



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

ELIANE DOS SANTOS SIMAS

CARACTERIZAÇÃO MICOLÓGICA DE MÉIS RORAIMENSES COMO
CRITÉRIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR

BOA VISTA, RR

2015

ELIANE DOS SANTOS SIMAS

**CARACTERIZAÇÃO MICOLÓGICA DE MÉIS RORAIMENSES COMO
CRITÉRIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Manejo e Conservação de Bacias Hidrográficas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja

BOA VISTA, RR
2015

ELIANE DOS SANTOS SIMAS

**CARACTERIZAÇÃO MICOLÓGICA DE MÉIS RORAIMENSES COMO
CRITÉRIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Manejo e Conservação de Bacias Hidrográficas. Defendida em ___ de agosto de 2015 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Guiomar Simas “in memoriam” e a minha mãe intelectual Silvana Tulio Fortes, por me ensinarem que a educação é uma herança para toda vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por conseguir superar mais uma barreiras na minha formação. Ao Programa de pós graduação em Recursos Naturais. À CAPES, pelo incentivo à pesquisa e pela bolsa concedida. Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr Marcos Vital pela paciência e a Prof^a Dr^a Fabiana Granja por ensinar a Biologia molecular. Aos professores do PRONAT, carinhosamente a Prof^a Dr^a Gardênia Cabral. A minha mãe intelectual Prof^a Dr^a Silvana Tulio Fortes sem ela não conheceria o mundo dos fungos. Todos estes professores contribuíram para meu crescimento profissional e intelectual. Agradeço ao seu Assis, pois foi um guia para chegar aos apiários. Ao meu amigo Ubiracy Pereira Jr. caminhamos juntos nesta jornada, compartilhamos momentos durante estes dois anos, Eduardo Brito meu amigo sendo considerado-o “oráculo da molecular”, Tacio Pimentel, Daniele Rocha, Msc Andréia Alencar, Msc Gisele Oliveira, Marcos Nogueira, Laylah Roberta, Caroline Coelho, Leandro Silva, Rose Coelho, à todos do grupo “um gole”, à todos do laboratório de Microbiologia/UFRR/PRONAT. Todos meus amigos que faz parte do meu cotidiano, à minha família: minha avó Pituca e Maria, aos meus amados irmãos e a minha sobrinha Maria Clara: pelo amor, apoio, confiança e motivação. Que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.

Muito Obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

O mel é um suplemento alimentar, que vem recebendo um incremento no consumo, decorrente das diversas propriedades benéficas à saúde. A microbiota do mel é constituída por leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Este alimento tem um alto valor comercial e está sujeito às fraudes e adulterações que podem favorecer o aumento do número de colônias desses micro-organismos, principalmente os fungos filamentosos, o que poderá acarretar na produção micotoxinas. Alguns fungos são patogênicos, oportunistas e responsáveis por doenças nos seres humanos, através de alimentos contaminados pela presença de micotoxinas. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar micologicamente amostras de méis produzidos em Roraima visando à segurança alimentar deste alimento. Foram realizadas análises de méis procedentes do apiário experimental da Universidade Federal de Roraima/UFRR, apiários de Mucajaí e Cantá e de uma marca comercial, coletados nos períodos chuvoso e seco, perfazendo um total de oito amostras. Os fungos filamentosos e leveduras foram isolados e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas para enquadramento na legislação do Mercosul. O método convencional de identificação foi baseado em características da macro e micromorfologia, e o método molecular, na PCR de rDNA e amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 com os iniciadores universais ITS1 e ITS4. Das amostras analisadas somente a coletada no apiário de Mucajaí no período chuvoso, foi considerada imprópria devido a quantidade de fungos filamentosos e/ou leveduras que excederam 100 UFC. Foram obtidas 63 UFC de fungos filamentosos das amostras de méis roraimenses, as quais foram agrupadas em 19 morfotipos pertencentes aos gêneros *Penicillium*; *Paecilomyces*, *Syncephalastrum*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Eurotium* e *Monodictys*, e as espécies *Eurotium amstelodami*, *E. rubrum*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium citreonigrum*, *P. hispanicum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Talaromyces mineoluteum* e *T. phialosporus*. Todos os gêneros isolados são potencialmente toxigênicos, com exceção de *Syncephalastrum*. Os parâmetros micológicos observados nas amostras reforçam a necessidade do controle de qualidade dos méis na região, bem como da implantação de Boas Práticas Fabricação.

Palavras chaves: Identificação. Fungos. Toxigênicos. Alimentos. Roraima.

ABSTRAT

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2.....	41
Figura 2 -	Mapa georeferenciado dos pontos de coleta onde se encontraram os apiários e o supermercado, nos quais as amostras de méis produzidos por <i>Apis mellifera</i> foram coletadas para análise.....	47
Figura 3 -	Descrições das amostras de méis de municípios roraimenses.....	48
Figura 4 -	Características macromorfológicas e micromorfológicas do <i>Penicillium</i> sp1, sp2, sp3, sp4, sp5 e sp6, obtidos das amostras de méis do período chuvoso, em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso; (b) reverso da colônia; c) estruturas microscópicas.....	70
Figura 5-	Características macromorfológicas dos <i>Paecilomyces</i> sp1, sp2 e sp3, obtidos das amostras de méis do período chuvoso, em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 40x e 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia. (c) estruturas microscópicas.....	71
Figura 6 -	Características macromorfológicas e micromorfológicas do <i>Humicola</i> sp1 e sp2 obtidos das amostras de méis do período chuvoso em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; (c) estruturas microscópicas.....	72
Figura 7 -	Características macromorfológicas e micromorfológicas do gênero <i>Monodictys</i> obtidos da amostra de mel do período chuvoso em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 40x e 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; c) Conidióforo; d) Conídios.....	73
Figura 8 -	Características macromorfológicas e micromorfológicas gênero <i>Eurotium</i> , obtidos das amostras de méis do período chuvoso em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; (c) Vesícula; (d) Conidióforo; (e) Conídios; (f) Célula-pé; (g) Cleistotécios.....	74
Figura 9 -	Características macromorfológicas e micromorfológicas gênero <i>Cladosporium</i> obtidos das amostras de méis do período seco em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; c); Conidióforo d) Conídios.....	75
Figura 10 -	Características macromorfológicas e micromorfológicas do gênero <i>Syncephalastrum</i> , obtidos das amostras de méis do período seco em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) Verso da colônia; (b) Reverso da colônia; (c) estrutura microscópicas.....	75
Figura 11 -	Características macromorfológicas do fungo filamentoso BM03, obtido de amostra de mel do período chuvoso, em meio Sabouraud.	76

Figura 12 -	Características macromorfológicas e micromorfológicas do fungo filamentoso BM04 obtido de amostra de mel do período chuvoso em meio Sabouraud.....	77
Figura 13 -	Características macromorfológicas do fungo filamentoso BM12 obtido de amostra de mel do período chuvoso em meio Sabouraud. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia.....	77
Figura 14 -	Características macromorfológicas do fungo filamentoso BM14 obtido de amostra de mel do período chuvoso em meio Sabouraud. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia.....	78
Figura 15 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA extraído dos fungos filamentosos, 1. BM01, 2. BM04, 3. BM06, 4. BM08, 5. BM12, 6. BM013, 7. BM016, 8. BM17, 9. BM018, 10. BM19, 11. BM19.....	80
Figura 16 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA extraído dos fungos filamentosos. 1. BM02, 2. BM03, 3. BM05, 4. BM07, 5. BM09, 6. BM10, 7. BM11, 8. BM14, 9. BM15, 10. BM019, 11. BM19.	80
Figura 17 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos amplificados na PCR dos fungos filamentosos, BM01, BM02, BM03, BM04, BM07, BM08, BM09, BM10, BM11, BM13, BM114, BM15, BM16 e BM17; CN- Controle negativo.....	83
Figura 18 -	Perfis eletroforéticos em gel de agarose 1% dos produtos amplificados referente às amostras de DNA dos fungos filamentosos obtidos das amostras analisadas de méis roraimenses.....	85
Figura 19 -	Fungos filamentosos obtidos de amostras de méis roraimenses analisadas no período chuvoso e período seco preservados em água destiladas.....	88
Figura 20 -	Fungos filamentosos obtidos de amostras de méis roraimenses analisadas no período chuvoso e período seco preservados em meios Saubourad.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequência de bolores e leveduras (UFC/g), pH e período de coletas de amostras de méis roraimense.....	57
Tabela 2 -	Morfotipos de fungos filamentosos, distribuídos por amostra no período chuvoso e período seco, obtidos de méis roraimenses produzidos pelas abelhas <i>Apis mellifera</i>	65
Tabela 3 -	Valores de absorvância obtidos das amostras de DNA dos fungos filamentosos isolados dos méis roraimenses.....	81
Tabela 4 -	Caracterização convencional e molecular dos morfotipos dos fungos filamentosos com suas respectivas quantidades de pares de bases dos fragmentos amplificados.....	83
Tabela 5 -	Ocorrência dos fungos filamentosos em méis roraimenses por período e percentual de ocorrência.....	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Produção, comercialização e consumo de mel no Brasil	17
1.2	Caracterização do mel	18
1.3	A origem do mel de Roraima	19
1.4	Consumo do mel de Roraima	21
1.5	Parâmetros de contaminação do mel	23
1.5.1	<i>Contaminantes microbiológicos</i>	30
1.5.1.1	<i>Fungos filamentosos de alimentos</i>	34
1.5.2	<i>Importância da caracterização micológica</i>	36
1.5.2.1	<i>Identificação dos fungos filamentosos</i>	39
1.5.3	Identificação Molecular	41
1.6	Parâmetros legais de qualidade do mel	42
2	OBJETIVOS	45
2.1	Objetivo geral	45
2.3	Objetivos específicos	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1	Localização das áreas de estudo	46
3.1.1	Amostragem	46
3.2	Isolamento e contagem de fungos filamentosos e leveduras	48
3.3	Quantificação das colônias	49
3.4	Agrupamento dos fungos filamentosos	49
3.5	Enquadramento dos resultados na legislação específica	49
3.6	Identificação dos fungos filamentosos	50
3.6.1	<i>Técnica de Microcultivo em lâmina</i>	50
3.6.2.	<i>Caracterização Molecular</i>	51
3.6.2.1	<i>Extração de DNA</i>	51
3.6.2.2	<i>Amplificação por PCR dos genes ITS1-5,8S-ITS2</i>	52
3.6.2.3	<i>Eletroforese</i>	53
3.6.2.4	<i>Purificação dos produtos de PCR</i>	53
3.6.2.5	<i>Sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2</i>	54
3.6.2.6	<i>Edição e alinhamento das sequências de DNA</i>	54
3.7	Preservação dos fungos	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Isolamento dos fungos filamentosos obtidos das amostras de méis roraimenses	56
4.2	Quantificação dos fungos filamentosos e leveduras obtidos das amostras de méis roraimenses.....	57
4.3	Enquadramento das amostras na legislação.....	63
4.4	Identificação dos fungos filamentosos obtidos nas amostras de méis roraimenses	64

4.4.1	Características dos morfotipos de fungos filamentosos obtidos de amostras de méis roraimenses.....	69
4.4.2	Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados dos méis roraimenses	78
4.4.2.1	Avaliação eletroforética da extração de DNA dos fungos filamentosos obtidos dos méis roraimenses.....	79
4.4.2.2	<i>Quantificação do DNA genômico</i>	81
4.4.2.3	<i>Amplificação por PCR e sequenciamento da região ITS do rDNA dos fungos filamentosos obtidos dos méis roraimenses</i>	82
4.5	Preservação dos fungos filamentosos obtidos das amostras de méis roraimenses.....	88
5	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Esta pesquisa tem como objetivo geral caracterizar os fungos filamentosos presentes em amostras de méis produzidos em Roraima. Espera-se que as informações obtidas possam contribuir para a formação de uma base de dados, que caracterize a qualidade deste produto, sendo um importante fator de viabilização do processo de comercialização.

