDS. Pollen, *Tetragonisca angustula*, fungi, food.

* Recebido em 08 de dezembro de 2008.

¹ Curso de Medicina Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ, Bolsista IC-PIBIC(CNPq/UFRRJ),

² Médico-veterinário, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, Seropédica, RJ, bolsista CNPq

³ Médica-veterinária, Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas, Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

⁴ Médico-veterinário, MSc., Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. UFRRJ, Seropédica, RJ, bolsista CAPES

⁵ Zootecnista. DSc., Departamento de Produção Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, Seropédica, RJ.

⁶ Médico-veterinário, DSc, LD., Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro(UFRRJ). Rodovia BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. Brasil. E-mail: shalako@ufrj.br

RESUMO. Os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar a micobiota toxígena em pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*), e caracterizar a habilidade para produção de micotoxinas de cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas. Foram analisadas um total de 30 amostras de pólen coletadas de 5 colméias da abelha jataí, localizadas em Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro, no período compreendido entre março de 2007 a dezembro de 2007. As análises micológicas foram realizadas através da metodologia de diluição decimal seriada em placa e os fungos isolados foram identificados em gêneros e espécies de acordo com as chaves taxonômicas correspondentes. Os resultados confirmam que a micobiota encontrada no pólen incluem os principais gêneros toxígenos, e/ou patogênicos para os animais e humanos. Foram isoladas cepas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* e *Curvularia*. Todas as cepas de *P. citrinum* isoladas mostraram-se produtoras de citrinina, quando cultivadas em CAM e confirmadas por CCD. Em relação às espécies de *Aspergillus*, nenhuma das cepas de *A. flavus* foram produtoras de aflatoxinas enquanto que 40 % das cepas do complexo *A. niger* agregados foram produtoras de ocratoxina A (OTA), o que estaria indicando um alto risco de contaminação. Não há critérios microbiológicos específicos para este produto analisado, mas de acordo com as normativas existentes todas as amostras de pólen analisadas neste trabalho excederam o limite de 10² UFC/g. Assim, os resultados obtidos determinam baixa qualidade higiênica deste alimento e, portanto, há a necessidade da aplicação de melhores práticas de fabricação, em especial na manipulação, para prevenir a proliferação fúngica neste substrato.

PALAVRAS-CHAVE. Pólen, *Tetragonisca angustula*, fungos, alimentos.

INTRODUÇÃO

A sociedade como um todo tem buscado alternativas alimentares mais saudáveis; com isso está ocorrendo um consumo crescente por produtos orgânicos, dentre estes estão os produtos decorrentes da criação de abelhas indígenas (Meliponicultura). Têm destaque no Brasil os produtos da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*), por exemplo: mel, pólen, própolis, geléia real, etc.; sendo considerados artesanais, por ser prática rústica, corrente entre povos indígenas e pequenas comunidades tradicionais da agricultura familiar (Lopes et al., 2005). Apesar de ser reconhecido como benéfico para a saúde humana (Linskens & Jorde, 1997), o consumo do pólen exige cautela, por ser suscetível aos con-

taminantes ambientais e ao crescimento de microrganismos, sendo necessário rigor em seu processamento. Estudos alertam e discutem sobre a qualidade nutricional do pólen (Roulston & Cane, 2002; Cook et al., 2003). As abelhas melíferas são resistentes à infestação por fungos, porém, nem lisozimas, nem respostas protéicas da hemolinfa conseguem inibir ou destruir esporos ou micélios fúngicos, quando o corpo da abelha é invadido por estas partículas fúngicas (Glinski & Jarosz, 2001). Comumente, os produtos apícolas são oriundos da criação das abelhas *Apis mellifera*, africanizadas, que representa o segmento mais desenvolvido no Brasil (Ibge, 2008). Avaliando o conteúdo dos nutrientes existentes no pólen, uma grande variedade de microrganismos poderia crescer neste substrato (González et al., 2005). Neste contexto, deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais, como as micotoxinas, que são produtos tóxicos do metabolismo secundário de fungos que podem colonizar os alimentos durante a colheita, o transporte e, principalmente, durante o armazenamento, sendo capazes de causar danos à saúde humana. Os principais fungos produtores estão compreendidos nos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*, gêneros estes que reúnem espécies cuja maioria está amplamente disseminada na natureza, utilizando variados tipos de substratos. Com isso, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar a micobiota toxígena em pólen da abelha jataí, e caracterizar a habilidade para produção de micotoxinas das cepas de *Aspergillus*, seções Flavi e Nigri e cepas de *Penicillium citrinum* isoladas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de análises e Amostragem

As análises das 30 amostras de pólen da abelha jataí foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. A amostragem foi efetuada a partir de dois meliponários localizados em Ilha Grande, no município de Angra dos Reis, no período de fevereiro/2007 a dezembro/2007. De cada meliponário selecionaram-se cinco colméias de abelhas jataí das 19 existentes no local, de acordo com a disponibilidade de pólen. As amostras foram imediatamente identificadas, pesadas e tiveram sua atividade de água mensurada, sendo então armazenadas a 4°C até seu uso.