O Brasil está entre os maiores produtores de mel do mundo, devido a sua flora diversificada que favorece a produção ao longo do ano. A legislação brasileira define-o como um produto natural elaborado a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas, ou de excreções de insetos sugadores de plantas.

As abelhas recolhem o pólen e o néctar das flores ou exsudatos das plantas, são transportados para a colmeia, onde irá sofrer mudanças em sua concentração e composição química, para então ser armazenado e deixam maturar nos favos. O mel é um suplemento alimentar, que vem recebendo um incremento no consumo comercial, decorrente das diversas propriedades benéficas à saúde. É um alimento rico em vitaminas, minerais, aminoácidos e antioxidantes. Além destas propriedades, o mel é utilizado na medicina popular como antimicrobiano. Esta característica vem despertando interesse entre os pesquisadores, devido ao potencial farmacológico do produto.

A microbiota do mel é constituída por micro-organismos, como leveduras, fungos filamentosos e bactérias formadoras de esporos, mesmo em quantidade reduzidas. Estes micro-organismos são originários de fontes primárias, introduzidos pelas próprias abelhas, e por fontes secundárias advindas da forma inadequada de higiene durante o manejo das colmeias e da manipulação do mel. Alguns destes micro-organismos, principalmente os fungos filamentosos são produtores de micotoxinas. Ressalte-se que a presença de fungos filamentosos em mel puro não interfere na qualidade do mel.

O mel é um produto natural com alto valor comercial e está sujeito às fraudes e adulterações que podem favorecer o aumento do número de colônias dos fungos filamentosos o que, conseqüentemente, aumentará a quantidade de micotoxinas. Estes micro-organismos poderão causar também a deterioração do

mel, a fermentação, o envelhecimento e o desenvolvimento de espécies competidoras. Por se tratar de um alimento necessita de análise, uns dos parâmetros para definição e certificação deste produto no mercado são os parâmetros micológicos. Visto que alguns fungos são patogênicos, oportunistas e responsáveis por doenças nos seres humanos, através de alimentos contaminados pela presença de micotoxinas.

É relevante avaliar a qualidade micológica do mel antes da comercialização, a qual está diretamente relacionada com a segurança no consumo deste alimento. Para reduzir os riscos de contaminação durante o manejo, os apicultores precisam seguir criteriosamente as normas das Boas Práticas Apícolas - BPA em todas as etapas do processo produtivo. Alguns fatores podem favorecer o aumento do número de colônias dos fungos no mel, tais como as condições climáticas, o estágio de maturação, o processamento e o armazenamento deste alimento, comprometendo a qualidade do produto.

Nesta pesquisa utilizou-se, principalmente, os parâmetros estabelecidos pela resolução do Mercosul, este instrumento contempla os parâmetros micológicos que preconizam critérios de identidade e qualidade do mel. A legislação brasileira não estabelece padrões microbiológicos para o mel, somente contempla os parâmetros físico-químicos como requisitos para a qualidade e classificação do produto. Estes parâmetros têm sido amplamente pesquisadas por diversos autores, e servem para excluir os méis que sofreram alguma prática de adulteração ou processamento inadequado.

Atualmente a produção e a comercialização do mel são regulamentadas por critérios de qualidade específicos na legislação brasileira. Porém, a legislação é omissa e inespecífica em relação aos quantitativos toleráveis para a qualidade microbiológica do mel de abelhas. Por outro lado, apesar do crescimento da produção e da qualidade do mel, ainda existem desafios relacionados ao processamento, manejo e fontes de contaminação. A legislação brasileira não contempla as diversidades da flora no Brasil, que é peculiar em cada região, e também só contempla as características do mel de *Apis*, deixando de apresentar parâmetros para o mel das abelhas nativas e informações micológicas.

Devido à crescente exigência do mercado consumidor nacional e internacional, em relação à qualidade de produtos alimentícios, postula-se a

seguinte questão: os méis do Estado de Roraima se adéquam aos padrões de qualidade estabelecidos pelo Regulamento Técnico do MERCOSUL, quanto às características micológicas?

Os procedimentos metodológicos utilizados nesta pesquisa foram o isolamento, a quantificação, em seguida foram agrupados em morfotipos e identificados pela taxonômica convencional e molecular. As leveduras foram somente quantificadas. As amostras de méis foram coletadas de produtores que não fornecem alimentação artificial às abelhas. Foram analisadas amostras de méis dos municípios de Boa Vista/RR, Cantá/RR, e Mucajaí/RR. As amostra foram coletadas no período chuvoso e seco e as análises realizadas nos Laboratórios do PRONAT-UFRR.

Acredita-se que grande fração do mel apícola de Roraima apresenta um diferencial quanto a sua origem em relação aos outros Estados do país, por ser proveniente em grande proporção de nectário extrafloral existente no pecíolo das folhas de *Acácia mangium*, sendo denominado de “Mel de Acácia” ou mel de melato. O mel de melato é diferente em suas propriedades físico-química do mel floral. Devido constar no rótulo a origem da produção e a falta de conhecimento sobre o melato, no mercado consumidor o valor comercial é menor.

Portanto, a caracterização micológica dos méis roraimenses contribuirá para a classificação e origem do mel apícola, agregando valor ao produto, e tornando-se um diferencial competitivo para o Arranjo Produtivo Local - APL. Desta forma, favorecendo a conquista de novos mercados e, ainda, ampliando o conhecimento da diversidade dos fungos filamentosos em méis e dos parâmetros micológicos que podem indicar a qualidade deste produto. Este é um dos motivos pelos quais esta pesquisa possui relevância também na área social. Assim, torna-se importante o diagnóstico da qualidade micológica para a real identidade do mel roraimense.

O referencial teórico ressalta a importância da qualidade microbiológica do mel, direcionando principalmente aos fungos filamentosos podem causar danos à saúde pública, devido à produção de micotoxinas. Abrange a importância de fazer a caracterização micológica do mel, as possíveis adulterações devido à valorização do produto, os tipos de contaminações, os riscos devido ao manuseio inadequado, desde a produção, armazenamento e comercialização do produto. Ressalta também a classificação e a origem do mel em Roraima, a identificação taxonômica

convencional e molecular dos fungos filamentosos no mel e os parâmetros legais da qualidade deste produto no Brasil.

1.1 Produção, comercialização e consumo de mel no Brasil

A riqueza de produtos naturais no Brasil está refletida também na apicultura nacional, traduzindo-se em produtos únicos e diferenciados. A produção apícola nacional é de 40.000 toneladas anuais, sendo o Brasil 11º produtor no ranking mundial e o 5º maior exportador, passando de 269 toneladas de mel exportadas em 2000, para 21 mil toneladas em 2005 (CBA, 2013). A apicultura teve grande impulso após 2001, quando o Brasil iniciou as exportações de mel para a Europa e Estados Unidos (SENAI, 2009).

No Brasil a produção do mel comercial está ligada a inserção das abelhas europeias da espécie *Apis mellifera*, cuja história teve início no Rio de Janeiro em 1839. No entanto, a apicultura brasileira avançou com a introdução de abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) em 1956, o que culminou na africanização das demais subespécies existentes. Após o desenvolvimento de técnicas adequadas de manejo na década de 70, além do aumento da procura do mel e a valorização do produto, a apicultura passou a ser intensamente praticada em todos os estados (PIRES, 2011).

Nas regiões brasileiras as abelhas africanas estão bem adaptadas a áreas urbanas, bordas de florestas e formações vegetativas abertas (OLIVEIRA; CUNHA, 2005). Também são amplas as características de diversidade de flora e clima, o que favorece um mel diferenciado, com peculiaridades de acordo com sua origem, as quais lhe conferem potencial para atividade apícola (SILVA et al., 2009).

No decorrer dos anos, a apicultura no Brasil está se tornando tecnificada, deixando-se voltar ao mercado interno e aumentando sua produção para exportação com técnicas mais apuradas de manejos e manipulação do mel (MONTES et al., 2013). O sucesso do Brasil ocorre devido à variedade do mel, que é promovida pela diversidade de flora e as diferentes espécies de abelhas produtoras de mel (SODRÉ et al., 2003).

De acordo com Barbosa, Lopes e Barbosa (2007), a apicultura é um ramo da agricultura com atividade econômica de baixo impacto ambiental, que possibilita a utilização dos recursos naturais, contribuindo para a preservação da natureza. A produção de mel e de outros produtos da colmeia depende das florestas ou pasto apícola. Segundo Mendonça et al. (2008) a apicultura possibilita uma renda aos

proprietários de terra, os quais têm um retorno econômico e, ao mesmo tempo, mantêm o equilíbrio no ambiental.

Com o início das exportações cresceu a preocupação com a manutenção da qualidade do mel produzido no Brasil, seguindo as normas estabelecidas nas Boas Práticas Apícolas (BPA). Diante da preocupação com a saúde do consumidor, observa-se que é cada vez maior a busca da garantia da produção de alimentos seguros no setor agropecuário, a qual está alinhada às outras exigências do mercado (SENAI, 2009).

A comercialização de mel em Roraima é priorizada por Arranjo Produtivo Local - APL, que corresponde a uma das formas organizacionais para aumentar a produção, principalmente como atividade econômica, geralmente em parceria com Estados e Municípios, como explicam Barbosa, Lopes e Barbosa (2007, p.53):

A apicultura roraimense é uma das atividades prioritárias para ações de incentivo e fomento à produção agropecuária e ao desenvolvimento regional. Foi priorizado como Arranjo Produtivo Local – APL, com projetos de estudo e desenvolvimento que vem sendo realizados pela Fundação Estadual do Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia – FEMACT, a partir da organização da Câmara Setorial de Apicultura, e por parte do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE-RR, por meio do Projeto Apis.

Com o aumento da produção e o consumo do mel, conseqüentemente, é crescente a preocupação, bem como o conhecimento das características utilizadas como indicadoras de qualidade do alimento.

1.2 Caracterização do mel

O mel é um produto alimentício composto por uma solução concentrada de açúcares, com predominância de glicose e frutose. Contém ainda, uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen; podem conter cera de abelhas procedente do processo de extração e as vitaminas essenciais à saúde humana (LACERDA et al., 2010).

O mel é um produto rico em nutrientes e a cor influencia na escolha do mesmo pelos consumidores. De acordo com Lacerda et al. (2010, p. 1022), a cor do mel reflete suas características:

Na aquisição do mel um dos principais critérios adotados pelos consumidores é a aparência, sendo que o produto de cor clara alcança valor mais elevado no mercado mundial. No entanto, os méis de cor escura são mais ricos em sais minerais, em vitaminas B e C³ e possuem um aroma mais acentuado que os méis de cor clara. A cor é uma propriedade óptica, resultante da absorção de luz nos diferentes comprimentos de onda provocados pelos constituintes do mel.

Com a relação à cor, segundo Neto, Oliveira e Santos (2015) esse parâmetro não diz respeito à qualidade direta do mel. No entanto, o aspecto visual é atrativo ao consumidor, Os méis mais claros são os mais preferidos para consumo, atingindo maior valor comercial que os méis escuros. Assim a cor é um dos parâmetros que determinam o seu valor no mercado.