Determinação do conteúdo de umidade

Foi determinada a atividade de água (A_w) de cada amostra com o uso do aparelho AquaLab modelo

CX2, que verifica a quantidade de umidade disponível no substrato, um dos fatores mais importante para o crescimento fúngico.

Isolamento e identificação micobiota contaminante

A enumeração quantitativa das unidades formadoras de colônias por grama (UFC. g^{-1}) de fungos filamentosos foi realizada segundo metodologia de diluição decimal seriada em placa. Cada amostra (0,1 g) foi homogeneizada em “Eppendorf” estéril com 0,9 ml de água destilada estéril (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, diluições decimais seriadas foram realizadas até 10^{-4} . Alíquotas de 0,1 ml foram semeadas, em triplicatas, nos meios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC), um meio utilizado para contagem geral; agar dicloran glicerol a 18% (DG18), um meio seletivo para fungos xerofílicos; e agar dicloran peptona cloranfenicol (DCPA), um meio seletivo para fungos do gênero *Fusarium*. As placas foram incubadas durante 7 dias a $25^{\circ}C$. Todas as placas foram observadas diariamente, selecionando-se para enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 UFC g^{-1} . A identificação taxonômica de todas as colônias consideradas como diferentes foi feita, tanto macroscópica como microscopicamente, seguindo as chaves taxonômicas de cada grupo particular de fungos (Samson et al., 2000). As espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas de acordo com as chaves taxonômicas propostas por Klich & Pitt (1988) e Pitt & Hocking (1997), respectivamente.

Estabelecimento do perfil toxígeno

A capacidade toxígena de espécies de *Aspergillus*, seções Flavi e Nigri e cepas de *Penicillium citrinum* foram analisadas por cultivo em agar leite de coco (CAM) e da aplicação do *agar plug method* (Bragulat et al., 2001). As cepas foram inoculadas em CAM e incubadas a $25^{\circ}C$, durante 7 dias. Após esse período, as placas tiveram a fluorescência ao redor da colônia monitorada através de irradiação ultravioleta de $\lambda=365$ nm, com lâmpada mineral light UVSL25. Foram então retirados três *plugs* de 5 mm de diâmetro com furador de rolha do centro de cada uma das colônias. Os *plugs* foram acondicionados em “Eppendorf” contendo 1 ml de metanol e centrifugados a 4000 rpm (rotações por minuto) durante 10 min. As fases metanólicas foram extraídas e acondicionadas em frascos de cor âmbar, sendo testadas qualitativamente através de cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmação da micotoxina.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por variância (ANOVA). Todos os dados foram transformados, usando a função logarítmica $\log_{10}(x+1)$ antes da ANOVA. O teste de Duncan foi utilizado na comparação dos dados de enumeração fúngica nos diferentes meios de cultivo. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e identificação micológica

Foi realizada a contagem total dos fungos filamentosos isolados das amostras de pólen nos diferentes meios de cultivo (Tabela 1). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Pólen (Brasil, 2001) não é específico na determinação dos critérios microbiológicos deste alimento. A Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) fixa o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos; entretanto, ocorre uma dificuldade prática de localização da melhor categoria que enquadre corretamente este produto vegetal. A legislação para geléia real é a única que explicitamente limita em 100 UFC/ml de contaminação para fungos e leveduras no produto; o mesmo ocorre com a Farmacopéia Brasileira (1988), que estipula um limite de contaminação de até 100 UFC/ml para fungos e 300UFC/ml para bactérias em produtos não-estéreis utilizados para manipulação. Visto então que o pólen é muitas vezes consumido “in natura”, em pequenas porções, utilizamos este limite de 10^2 UFC/g para fins comparativos na determinação da qualidade higiênica do pólen. No meio DRBC, as amostras de pólen apresentaram valores entre ND até $9,0 \times 10^5$ UFC. g^{-1} (ND = não detectado). No meio DG18, seletivo para fungos xerofílicos, a maior carga fúngica obtida foi de $1,1 \times 10^6$ UFC. g^{-1} em uma amos-

Tabela 1. Contagem total de fungos filamentosos isolados em amostras de pólen.