O mel de abelhas tem sua origem no néctar das flores e/ou exsudados sacarínicos de plantas, armazenados em favos de cera pelas abelhas melíferas (AROUCHA et al., 2008). Quanto a origem do mel, são considerados dois tipos: o mel de néctar, obtido do néctar das plantas e o mel de melato, obtido das excreções dos insetos sugadores de plantas ou das secreções provenientes de plantas (BRASIL, 2000). O mel produzido por *A. mellifera* quando comparado com outros produtos de origem animal, apresenta um baixo número e menor variedade de micro-organismos, porém não é um alimento estéril, estando susceptível a contaminações tanto primárias quanto secundárias (SILVA et al., 2008).

1.3 A origem do mel de Roraima

Roraima é dividido em três grandes sistemas ecológicos: florestas; campinas-campinaranas e savanas ou lavrado (BARBOSA; MIRANDA, 2005). O lavrado é o termo local para a região das savanas de Roraima. Trata-se de um ecossistema único, sem correspondente em outra parte do Brasil (INPA, 2008). Esta região se constitui numa extensa área aplainada, coberta por lavrado (PINHEIRO; HORTÊNCIO; EVANGELISTA, 2012).

As áreas de lavrado ocupam as partes do centro-leste e nordeste do estado, contribuindo com 17% do total. Os lavrados ocupam um importante espaço na biogeografia do estado de Roraima. Essa importância ultrapassa aos limites físicos do espaço geográfico, influenciando e moldando a ocupação social e o desenvolvimento do Estado (BARBOSA; MIRANDA, 2005).

Na região de lavrado predomina o plantio de *Acacia mangium*, pois esta espécie foi introduzida comercialmente no final do século passado, visando suprir a demanda de matéria-prima para a indústria de produtos cerrados e de celulose (TONINI; HALFELD-VIEIRA; SILVA, 2010). Segundo Barros et al. (2009) os plantios florestais de *A. mangium* constituem uma alternativa cada vez mais praticada em áreas de lavrado do norte da Amazônia, ocupando mais de 25.000 hectares nas áreas de lavrado de Roraima. Outra característica nessa região é a utilização para a produção de mel, estando próximas de áreas degradadas de pasto, fruticulturas e/ou cultivos agrícolas e com fácil acesso na maior parte do ano (PEZENTE, 2011).

As espécies de *A. mangium* são caracterizadas pelas folhas bipenadas, comumente aculeadas, pecíolos com glândulas (nectários extraflorais) e androceu com numerosos estames, brancos, cremes ou amarelos. O gênero *Acacia* compreende mais de 1.350 espécies de distribuição cosmopolita, mas também caracterizado principalmente por espécies com glândulas nos pecíolos ou nectários extraflorais (DU BOCAGE et al., 2008).

O mel produzido pelas abelhas *A. mellifera* utilizando as espécies arbóreas do pasto apícola do estado de Roraima, na legislação brasileira seria classificado como mel de melato, pois possuem pasto apícola com predominância de espécies com nectários extraflorais (PEZENTE, 2011).

De acordo com a legislação, o mel de melato é o mel obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas. Assim sendo, o mel produzido nas áreas de savanas em Roraima é originado de nectários extraflorais e secreções de insetos sugadores (BRASIL, 2000).

No entanto Barth (2004) discorre que os méis de duas ou mais espécies de plantas, são chamados de méis poliflorais ou silvestres, podem ser produzidos pelo gênero *Apis* ou abelha nativa com propriedades diferenciadas, dependendo da espécie de abelha, fatores climáticos e o tipo de flora.

Os méis silvestres são considerados multifloral ou polifloral. Este mel é obtido por meio de diferentes origens florais (BRASIL, 2000). As vegetações isoladas e específicas (savana) de Roraima possuem identidade ecológica e florística própria (BARBOSA; MIRANDA, 2005). Portanto, o mel produzido pela flora existente em área de savana tem característica peculiar.

Pezente (2011) afirma que o néctar utilizado pelas abelhas para produção de mel em Roraima é provavelmente de nectários com altos teores de sacarose. Nos méis roraimenses analisados foram encontrados outros açúcares como: a frutose, seguido da glicose, maltose, erlose e melezitose. No período seco a cor do mel é na coloração âmbar escuro, principalmente nos meses de dezembro e janeiro é a época tradicionalmente mais seca no Estado. No período chuvoso as análises dos méis em Roraima demonstram características similares aos europeus, ou seja, ao mel floral.

Portanto, a escassez de estudos sobre o mel de região de savana localizada em Roraima, dificulta caracterizar a identidade deste alimento tão consumido. Se faz necessária a realização de mais estudos sobre a composição físico-química dos néctares das espécies arbóreas, utilizadas pelas abelhas para produção do mel.

1.4 Consumo do mel de Roraima

Pezente (2011) afirma que, a classificação dos méis de Roraima como melato culminou numa perda de mercado consumidor, pois na maior parte do mundo os méis de melato são considerados inferiores, do ponto de vista estético, aos méis florais. A pesquisa da autora é relevante, pois caracterizou o mel de Roraima, que é originário de nectário extrafloral da espécie *A. mangium*.

A perda de mercado por muitas vezes está relacionado à falta de conhecimento sobre “mel de melato”, o qual tem sua peculiaridade em relação ao mel floral. São diferentes nas suas propriedades físico-químicas, possui menor teor de açúcar, frutose, oligossacarídeos e de cinzas (matéria seca), maiores pH e teor de nitrogênio, segundo Campos et al. (2003).

A legislação brasileira referente a méis não contempla a flora de lavrado, pois foi baseado na legislação do mel britânico. O lavrado é um bioma específico de

Roraima. Portanto, o que vem diferenciar o mel desta região é sua característica de origem. Desta forma, a legislação em vigor, a Normativa 11/2000 – MAPA (BRASIL, 2000), não contempla as diversidades de flora e de habitats utilizados na produção do mel. A lei brasileira classifica os tipos de méis, dependendo de suas origens:

A legislação brasileira define mel como produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de secreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colméia. O mel pode ser classificado quanto à sua origem em mel floral ou mel de melato. O mel floral é obtido dos néctares das flores, e ainda pode ser classificado em: mel unifloral ou monofloral (quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possui características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias) ou mel multifloral ou polifloral (obtido a partir de diferentes origens florais). O mel de melato é formado principalmente a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (PÉRICO et al., 2011, p. 336).

Independente da classificação do mel de Roraima quanto a sua origem, verifica-se que não existe pesquisa focada para a caracterização micológica. Assim, os apicultores do estado, mesmo possuindo esse diferencial na origem do mel, não têm a certificação de qualidade, que é a forma de garantir a procedência desse produto. A certificação deve satisfazer os quesitos descritos pelas medidas legislativas, caso não sejam satisfatórios, possivelmente, o mel não atingirá os grandes mercados.

O trabalho realizado em mel no estado Roraima foi analisado somente contagens dos micro-organismos (fungos filamentosos e leveduras) e parâmetros físico-químicos como características glicídicas (PEZENTE, 2011). Estes resultados reforçam a importância do controle de toda a cadeia produtiva do mel, desde o campo até sua comercialização. Este trabalho torna-se pioneiro, pois caracterização micológica a nível taxonômico convencional associadas as técnicas moleculares para complementar a identificação de espécies que estão presente nos méis roraimenses.

1.5 Parâmetros de contaminação do mel

Segundo Aroucha et al. (2008), o mel é um alimento mundialmente consumido, por seu valor farmacológico, fonte de energia e um adoçante natural. O mel por ser alimento de origem animal, pode conter pesticidas. A aplicação de pesticida reduz a presença de polinizadores em áreas cultivadas, pois esses agrotóxicos, que são utilizados para matar pragas, fazem o mesmo com as abelhas. As abelhas são consideradas os principais polinizadores em ambientes naturais, além de serem diretamente responsáveis pela produção do mel.

O mel contaminado quando ingerido por criança com idade inferior a um ano pode resultar em sérios problemas à saúde, inclusive a morte. A doença ocorre pela intoxicação do homem com substâncias tóxicas produzidas e liberadas pelos micro-organismos (SENAI, 2009).

A contaminação microbiológica pode ser causada pela microbiota das próprias abelhas, devido ao cruzamento acidental de abelhas europeias e africanas. Os micro-organismos também podem ser introduzidos no mel pela própria abelha ou pela falta de higiene na extração e beneficiamento, que incluem pólen, néctar floral, poeira, terra e o próprio corpo e trato digestivo da abelha, além de fungos e algumas bactérias (LIEVEN et al., 2009).

O mel deve atender aos inúmeros critérios de qualidade e certificações, antes de sua comercialização e exportação, já que está sujeito a fraudes, adulteração e contaminação por manipulação inadequada (PIRES, 2011). Segundo Silva et al. (2008), esta contaminação pode estar associada à veiculação de micro-organismos pelas abelhas melíferas, podendo ocorrer contaminações antes, durante e depois da extração do mel, devido ao não utilização das BPA, as más condições dos equipamentos e ao armazenamento e acondicionamento deste produto.

É necessário o controle no processo de produção do mel desde o campo até a entrega do produto, para que as características do mel sejam preservadas, e controlados os riscos de contaminações para garantir um alimento seguro. Geralmente, a perda de qualidade do mel ocorre devido às falhas durante o processo de produção, extração e processamento do mel. A perda da qualidade do

mel não pode ser recuperada durante o seu processamento no entreposto de mel (SENAI, 2009).

De acordo com Felšöciová et al. (2013) ocorrem dois tipos de contaminações: fontes primárias onde os micro-organismos estão associados às abelhas, ao trato digestivo das abelhas, e incluem também o pólen, poeira, ar, solo e néctar; fontes secundárias, que são aquelas decorrentes da manipulação de mel por pessoas; estas incluem os manipuladores, contaminação cruzada, equipamentos e instalações. As fontes primárias de contaminação do mel são muito difíceis de controlar. Por outro lado, as fontes secundárias de contaminação podem ser controladas pelas boas práticas de fabricação.

Silva et al. (2008) destacam que as fontes primárias de contaminação microbiana no mel ocorrem antes da colheita e as fontes secundárias depois da colheita. De acordo com Pires (2011) o controle da qualidade da produção do mel é primordial, tornando-se fundamental, principalmente, as boas práticas de higiene por parte dos apicultores, bem como a utilização de local adequado para o manuseio e extração do mel.

A qualidade do mel é determinada pela sua composição principalmente nos parâmetros sensoriais, químicos, físicos e características microbiológicas. Dentre eles, a presença das leveduras e fungos presentes no mel que são inevitáveis, uma vez que as abelhas recolhem os micro-organismos juntamente com o néctar (FELŠÖCIOVÁ et al., 2013). Quando se trabalha com mel, podem ocorrer variações nas composições que interferem na qualidade do produto. Outros fatores que também intervêm são as condições climáticas, estágio de maturação, espécie de abelha, processamento e armazenamento, além do tipo de florada (SILVA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2004).

O controle de qualidade é uma etapa importante para que o produto seja comercializado com as suas propriedades naturais preservadas, com características que facilitem sua utilização e que tenha uma adequada conservação e apresentação (LACERDA et al., 2010). Sistemáticamente, apicultores e consumidores têm demonstrado grande preocupação com a qualidade e com constantes adulterações de amostras de méis (BARBOSA; LOPES; BARBOSA, 2007).

A característica *in natura* do mel favorece para que ocorram adulterações. Segundo Rossi et al. (1999) as adulterações podem acontecer com adição de caldo-

de-cana pelos manipuladores, que levam-no ao fogo para que seja “apurado”. Em relação à cor, a mistura é melhorada pela adição de iodo e aditivos químicos.

O mel de abelhas é um produto muito apreciado, no entanto, de fácil adulteração com açúcares ou xaropes. Dessa forma, é necessário que haja algumas análises para a determinação da sua qualidade para que seja comercializado. O mel é basicamente uma mistura complexa de açúcares altamente concentrada. A composição do mel depende de muitos fatores tais como: espécies colhidas, natureza do solo, raça de abelhas, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel e condições meteorológicas (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2005, p. 1167).

O mel é um alimento de valor nutritivo apreciado por seu sabor característico. Por este motivo, o preço é relativamente alto, o que também favorece a adulteração, que geralmente é feita através de adição de outros tipos de melato, como os de açúcares comerciais, derivados de cana-de-açúcar e milho (ARAÚJO; SILVA; SOUSA, 2006).

O mel, por apresentar pH ácido devido à umidade, atividade baixa da água, viscosidade elevada, concentração de açúcares e pressão osmótica alta, reúne condições que fazem com que seja um substrato pouco favorável ao desenvolvimento de micro-organismos. Quando ocorre adição de outros açúcares comerciais ou má higiene do local onde se processa o mel, esses fatores alteram o pH, a pressão e a concentração de açúcar reduzindo o tempo de vida do mel.

Os trabalhos realizados com mel para análise microbiológica por alguns autores como: Sereia et al. (2011), com amostras de méis orgânico de *A. mellifera*, Santos e Oliveira (2013), com amostras de méis de *A. mellifera* de entrepostos e Lieven et al. (2009) trabalhou com amostras de méis adquiridas no comércio formal (supermercados e farmácias) e informal (feiras e ambulantes). Os autores analisaram bactérias, leveduras e os fungos filamentosos, mas em relação aos fungos filamentosos e leveduras fizeram somente contagem das colônias, sem a identificação dos isolados, principalmente dos fungos filamentosos. Dado a escassez de informações referente à taxonomia, fazem-se necessárias pesquisas nesta área para verificar se os possíveis fungos presentes em amostras de mel são patogênicos ou produtores de toxinas.

Sereia et al. (2011) estudaram as principais fontes de contaminação e as condições higiênico-sanitárias de amostras de mel orgânico de *A. mellifera*, proveniente das Ilhas do rio Paraná. A luz dos parâmetros microbiológicos

estabelecido pela resolução do MERCOSUL - Grupo de Mercado Comum – GMC nº 15/1994 (MERCOSUL, 1994), aprovado pela Portaria nº 326/1997 (BRASIL, 1997). Esta legislação preconiza que o mel deve conter no máximo de $1,0 \times 10^2$ UFC/g de leveduras e bolores. Os resultados indicaram que as fontes de contaminação secundárias são as responsáveis pela redução da qualidade do mel orgânico.

Lieven et al. (2009), analisaram a qualidade microbiológica do mel comercializado formal e informalmente na região do extremo sul baiano, quanto à presença de coliformes totais, termotolerantes, bolores e leveduras. Para os padrões microbiológicos utilizaram a Instrução Normativa nº 11/2000 MAPA (BRASIL, 2000), que estabelece a identidade e qualidade de mel, estabelecendo um valor tolerável de $1,0 \times 10^2$ UFC/g, para bolores e leveduras e ausência ($<3,0$ NMP/g) para coliformes totais. As amostras não apresentaram contaminação por bactérias do grupo coliformes, no entanto oito amostras continham bolores e leveduras.

Santos e Oliveira (2013), analisaram os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de méis de *A. mellifera* provenientes de sete entrepostos localizados na região do Vale do Jaguaribe/Ceará. Quanto às análises microbiológicas, foram pesquisadas a presença de fungos filamentosos e leveduras (UFC g⁻¹), coliformes a 35 e 45°C (NMP g⁻¹) e *Salmonella* spp. As análises foram conduzidas segundo metodologias da American Health Association – APHA e para as análises físico-químicas foram adotados com os valores estabelecidos pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 2000). Os resultados indicaram que os méis avaliados apresentaram boa qualidade microbiológica, com ausência de coliformes a 35 e 45°C, *Salmonella* spp. e baixa contagem de fungos filamentosos e leveduras.

Montes et al. (2013) analisaram as características físico-químicas em amostras de méis de três grupos de abelhas nativas (*Melípona compressipes*, *M. subnitida* e *M. scutellaris*). A determinação das características físico-químicas (umidade, atividade de água hidroximetilfurfural, acidez e cor) seguiram os métodos preconizados pela legislação brasileira vigente, que se encontram descritos na Instrução Normativa nº11/2000 – MAPA (BRASIL, 2000). Para as análises microbiológicas avaliaram somente a ocorrência da bactéria *Salmonella* spp. A contagem das colônias dos fungos isolados do mel foi realizada com base no Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos – RDC Nº

12/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001). Os autores concluíram que a maioria dos parâmetros físico-químicos obtidos nas amostras apresentaram valores adequados para o consumo humano. As contagens fúngicas foram acima do recomendado pela legislação, demonstrando que o mel não se encontrava numa condição higiênica satisfatória.

Silva et al. (2013) analisaram 27 amostras de mel, produzidas em dez cidades do Estado do Pará por três espécies diferentes de abelhas (*A. mellifera*, *M. fasciculata* e *M. flavoneata*). Foram pesquisados os teores de elementos minerais (Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr e Zn) determinados via espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES). As análises físico-químicas (cor, umidade, densidade, pH, sólidos insolúveis e solúveis totais, cinzas, condutividade elétrica, índice de formol, acidez livre, HMF, açúcares redutores e totais e sacarose) foram analisadas de acordo com a Normativa nº11/2000, a Resolução MERCOSUL nº.15/1994 e a Codex Alimentarius Commission. Os resultados físico-químicos apresentaram-se de acordo com as legislações. Oito dos elementos estudados (As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr e Li) em nenhuma das amostras analisadas não foram detectados. K, Ca e Na foram os elementos mais abundante nos méis. Cu, Zn e Ni foi abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. Das 27 amostras o Cr foi detectada apenas em três amostras. Al, Mg, Mn e Sr foram detectados nas amostras da espécie *A. mellifera*.

Soares, Aroucha e Góis (2010) pesquisaram a qualidade físico-química de méis de flores silvestres provenientes de diferentes pontos comerciais no município de Apodi/RN, de acordo com Normativa nº 11/2000, referentes a parâmetros como os teores de umidade, acidez total, hidroximetilfurfural – HMF, açúcares redutores e sacarose aparente. Os resultados constataram que, o teor de umidade e HMF apresentaram-se acima do permitido pela legislação brasileira.

Komatsu, Marchini e Moreti (2002) analisaram as características físico-químicas e proteínas de três amostras de méis de origens florais (silvestres, eucalipto e de laranja) coletadas no Estado de São Paulo. Os resultados estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Decreto nº 30.691/1997 (BRASIL, 1997). Os valores para proteína não foram aceitáveis no conjunto de todas as amostras estudadas. No entanto, a legislação vigente não determina a

análise de proteína. A proteína do mel foi determinada seguindo-se o método do Laboratório de Controle de Qualidade do Instituto de Zootecnia, que adota a reação de Lund para determinação do referido parâmetro.

Barth et al. (2005) avaliaram a composição físico-química e palinológica de méis considerados monoflorais, produzidos na região Sudeste do Brasil. Esta análise visou reconhecer os tipos polínicos encontrados nas amostras de mel e, a partir dos resultados, chegarem às espécies vegetais que os produziram, bem como à vegetação de interesse apícola ao redor de um apiário. Os resultados obtidos mostraram que, os méis comercializados como monoflorais indicam incorretamente sua origem botânica, isso por que os padrões estabelecidos pela legislação brasileira não contemplariam alguns méis desta região.

Lopes et al. (2011) avaliaram as propriedades do efeito dos diferentes níveis de sombreamento das às colmeias e analisaram os parâmetros físico-químicos de amostras de méis, tais como a acidez, e teor de HMF de acordo com a Normativa nº11/2000. Os resultados mostraram que as coberturas influenciam no desenvolvimento das colônias e no índice de HMF.

Os parâmetros físico-químicos das amostras de méis, com base na Normativa nº 11/2000 (BRASIL, 2000) são analisadas por diversos pesquisadores, o que vem contribuindo para a melhoria e qualidade do mel. Tais resultados têm sido apresentados por: Sodré et al. (2003), que determinaram a umidade, cor, proteína, pH, acidez, índice de formol, condutividade elétrica, cinza, número de diastase, hidroximetilfurfural – HMF, açúcares totais, açúcares redutores, sacarose e tipos polínicos de 36 amostras de méis da Região Litoral Norte do Estado da Bahia e verificaram que, todas se encontravam dentro do limite permitido pela norma vigente (BRASIL, 2000); Silva, Queiroz e Figueirêdo (2004) analisaram a umidade, HMF, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, acidez livre, sólidos insolúveis em água, atividade diastásica, e o pH. Os resultados foram satisfatórios para todas as amostras analisadas de méis de *A. mellifera* L. produzidos no Estado do Piauí, as quais estavam dentro dos padrões exigidos pelas Instruções na Normativa nº 11/2000 (BRASIL, 2000).

Alves et al. (2005) analisaram as amostras de mel da abelha *Melipona mandacaia* provenientes do município de São Gabriel do Estado da Bahia. Os parâmetros analisados foram: umidade, HMF, açúcares redutores, sacarose

viscosidade, condutividade elétrica, pH, acidez, índice de formol e a cor. A maioria dos parâmetros físico-químicos apresentou valores médios adequados para o consumo humano. Dentre as características, apenas o teor de umidade encontrava-se fora dos padrões definidos pela legislação, que trata da definição do mel (BRASIL, 2000).

Bera e Almeida-Muradian (2007) realizaram um estudo de algumas características físico-químicas (umidade, HMF, açúcares redutores, sacarose aparente, proteínas, reações de Fiehe, Lugol e Lund) do mel com própolis, com o intuito de verificar possíveis adulterações em amostras comerciais do Estado de São Paulo, com base nos parâmetros referentes à legislação (BRASIL, 2000). Os resultados obtidos nas análises das amostras indicaram que todas continham mel verdadeiro e que não houve indícios de adulteração do produto com água, amido ou açúcar comercial.

Aroucha et al. (2008) analisaram amostras de méis nas feiras do município de Mossoró – RN, quanto à cor, umidade, acidez total, açúcares redutores, sacarose aparente e atividade diastásica. As 19 amostras apresentaram-se dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000), no que se refere ao teor de umidade, açúcares redutores, cor e atividade diastásica. Apenas uma amostra apresentou sacarose aparente fora do padrão estabelecido para mel floral, podendo ser comercializada como mel de melato. A acidez total das 19 amostras de méis analisadas 10 apresentaram dentro do padrão exigido pela legislação brasileira máximo de 50 meq/kg.

Evangelista-Rodrigues et al. (2005) realizaram análises físico-químicas dos méis de *A. mellifera* e *Melipona scutellaris* provenientes dos estados da Bahia e da Paraíba, relacionadas a umidade, HMF, cinzas, acidez total e sólidos insolúveis em água. Concluíram que, os méis produzidos pelas abelhas africanizadas (*A. mellifera*) e pela abelha nativa *M. scutellaris* apresentam valores diferentes dos padrões do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (BRASIL, 2000) para alguns parâmetros, o que pode dificultar o seu armazenamento por um longo período, pois o alto teor de água do produto diminui a sua vida útil de prateleira.