Contagem de propágulos fúngicos (UFC g^{-1}) ^{AB}	Meios de Cultivo		
	DRBC	DG18	DCPA
Pólen de Abelha Jataí	$9,4 \times 10^1 \pm 1,9 \times 10^{5a}$ (ND – $9,0 \times 10^5$)	$1,7 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^{5a}$ (ND – $1,1 \times 10^6$)	$7,0 \times 10^1 \pm 1,1 \times 10^{5a}$ (ND – $4,0 \times 10^5$)

^A valores das médias \pm desvio padrão.

^B intervalo dos valores máximos e mínimos.

ND não detectado. Limite de detecção da técnica: 10^2 UFC g^{-1} .

^a médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,0001$).

tra de pólen. Já no meio DCPA, utilizado para isolamento de fungos do gênero *Fusarium* sp, os valores estiveram entre ND a $4,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Somente 23% das amostras coletadas não superaram os níveis de qualidade higiênica. A qualidade microbiana é uma dentre as várias exigências relacionadas com os critérios de segurança a serem considerados; além de alterar as propriedades do produto, pode constituir risco para a saúde do consumidor, principalmente em se tratando de microrganismos patogênicos.

A atividade de água das amostras não apresentou diferenças significativas; entretanto os valores são elevados e foram: mediana (0,776), máximo (0,811) e mínimo (0,715), durante todas as coletas. Foram identificadas 124 cepas de espécies pertencentes a seis gêneros fúngicos (Figura 1), que em ordem de ocorrência foram: *Aspergillus* spp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* spp., *Mucor* sp., *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp. As espécies de *Penicillium* isoladas foram: *P. citrinum*, o mais freqüente, seguido por *P. variable*, *P. glabrum* e *P. implicatum* (Figura 2). O gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos foi representado por *A. flavus*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Eurotium* sp., *A. fumigatus* e *A. restrictus* (Figura 3).

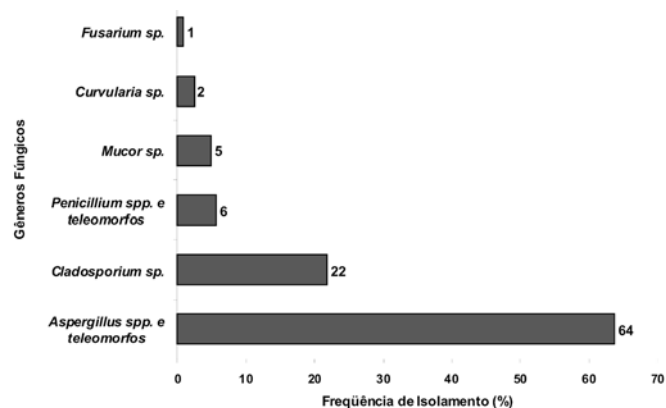


Figura 1. Freqüência (%) de gêneros fúngicos isolados de amostras de pólen.

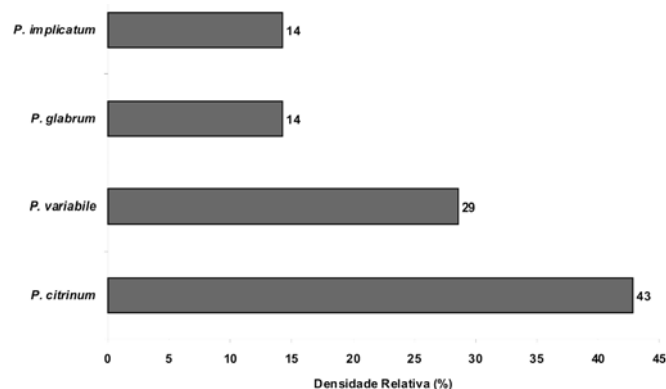


Figura 2. Densidade relativa (%) de espécies de *Penicillium* isoladas de amostras de pólen.

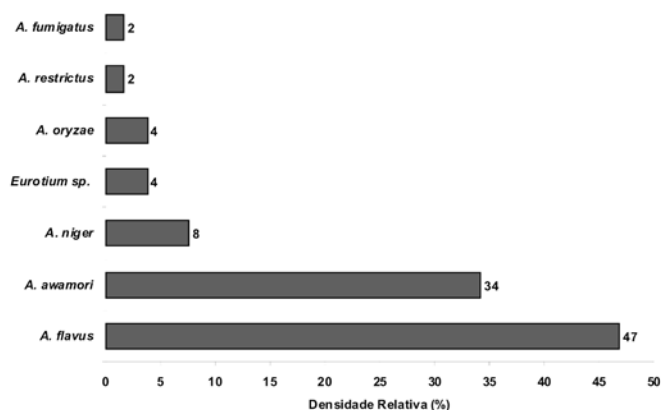


Figura 3. Densidade relativa (%) de espécies de *Aspergillus* isoladas de amostras de pólen.