Vale ressaltar que os pesquisadores, utilizam diferentes métodos para verificar os parâmetros de contaminação no mel como Mercosul n° 15/1994

(MERCOSUL, 1994), Normativa nº 11/2000 MAPA (BRASIL, 2000), Decreto nº 30.691/1997 (BRASIL, 1997), American Health Association – APHA e Codex Alimentarius Commission. Observa-se que não existe uma legislação específica para estabelecer os parâmetros da qualidade do mel no Brasil. É relevante analisar as características microbiológicas do mel, pois estão relacionadas principalmente a identidade e a qualidade do mel.

1.5.1 *Contaminantes microbiológicos*

Todo alimento que é manipulado oferece risco à saúde. As características microbiológicas do mel estão relacionadas à qualidade e a segurança deste alimento. Os micro-organismos de importância primária são as leveduras, fungos filamentosos e bactérias formadoras de esporos. Estes micro-organismos podem estar envolvidos em atividades de deterioração do mel, produção de toxinas e produção de enzimas, podendo causar intoxicação quando consumido.

Durante a extração do mel, as fontes de contaminação podem estar relacionadas com a manipulação incorreta, uso de materiais mal higienizados, locais inadequados pela incidência do vento, presença de insetos e permanência de animais domésticos e de estimação (SILVA et al., 2008). A respeito deste fato, os fatores externos podem influenciar negativamente na qualidade final, entre eles destaca-se a higiene das áreas no entorno do apiário (MATOS et al., 2011). Para garantir uma boa qualidade do produto, os apicultores têm que averiguar todas as etapas do seu processamento.

Além das atividades de deterioração do mel, os fungos filamentosos podem acarretar inibição de outros micro-organismos competidores. Quando ocorre qualquer alteração no mel, o crescimento anormal desses micro-organismos é estimulado. Silva et al. (2008) corroboram que a qualidade e a segurança no consumo do mel estão relacionadas com as características microbiológicas, podendo ser controlada todas as etapas do processamento a fim de garantir um produto de maior qualidade para a comercialização.

Pontara et al. (2012) avaliaram a qualidade físico-química e microbiológica do mel produzido por abelhas *A. mellifera* africanizadas, a partir de flores de mandioca. Realizaram análises de pH, sólidos solúveis totais (SST), acidez,

umidade, açúcares redutores e totais, sacarose aparente, hidroximetilfurfural, cor, cinzas, proteínas, sólidos insolúveis em água, atividade diastásica, teor de minerais e monitoramento dos teores de ácido cianídrico (HCN), além de avaliações microbiológicas. O grupo coliformes, bolores e leveduras foram analisados de acordo com Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2003) e o Regulamento técnico MERCOSUL de identidade e qualidade do mel (MERCOSUL, 1994). As amostras analisadas apresentaram características físico-químicas e microbiológicas favoráveis à comercialização. Os autores somente fizeram contagem de colônias e verificaram que os bolores e leveduras mostraram crescimento inferior a 10 UFC/g.

Silva et al. (2008) avaliaram a qualidade microbiológica de méis obtidos diretamente de apicultores e provenientes de entrepostos registrados no Serviço de Inspeção Federal - S.I.F./Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Estado de Minas Gerais. Os pesquisadores analisaram os coliformes totais, coliformes termotolerantes, fungos filamentosos e leveduras. O mel de *A. mellifera* apresentou uma flora microbiana própria, que inclui, entre outros microorganismos, fungos do gênero *Penicillium* e *Mucor* e alguns gêneros de leveduras tolerantes a altas pressões osmóticas. Os resultados obtidos, referente à contaminação por fungos filamentosos e as leveduras, foram superiores nas amostras provenientes da produção de pequenos apicultores, quando comparado a contagem dos méis provenientes de entrepostos. Porém, apiários e entrepostos trabalharam fora das Boas Práticas de Fabricação

O objetivo de Alves et al. (2009) foi caracterizar a microbiota de amostras de mel orgânico de *A. mellifera* africanizada, coletadas nas ilhas Floresta e Laranjeira do alto rio Paraná, para verificar se estavam em conformidade com a legislação vigente, a Resolução do MERCOSUL nº 15/1994 e as normas internacionais de acordo com Scott, Clavero e Troller (2001). Determinaram a presença de coliformes a 35°C e 45°C e quantificaram bolores e leveduras. Concluíram que todas as amostras apresentaram-se em conformidade com o Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Mel.

Souza et al. (2009) avaliaram a qualidade microbiológica do mel produzido por espécies de abelhas sem ferrão (Trigonini) no Estado da Bahia. As análises microbiológicas foram realizadas seguindo as normas de Scott, Clavero e Troller

(2001). Nestas análises foram realizadas a contagem padrão de bolores e leveduras e a presença de coliformes a 35°C e 45°C nas amostras de méis. Concluíram que das quatorze amostras de méis de trigoníneos analisadas, metade apresentou contagem padrão de bolores e leveduras acima do máximo previsto na regulamentação brasileira para alimentos; nenhuma das amostras foi positiva para presença do grupo coliforme.

As pesquisas de Alves et al. (2009) com amostras de méis de *A. mellifera* das ilhas Floresta e Laranjeira do alto rio Paraná e Souza et al. (2009), com mel produzido por espécies de abelhas sem ferrão (Trigonini) do estado da Bahia, objetivaram a quantificação de micro-organismos no mel, o que constitui um dos principais critérios de qualidade do produto de acordo com a legislação (MERCOSUL, 1994). Mas, quando se refere ao consumo humano, estes critérios podem não ser suficientes para garantir a segurança no consumo deste alimento. A quantificação aliada à identificação e a determinação da microbiota no mel revestem-se de importância para o estabelecimento e a análise dos riscos destes fungos filamentosos ao homem. Além disso, é importante esclarecer sobre a origem dos micro-organismos, principalmente os fungos e leveduras, naturalmente associados às abelhas, representando uma microflora não patogênica, que ocorre somente quando o mel é puro.

Pires (2011) avaliou a qualidade do mel de abelhas *A. mellifera* produzido no Piauí. As amostras foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, tais como: umidade, atividade de água, pH, acidez, cor, HMF, pesquisa de *Salmonella* spp., NMP.g-1 de coliformes a 35°C e 45°C, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, contagem padrão de bactérias heterotróficas mesófilas e fungos filamentosos e leveduras. As amostras não apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., coliformes a 35°C e 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva. Verificou-se a presença dos gêneros fúngicos *Aspergillus* spp. e seus telemorfos, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Byssosclamyces* spp. e *Curvularia* spp.; e das espécies *Aspergillus flavus*, *A. niger* e agregados, *Penicillium citreonigrum*, *P. decubens*, *P. waskmani*, *P. restrictum*, *P. implicatum*, *P. islandicum* e *P. felutanum*, nas amostras. Estes resultados reforçam a necessidade do controle de boas práticas apícolas pelos apicultores, que devem abranger as

atividades de manejo ao longo da criação das abelhas, a extração do mel e o armazenamento deste alimento, para assegurar a qualidade do mel produzido.

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são indesejáveis, porque algumas espécies são capazes de produzir enzimas deterioradoras e produtoras de micotoxinas. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* produzem a micotoxina ocratoxina, que são conhecidas por causarem os efeitos tóxicos, particularmente no sistema renal. As fumonisinas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium* e atingem os órgãos como rins, fígado e esôfago (BANDO et al., 2007).

De acordo com Sodré et al. (2007), os micro-organismos presentes em uma colmeia podem ser aqueles comumente encontrados no mel. Os fungos são trazidos pelas abelhas para a colmeia. Alguns deles não sobrevivem quando o néctar é transformado em mel. Santos et al. (2011) discorrem que outros micro-organismos podem resistir e se multiplicar, podendo causar a fermentação do alimento, com produção de numerosos subprodutos que alteram o paladar e o aroma do mel. Algumas alterações podem acontecer devido à falta de informação quanto à extração, a forma de manejo adequado, equipamentos a serem utilizados e, principalmente, armazenamento e conservação (CORDEIRO et al., 2012).

Felšöciová et al. (2013) analisaram nove amostras de méis poloneses e obtiveram 50 isolados, dentre eles: *Alternaria spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Mycelium steriliun*, *Penicillium brevicompactum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. polonicum* e *Rhizopus spp.* Desses isolados, 33 são do gênero *Penicillium*, grupo que se apresenta como um potencial produtor de micotoxinas. Desta forma, é relevante que se faça identificação de fungos filamentosos presentes no mel, pois as micotoxinas têm importância como contaminantes em alimentos humanos.

Martins, Martins e Bernardo (2003) concluíram que das 80 amostras de méis analisadas, provenientes de mercados públicos de varejo, na cidade de Lisboa/Portugal. Das 81 amostras 46 estavam contaminadas com bolores tais como: *Mucor sp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* e por leveduras *Candida humicola*, *Saccharomyces sp.* Portanto, são necessários mais estudos sobre as características micológicas do mel, uma vez

que esses resultados são significantes, quando se trata de adulteração e do risco considerável em termos de saúde pública.

1.5.1.1 *Fungos filamentosos de alimentos*

Os bolores ou morfos são fungos filamentosos que crescem na forma de uma massa disforme que se espalha rapidamente no alimento (JAY, 2005). Os fungos filamentosos são encontrados praticamente em todos os lugares. Estes fungos formam hifas, e os conjuntos de hifas formam os micélios. O micélio tem a função de fixação e reprodução pelo aspecto característico das colônias que se formam (CARVALHO, 2010).

Jay (2005) discorre que os fungos filamentosos de maior importância nos alimentos reproduzem-se por ascósporos, zigospóros ou conídios. Os fungos filamentosos são denominados de fungos conidiais ou imperfeitos, que significa o estado anamorfos. Estes micro-organismos se reproduzem assexuadamente através da produção de conídios, formados por estrutura chamada de conidióforo, que foi originada a partir das hifas (CASTRO; GUTIÉRREZ; SOTÃO, 2012).

As características micológicas do mel estão relacionadas principalmente a qualidade e a segurança deste produto. O mel é um alimento que pode ser fluido ou sólido, a temperatura na qual o mel “amadurece” na colmeia e o conteúdo da água, no interior das colmeias é de 35°C. Para que não ocorra contaminação e manter preservadas as propriedades do mel, deve-se trabalhar com mel próximo a esta temperatura desde manejo ao processo da extração até o envasamento do mel em recipientes (MARCHINI et al., 2005). Outros fatores que favorece a contaminação e fermentação nos méis são quando colhem os méis “verdes”, ou seja, colhidos antes de serem operculados pelas abelhas (MERABET, 2011).

Alguns gêneros de fungos filamentosos produzem micotoxina. Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina. Algumas dessas substâncias possuem capacidade mutagênica e carcinogênica, enquanto outras apresentam toxicidade específica a um órgão ou são tóxicas por outros mecanismos (JAY, 2005).

De acordo com FIB (2011) os fungos filamentosos podem também ser responsáveis por doenças alimentares, pois algumas espécies de fungos são capazes de produzir toxinas fúngicas, na superfície dos alimentos. Nomeadamente, naquelas situações em que as condições de conservação e armazenamento estejam inadequadas. Portanto, o crescimento de fungos filamentosos encontrados em alguns méis, ocorre quando o mel absorve umidade em sua superfície, em função de armazenamento inadequado (MENDES et al., 2009).

Os fungos estão presentes nos alimentos principalmente do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Penicillium* estão inseridos no grupo dos Deuteromycotas denominados de fungos conidiais. O gênero *Mucor* pertencente ao grupo Zygomycota, as espécies podem ser encontradas no solo esterco, frutas, vegetais, grãos e outros alimentos (JAY, 2005; SIQUEIRA, 1995).

As espécies dos gêneros *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus* são encontradas em mel. Estas não necessariamente se reproduzem, quando o mel é puro. Assim, o número elevado desses micro-organismos indicam contaminação pelo ambiente da abelha, colmeia ou equipamento de processamento do produto (SNOWDON; CLIVER, 1996).

A ocorrência de algumas espécies de fungos em alimentos tem servido de alertar para o risco de contaminação com micotoxinas, contribuindo para a perda de qualidade do produto e prejuízos á saúde dos seres humanos (SILVA et al.,2007). Cerca de 300 micotoxinas já foram estudadas, contudo, as toxinas mais conhecidas e encontradas em alimentos causando danos ao consumidor são as toxinas aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina, rubratoxinas, esporodesminas, ácido ciclopiazônico e micotoxinas tremorgênicas (SCUSSEL; RODRIGUEZ-AMAIA; SILVA,1983).

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são mais frequentes em mercadorias e alimentos armazenados. Enquanto o gênero *Fusarium* é patogênico para plantas, podendo produzir micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (SWEENEY; DOBSON, 1998). As espécies do gênero *Cladosporium* são saprófita e algumas deterioram alimentos e frutas (JAY, 2005).

As micotoxinas são produzidas principalmente pelos gêneros de fungos, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As espécies do gênero *Aspergillus* produzem aflatoxinas (LACAZ et al., 2002; Pitt; Hocking, 2009). As aflatoxinas são metabólitos

secundários sintetizados por fungos, principalmente do gênero *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (SILVA et al, 2007). Tais toxinas têm se mostrado como hepatotóxicas e hepatocancerígenas para homens e animais (LACAZ et al., 2002).

As espécies do gênero *Penicillium* produzem patulina (os efeitos lesivos são cardiotoxicidade e neurotoxicidade), rubratoxina (cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade) e citrinina (lesões no fígado). A patulina, outro metabólito carcinogênico é produzida por diferentes espécies de gêneros *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Gymnoascus* e *Paecilomyces* (LACAZ et al., 2002).

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* produzem a micotoxina denominada de ocratoxina A. Esta toxina é produzida por fungos encontrados durante a estocagem, as espécies que produzem a ocratoxina são: *A. ostianus*, *A. mellus*, *P. viridicatum*, *P. cyclopium* e *P. variable*. O seu efeito são hepatotóxico, nefrotóxico, teratogênico e carcinogênico (; LACAZ et al., 2002).

Outra micotoxina com propriedades tóxicas acentuadas é o ácido fusárico. Possivelmente, uma das micotoxinas mais encontrada na natureza uma vez que é produzida pela maioria das espécies do gênero *Fusarium*. O ácido fusárico possui a capacidade de aumentar a toxicidade de outras micotoxinas (SANTIN et al., 2000).

A contaminação de alimentos por micotoxinas é um assunto que tem sido relatada no mundo todo, principalmente em alimentos susceptíveis ao crescimento fúngico. O efeito de uma micotoxina no organismo animal ou humano depende da dose e da quantidade com que é ingerida, pode ser agudo (letal ou não) ou subagudo (MAZIERO; BERSOT, 2010).

1.5.2 Importância da caracterização micológica

Os fungos filamentosos são micro-organismos que estão presentes em todos os ambientes, e podem contaminar diversos alimentos, deteriorando-os e alterando seu valor nutricional. O crescimento de fungos é determinado por vários fatores, entre os quais, destacam-se: os teores de umidade, dano provocado por insetos, temperatura e tempo de armazenamento do produto; em alguns casos, podem causar dano à saúde pública (VECCHIA; CASTILHOS-FORTES, 2007).

Os fungos protagonizam uma série de reações químicas, que servem ao armazenamento e ao consumo de energia para atividades biológicas. Um dos

produtos deste metabolismo são as micotoxinas. Dependendo da quantidade de toxinas ingerida por alimento contaminado, estas podem causar doenças denominadas de micotoxicoses, independente da presença do fungo (PUTZKE; PUTZKE, 2002). Segundo Keller et al. (2005) há numerosas espécies fúngicas reconhecidas como produtoras de uma ou mais toxinas. Alguns gêneros de fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* podem causar sérios riscos à saúde, devido ao fato de algumas espécies serem produtoras de micotoxinas, as quais têm atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica (STELATO et al., 2010). É importante deixar claro que nem todos os fungos filamentosos de um gênero ou espécie produzem micotoxinas, e mesmo a presença de fungos produtores não implica em presença da toxina, já que está depende de condições biológicas e ambientais favoráveis (OGA et al., 2008).

Os esporos de leveduras, fungos e bactérias encontradas no mel, são provenientes do intestino das abelhas e do néctar que é fonte primária de alimentação das abelhas. Estes também podem contaminar o mel durante o processamento, por estarem sempre presentes no ar. Existe um grande interesse na microbiota do mel para a biotecnologia, principalmente para a fabricação de remédios e de cosméticos. Embora estes micro-organismos quando o mel não é adulterado não crescem, os fungos e leveduras podem continuar presente no mel e serem transportados para um novo produto, no qual o mel é usado como ingrediente, e se multiplicarem até deteriorar este produto (SNOWDON, 1996).

A relevância de caracterizar o mel é devido às informações benéficas a saúde, desta forma vem aumentando o consumo deste produto, sendo considerado o de maior comercialização. Embora seja um produto que, por suas características físicas e químicas, apresente elevado grau de resistência diante da proliferação de micro-organismos, a ação de fatores externos, como ambientais, condições de manipulação e estocagem, pode influenciar negativamente em sua qualidade final (LIEVEN et al., 2009).

As contaminações de alimentos podem ocasionar riscos à saúde, de acordo com Andrade e Nascimento (2005) um dos fatores de risco para a saúde é a contaminação dos alimentos por fungos e outros micro-organismos. A preocupação com a qualidade do mel produzido no estado de Roraima tornou-se relevante, assim como o conhecimento dos fungos filamentosos. A contaminação dos alimentos se

inicia na produção da matéria-prima e se estende às etapas de transporte, recepção, armazenamento. É necessário, porém, estar informado da procedência do mel, se há fiscalização e se este se encontra nos padrões de higiene exigidos pelo Ministério da Agricultura. Sabe-se que ainda há extração do produto de forma artesanal, possibilitando a contaminação microbiológica acima do admissível, causando danos à saúde e desqualificando o produto (LIEVEN et al., 2009).

Nesse sentido, a caracterização do mel de melato proveniente de acácia é importante como parte de uma estratégia de valorização desse produto, de identidade regional, podendo agregar valor ao mesmo. Segundo Campos et al. (2013) o mel de melato, sendo uma ocorrência natural, precisa ser caracterizado e identificado para que seja possível haver um controle sobre a qualidade deste alimento. É preciso estar cauteloso com o mercado consumidor para que haja uma boa aceitação, principalmente pelo mercado externo que é mais exigente, inclusive o do Mercosul.

Estudar e conhecer a microbiota destes alimentos principalmente os fungos filamentosos, sendo importante ressaltar que a quantificação fúngica aliada com a identificação é uma forma para garantir a qualidade micológica do mel. Segundo Mazaro et al. (2014) é evidente a necessidade e a importância de fiscalizar o mel, a fim de identificar possíveis riscos de contaminação desse produto. Essa fiscalização garante à população o consumo de um alimento saudável, livre de elementos que possam causar danos à saúde.

Por isso, o mel tem que ser estudado a fim de se estabelecer a sua origem: floral ou melato. A legislação vigente, exige que no rótulo esteja discriminado méis de melato ou nas misturas de mel floral e mel de melato (CAMPOS et al., 2013).

1.5.2.1 *Identificação dos fungos filamentosos*

O método de microcultivo em lâmina preserva a integridade das estruturas fúngicas e proporciona o estudo detalhado da disposição de estruturas ao longo das hifas. Disserta Lacaz et al. (2002, p. 955), “o cultivo em lâmina permite demonstrar, ao exame microscópico, a morfologia dos fungos, tornando possível a visualização correta de suas estruturas”. Para identificação e classificação dos

fungos filamentosos são observados os tipos de conídios e conidiogênese (o processo de formação do conídio). Os conidióforos que possuem uma ou mais células conidiógenas. Outras estruturas auxiliam na distinção taxonômica, tais como, esclerócio e clamidósporo, ditas de resistência, quando são produzidas podem ser usadas para identificar fungos deuteromicetos, são classificados como mitospóricos ou imperfeitos e são caracterizados por reproduzir assexuadamente (GUARRO; GENÉ, STCHIGEL, 1999). As hifas, que são longos filamentos que sustentam o corpo dos fungos, podendo ser pigmentados, septados ou não e os ascósporos são importante para diagnóstico de gênero e espécie (LACAZ et al., 2002).

O método de microcultivo em lâmina é rápido e de baixo custo, mas requer experiência do pesquisador, pois se prende essencialmente as características morfológicas macroscópicas e microscópicas. Estas características dificultam a identificação de espécies ou mesmo de alguns gêneros de fungos, pois esses micro-organismos apresentam modificações na estrutura morfológica, devido do tipo de meio de cultura, a temperatura e a umidade.

1.5.3 Identificação Molecular

As características morfológicas dos fungos são, são métodos trabalhosos, demorados e muitas vezes, fornecem resultados taxonômicos insuficientes para identificar até nível de espécie (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999). Em contraste, outra ferramenta aliada para a identificação taxonômica são os métodos moleculares, segundo Varo et al. (2007). Estes métodos complementam o processo de identificação, mas ainda é um recurso custoso e necessita de profissionais especializados. Esta técnica viabiliza uma correta análise taxonômica, pois a identificação é feita em comparação com um banco de dados universal. O uso de técnicas moleculares na identificação convencional de fungos filamentosos é cada vez mais acessível e visa, principalmente, a análise de genes que codificam o DNA ribossômico (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

A Biologia Molecular é uma linha de investigação, com aplicações à sistemática dos fungos, inclusive com o estudo da análise sequencial dos nucleotídeos de grandes subunidades de ácido desoxirribonucléico ribossômico

(rDNA) desses micro-organismos (LACAZ et al., 2002). A técnica de PCR é utilizada para a detecção de micro-organismos patogênicos ou toxigênicos em vários substratos, incluindo alimentos (FACH et al., 1995). De acordo com Fungaro (2000), a utilização da PCR para caracterização de fungo filamentoso é possível devido à utilização do Espaço Interno Transcrito (ITS) do rDNA, que são áreas variáveis possibilitando a distinção morfológica entre as espécies desses micro-organismos. Lupatini, Mello e Antonioli (2008, p. 2678) explicam que:

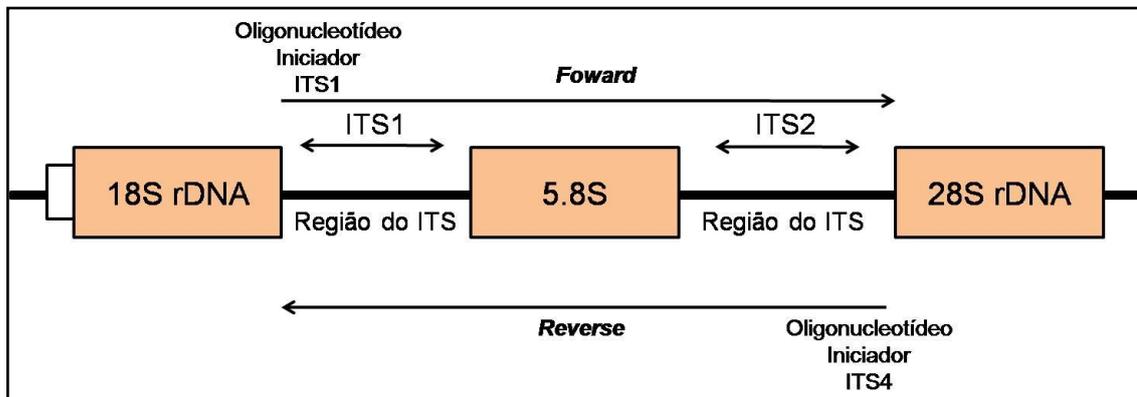
Existem muitas cópias de rDNA, como 18S, 5.8S, 28S, as quais são arranjadas por espaços não codificados. As seqüências (sic) codificadas do rDNA são altamente conservadas entre espécies de fungos. A diferenciação genética entre populações de uma espécie constitui o primeiro estágio da divergência evolutiva. Essa diferenciação resulta, na maioria dos casos, da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita sobre a variabilidade preexistente na espécie.