Nossos resultados diferem dos encontrados por Kaëniová; Fikselová (2007) que relataram os seguintes fungos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. As espécies encontradas com maior freqüência neste episódio foram: *Penicillium* sp. (100%), *Aspergillus niger* (67%) e *Cladosporium cladosporioides* (67%).

As amostras coletadas reúnem, portanto, uma série de fatores que aumentam o risco deste alimento para a saúde humana: altos níveis de contaminação por fungos, presença dos principais gêneros produtores de micotoxinas, com especial destaque para *Aspergillus* spp. e alta atividade de água nas amostras.

Todas as cepas de *P. citrinum* isoladas mostraram-se produtoras de citrinina, quando cultivadas em CAM e confirmadas por CCD. Em relação às espécies de *Aspergillus*, nenhuma de *A. flavus* foi produtora de aflatoxina, enquanto que 40% das cepas do complexo *A. niger* agregados foram produtoras de ocratoxina A (OTA). Hilldrup et al. (1978) demonstraram que *A. flavus* e *A. parasiticus* crescem e produzem aflatoxinas em uma variedade de substratos da colméia, como pólen apícola, pão de abelhas, favos de cria, larvas e abelhas adultas. Preocupados com a falta de qualidade do pólen apícola, González et al. (2005) também encontraram fungos produtores de OTA ao analisarem amostras de pólen originárias da Espanha e Argentina, porém este é o primeiro relato na literatura sobre produtores de citrinina. A presença dessas espécies tóxicas constitui um risco de contaminação do alimento pelas micotoxinas. Quando este alimento é mal conservado, o fungo encontra condições favoráveis, principalmente de temperatura e atividade de água, para iniciar a produção de suas toxinas (Cast, 2003).

CONCLUSÃO

O pólen, destes meliponários de Ilha Grande, encontra-se contaminado por diversas espécies toxígenas, elevando o risco da ocorrência de micotoxicoses de evolução crônica; com danos à saúde dos humanos, seja pela modulação de doenças, ou pela redução da qualidade nutritiva deste alimento. A determinação da micobiota é de grande importância, porque pode prover informações sobre as micotoxinas que podem, potencialmente, estarem presentes nas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bragulat, M.R.; Abarca, M.L. & Cabañes, F.J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int. J. Food Microbiol.*, 71:139-144, 2001.
- Brasil. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 10 de janeiro de 2001.
- Brasil. Instrução Normativa n. 3, de 23 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelhas, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 23 de janeiro de 2001
- CAST - Council for Agricultural Science and Technology. *Micotoxins: Risks in Plant, Animal and Humans systems*. USA, Iowa: Task Force Report Nº 139, 2003. 199p.
- Cook, S.M.; Awmack, C.S.; Murray, D.A. & Williams, I.H. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecol. Entomol.*, 28:622-627, 2003.
- Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. Editora Atheneu, São Paulo, 1988.
- Glinski, Z. & Jarosz, J. Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta*, 36:12- 24, 2001.
- González, G.; Hinojo, M.J.; Mateo, R.; Medina A. & Jiménez, J.M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. Food Microbiol.*, 105:1-9, 2005.
- Hilldrup, Ja.; Eadie, T. & Llewellyn, G.C. Fungal growth and aflatoxin production on apiarian substrates. *Z. Leb. Unt. Forsch.*, 60:96-99, 1977.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário: Rio de Janeiro, 1990-2005. 207p. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=19&i=P>. Acesso em: 28 jan. 2008.
- Kaèániová, M. & Fikselová, M. Mycological flora on tree fruits, crust, leaves and pollen *Sorbus Domestica* L. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 14:229-232, 2007.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. North Ryde, CSIRO. 1988. 116p.
- Linskens, H.F. & Jorde, W. Pollen as food and medicine. A review. *Economic Bot.*, 51:77-78, 1997.
- Lopes, M.; Ferreira, J.B. & Dos Santos, G. Abelhas sem-ferão: a biodiversidade invisível. *Agriculturas*, 2(4):7-9, 2005.
- PITT, J.I. & HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 2. ed. Cambridge, Chapman & Hall, 1997. 593 p.
- Roulston, T.H. & Cane, J.H. The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera:Apiformes). *Evolution. Ecol.*, 16: 49-65, 2002.
- Samson, R.A; Hockstra, E.S.; Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. *Introduction to food and airborne fungi*. 6th ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, 2000. 388p.