Os genes 18S, 5,8S e o 28S, são separados por regiões denominadas de Espaço Interno Transcrito ITS1 e ITS2 (figura 1), as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico. A região 18S é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. O gene 5,8S é altamente conservado, sendo uma ferramenta valiosa no estudo de relações genealógicas, pois este gene é igual em todos os fungos. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies (FUNGARO, 2000).

As regiões ITS do rDNA, são regiões variáveis dentro de uma mesma espécie, podendo ser utilizadas para o estabelecimento de relações filogenéticas e distinções, sendo assim, regiões apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades entre elas (FUNGARO, 2000; SANTOS et al., 2013).

A identificação molecular em nível de espécie tem sido baseado nos oligonucleotídeos iniciadores universais nos fungos *forward* ITS1 e *reverse* ITS4, sendo os mais comumente utilizados na amplificação desta região (White et al., 1990) e para o sequenciamento do material genético utiliza-se a metodologia de Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

Figura 1 - Representação esquemática da região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2.



A região ITS é escolhida para identificação dos micro-organismos em níveis específicos, devido ao seu alto grau de variabilidade ribossômica (ANDERSON; CAIRNEY, 2004). Estas regiões são relativamente curtas, com cerca de 500 a 800 pares de bases, e por aparecem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam amplificadas, usando-se os oligonucleotídeos iniciadores universais e sequenciadas facilmente. Devido a isto, é amplo o número de sequência ITS de diferentes fungos, disponíveis nos bancos de dados de sequência de nucleotídeos (MICHAELSEN et al., 2006). A região ITS evolui mais rapidamente e varia entre diferentes espécies dentro de um gênero, auxiliando na confirmação da identidade taxonômica dos fungos filamentosos (CHEN et al., 2000). Ou seja, contém sequências intraespecíficas e altamente conservadas, mas variáveis entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção ao nível específico, ou seja, a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos (FUNGARO, 2000).

Para identificação dos fungos filamentosos são utilizados programas computacionais que permitem a comparação das sequências deste micro-organismos (LUPATINI; MELLO; ANTONIOLLI, 2008). Portanto, amplificação de regiões específicas do genoma do rDNA por meio da PCR de regiões específicas do genoma aliada ao método convencional, fundamentam a identificação taxonômica dos isolados que serão obtidos do mel de Roraima

1.6 Parâmetros legais de qualidade do mel

A atual legislação brasileira, Normativa nº 11/2000 – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2000), regulamenta o padrão de qualidade e identidade do mel; contempla os parâmetros e estabelece medidas legislativas do mel antes de ser comercializado. Verifica-se que a legislação vigente (BRASIL, 2000) não contempla as características microbiológicas para mel.

A Legislação Brasileira (sic), através da Instrução Normativa n. 11 de Outubro de 2000, regulamenta o padrão de qualidade e identidade do mel comercializado estabelecendo limites que servem para excluir os méis que sofreram algumas práticas de adulteração ou processamento inadequado. Como teor de umidade, hidroximetilfurfural, açúcares redutores, sacarose aparente, acidez livre, atividade diastásica, sólidos insolúveis em água, minerais e proíbe o uso de corretivos de acidez, corantes, aromatizantes, espessantes, conservadores e edulcorantes de qualquer natureza, sejam eles naturais ou sintéticos (AROUCHA et al., 2008, p. 212).

O padrão microbiológico exigido pela Portaria nº 367 de 04/09/1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) foi revogado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel, disposto na Normativa nº 11/2000, que abrange os parâmetros de qualidade do mel, com requisitos voltados para a qualidade físico-química. Nesta mesma Normativa, quando se verifica os critérios macroscópicos e microscópicos no mel, observa-se que o produto não deve conter substâncias estranhas, de qualquer natureza, tais como insetos, larvas, grãos de areia e outros.

O mercado consumidor tem atualmente a preocupação de adquirir um produto livre de contaminação (GOIS et al., 2013). Embora a caracterização físico-química venha sendo amplamente pesquisada, há poucos trabalhos referentes à caracterização micológica. Além disso, a caracterização também serve para a certificação, valorização e comercialização do mel.

Quando se refere às análises micológicas, os pesquisadores utilizam instrumentos como o Decreto nº 30.691/1997 (BRASIL, 1997), que é o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. O artigo segundo desta legislação deixa claro que ficam sujeitos a inspeção e reinspeção previstas neste Regulamento os animais de açougue, a caça, o

pescado, o leite, o ovo, o mel e a cera de abelhas e seus produtos e subprodutos derivados.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001), estabelece como requisitos os padrões microbiológicos sanitários para alimentos e os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano.

Outra legislação brasileira específica para mel, estabelecendo parâmetros físico-químicos deste alimento, é preconizada pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel, de acordo com a Instrução Normativa 11, de 20 de Outubro de 2000 – MAPA (BRASIL, 2000), atualmente em vigor. Este instrumento, não contempla os parâmetros microbiológicos. Seu objetivo é estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que o mel destinado ao consumo humano direto deve cumprir.

Além da legislação nacional, há a Resolução internacional, MERCOSUL nº 15/1994 (MERCOSUL, 1994), que envolve quatro países: Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. No ano de 2009 foi aprovada a entrada da Venezuela no MERCOSUL (GOLDZWEIG, 2013). Hoje o MERCOSUL está integrado pela República Argentina, a República Federativa do Brasil, a República do Paraguai, a República do Uruguai e a República Bolivariana da Venezuela. A Resolução MERCOSUL nº 15/1994 é instrumento que estabelece a quantidade mínima e máxima de unidade formadora de colônias de fungos e leveduras presentes no mel.

Quando se fala em legislação internacional, não se pode deixar de discorrer sobre os critérios de ocorrência de micro-organismos e os parâmetros de qualidade físico-química presente no mel, que são especificados no *Codex Alimentarius Commission* (BOGDANOV et al., 1999). O *Codex Alimentarius Commission* estabelece parâmetros de qualidade físico-química do mel de abelhas melíferas que estão divididos em três grupos, como indicadores de maturidade, de pureza e de deterioração, que auxiliam na detecção de possíveis falhas no processo produtivo (CAC, 2014).

Em resumo, o Brasil quando se refere a legislação apícola, principalmente para análise micológica, foi revogar a Portaria nº 367, de 4 de setembro, que

aprovou a Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, sendo o Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do Mel. Outra ferramenta extremamente eficaz para assegurar a qualidade do mel, é o Regulamento Técnico Mercosul "Identidade e Qualidade do Mel" (MERCOSUL/GMC/RES nº 15/1994) entre os países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai e Venezuela). A legislação brasileira não é adequada às necessidades das características dos parâmetros microbiológicos e outros parâmetros referentes às origens da flora, que muitas vezes são peculiares a cada região. A resolução vigente (Normativa nº 11/2000) não preconiza a diversidade de floras existente no Brasil, e contempla somente os parâmetros físico-químicos do mel produzido pelo gênero *Apis* de origem floral.

2 OBJETIVOS

Esta pesquisa tem como foco analisar micologicamente os méis roraimenses e possui os seguintes objetivos:

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os fungos filamentosos presentes em amostras de méis produzidos em Roraima visando à segurança alimentar deste alimento.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a frequência dos fungos filamentosos das amostras de méis;
- ✓ Identificar os fungos filamentosos isolados;
- ✓ Relacionar quantitativamente os fungos filamentosos identificados, com os critérios estabelecidos pelo Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Mel.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para contagem e isolamento dos bolores e leveduras, as amostras dos méis foram submetidas à diluição seriada. Os fungos filamentosos foram agrupados e identificados por meio da técnica do microcultivo em lâminas e por métodos moleculares; as leveduras foram somente quantificadas. Os fungos filamentosos foram preservados, pelo método de Castellani e em tubos com meio Sabouraud inclinado. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular, do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – PRONAT da Universidade Federal de Roraima - UFRR e os isolados foram depositados na Coleção de Cultura do Centro de Estudos da Biodiversidade - CBio da instituição.

3.1 Localização das áreas de estudo

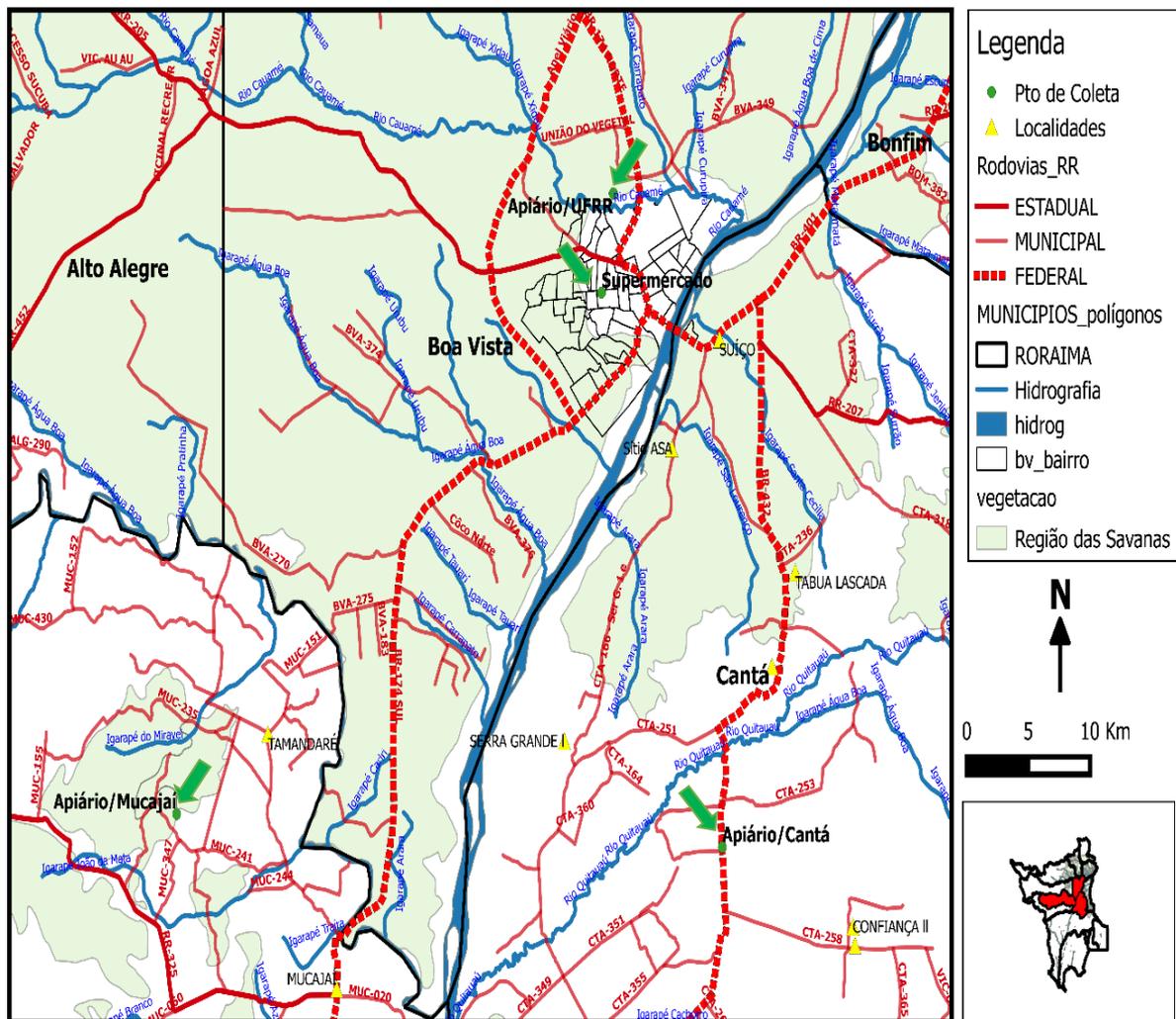
As coletas foram realizadas no período chuvoso (PC), que ocorreu nos meses de maio a agosto de 2014, e no período seco (PS) que abrangeu os meses de setembro de 2014 a fevereiro de 2015. Os locais foram o Apiário Experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Roraima, localizado no Campus do Cauamé, bairro do Monte Cristo em Boa Vista, Roraima, nas coordenadas 02° 52' 179'' N e 60° 42' 969'' W. O Apiário do Cantá localizado via BR 401 – BR 432 no município de Cantá/RR nas coordenadas geográficas 02° 31' 11,33'' N e 60° 38' 11,90'' W. O Apiário de Mucajaí localizado na vicinal Franco Tamandaré a 21,6 Km da BR 174 no município de Mucajaí/RR nas coordenadas geográficas 02° 32' 15,06'' N e 61° 02' 05,41'' W. A Marca Comercial/supermercado localizado no município de Boa Vista/RR nas coordenadas geográficas 02° 48' 59,35'' N e 60° 43' 29,09'' W (Figura 2).

3.1.1 Amostragem

O critério amostral focam os maiores produtores de mel no estado de Roraima (figura 3) que abastecem o mercado local. Foram analisadas amostras de méis dos municípios de Boa Vista/RR (A1 e A2), Cantá/RR (A3) e Mucajaí/RR (A4).

Cada coleta foi realizada em duplicata, contabilizando-se 16 amostras de méis, sendo oito amostras no PC e oito amostras no PS, das 16 amostras, quatro foram obtidas pela compra direta no mercado local, de mel com registro de Serviço de Inspeção Federal (S.I.F) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As amostras comerciais de mel foram adquiridas baseadas nos períodos seco e chuvoso de acordo com a data de envasamento do produto. Apenas uma amostra, de cada duplicata, teve suas características micológicas analisadas, a segunda amostra foi preservada para posterior análise.

Figura 2 – Mapa georeferenciado dos pontos de coleta onde se encontraram os apiários e o supermercado, nos quais as amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* foram coletadas para análise.



Fonte: IBGE (2015) e ZEE (2015).

Figura 3 – Descrições das amostras de méis de municípios roraimenses.

Amostras	Local	Floração	Períodos	Quantidade de Amostras
A ₁	Mercado/Boa Vista	-	{ PC	2
			{ PS	2
A ₂	Apiário – UFRR/Boa Vista	Silvestre	{ PC	2
			{ PS	2
A ₃	Serra da Lua/Cantá	Acácia	{ PC	2
			{ PS	2
A ₄	Tamandaré/Mucajaí	Silvestre	{ PC	2
			{ PS	2
Total	de	Amostras		16

As amostras dos méis com S.I.F foram adquiridas e retiradas aleatoriamente do mesmo lote em um determinado mercado de Boa Vista. As amostras adquiridas diretamente dos apicultores foram coletadas do tanque de decantação, recipiente destinado ao recebimento dos méis já centrifugados, pronto para o consumo. Para cada amostra, A3 e A4, foi realizada a coleta em dois potes de vidro previamente esterilizados, em seguida foram tampados e identificados. As amostras do apiário da UFRR foram coletadas diretamente das melgueiras (compartimentos onde são armazenados os méis) das colônias. Os favos coletados foram embalados em sacos plásticos para evitar contaminação secundária. As amostras de méis do apiário da UFRR foram utilizadas como controle, por seguir criteriosamente as normas de Boas Práticas Apícolas.

3.2 Isolamento e contagem de fungos filamentosos e leveduras

Para o isolamento dos fungos filamentosos e leveduras, as amostras foram submetidas à diluição seriada, de acordo com Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003). Foram retiradas e pesadas 25g de mel, as quais foram diluídas em 225 ml de solução salina peptonada (0,65%). As preparações das diluições decimais subseqüentes foram realizadas em tubos contendo 9 ml de solução salina peptonada até a concentração de 10^{-3} . Para a quantificação de fungo filamentoso e levedura foi aplicada a técnica de semeadura

em placa contendo meio Ágar Dextrose Batata (BDA) e Ágar Dextrose Sabouraud (Sb), acrescidos de clorafenicol (250mg/l).

A inoculação das diluições em placas foi realizada em triplicata para todas as concentrações (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), com auxílio de alça de Drigalski. As placas com ambos os meios foram incubadas em estufa a 25°C e 28°C, sem inverter. Após sete dias de incubação foi avaliado o crescimento dos micro-organismos.

3.3 Quantificação das colônias

Para contagem foram selecionadas as placas em triplicata que continham entre 15 a 150 colônias, as placas com contagens superiores foram consideradas com número maior que 150 colônias (>150) de acordo com normativa nº 62 (BRASIL, 2003). O número de colônias crescidas foi anotado em planilhas específicas, para posterior determinação da frequência.

3.4 Agrupamento dos fungos filamentosos

O agrupamento dos morfotipos com base em caracteres macroscópicos das colônias dos fungos filamentosos, que cresceram nas placas utilizado a técnica de diluição seriada, foi verificado a textura, verso, reverso, superfície, borda das colônias e liberação de pigmento no meio. Estes fungos filamentosos foram agrupados, os morfotipos foram transferidos para novas placas com meio Sb, para obtenção de culturas puras.

3.5 Enquadramentos dos resultados na legislação específica

Após as quantificações das colônias dos bolores e leveduras obtidos nas amostras de méis no período chuvoso e seco, os resultados foram comparados com o regulamento do MERCOSUL nº 15/1994 (MERCOSUL, 1994) que estabelece o valor máximo de $1,0 \times 10^2$ UFC/g, para bolores e leveduras.

3.6 Identificação dos fungos filamentosos

Para a identificação dos morfotipos foi utilizado o microcultivo em lâmina, visando a descrição micromorfológica.

3.6.1 Técnica de Microcultivo em lâmina

Os fungos filamentosos foram identificados convencionalmente, de acordo com suas características microscópicas, e analisados através de exame do microcultivo, sendo possível a visualização das hifas, conidióforos, conídios, formato e tamanho da célula, septos e a presença de estrutura de reprodução.

Dentro da câmara de fluxo laminar, foi montada a lâmina para microscopia. Pequenos blocos de 1cm² de meio de cultura Sb foram cortados com auxílio de uma alça de platina previamente flambada. Cada bloco foi transferido para uma lâmina esterilizada e inoculado nos quatro vértices, com pequenos fragmentos de micélios dos fungos a serem estudados e identificados. Os blocos com os fragmentos foram cobertos com uma lamínula estéril com auxílio de uma pinça previamente flambada. Este conjunto foi mantido no interior de uma placa de Petri sobre dois suportes e pequena porção de algodão (LACAZ et al., 2002).

Para manter a câmara úmida dentro da placa de Petri e proporcionar o desenvolvimento dos fungos, os algodões foram umedecidos com água destilada esterilizada. As placas de Petri foram incubadas a temperatura de 28°C. Após sete dias de incubação, as lâminas foram submetidas à ação do formol (40%) por 48 horas, para inativar a esporulação, auxiliar na fixação e na visualização das estruturas microscópicas dos fungos.

Com o auxílio de uma pinça foi removido a lamínula e o bloco de Sb do microcultivo. A lamínula removida fez par com uma nova lâmina estéril e a lâmina de origem do microcultivo fez par com outra lamínula. Para uma melhor visualização das estruturas microscópicas as lâminas foram coradas com uma gota de Azul de Metileno. As lamínulas foram vedadas com esmalte transparente nas bordas, para impedir a evaporação do corante.

A identificação dos fungos filamentosos isolados das amostras de méis foi baseada na observação macromorfológica das colônias e micromorfológica das

estruturas microscópicas dos fungos, conforme descrito por; Barnett e Hunter (1987), Kiffler; Morelet (2000) Lacaz et al. (2002); Carlile; Watkinson; Gooday (1994) e Pitt; Hocking (2009).

A confirmação das identificações está sendo realizadas pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

3.6.2 *Caracterização Molecular*

Para identificação molecular dos isolados, primeiramente foram selecionadas e cultivadas culturas puras dos fungos filamentosos em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose - Sb. O DNA será extraído dos micélios ou esporos através de diversos processos físicos (maceração, centrifugação e incubação) e químicos (tampões). Por meio da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) foram amplificadas as regiões altamente conservadas dos fungos, que se encontram subdivididas em três subunidades os genes 18S subunidade menor, (5,8S) e (28S) subunidade maior, que são denominados de espaço de transcrição interno (ITS). Estas subunidades conservadas são separadas pelas as regiões ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico

3.6.2.1 *Extração de DNA*

A extração do DNA total foi realizada com modificações de acordo com Hoog et al. (2005). Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em meio de cultura Sb. Fragmentos de micélio foram retirados com auxílio de uma alça de platina, e colocados diretamente dentro do cadinho congelado a -80 °C, foi macerado com o auxílio de um pistilo em seguida foram acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) novamente macerado e transferido para microtubo, em seguida foram acrescidos 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL). Após homogeneização, o microtubo foi colocado por 30 minutos a 60 °C em banho-maria. Após essa etapa, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e

incubação por 10 minutos a 65 °C. Em seguida, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0 °C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 50% do volume de isopropanol e deixado por 15 minutos a 4 °C, em seguida foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 µL de etanol (Merck) 70% p/v e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70% p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 30 minutos, posteriormente foi acidificado 50 µL de água ultra-pura. Após overnight foram adicionados 5 µL de RNase em cada amostra, homogenizado. Os microtubos foram colocados por 60 minutos a 37 °C em banho-maria. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

A partir das amostras extraídas foi realizada a quantificação do DNA por espectrofotometria no aparelho BioMate™ 3S Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Para este procedimento serão retiradas alíquotas de 1µl, que serão diluídos em 499µl de Tris-HCL, pH 8,0 resultando numa diluição de 1:500. A leitura das amostras será realizada a 260nm e 280nm. A razão entre A260nm/A280nm será calculada para determinação do grau de pureza.

3.6.2.2 Amplificação por PCR dos genes ITS1-5,8S-ITS2

A região correspondente aos genes ITS1-5.8S-ITS2 foram amplificadas utilizando os iniciadores *forward* ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e *reverse* ITS4 (TCCTCCCGTTATTGATATGC). A reação de amplificação foi conforme o protocolo a seguir: 11,95 µL de água ultra pura; 1 µL de dNTPs a 5mM; 2,5 µL de tampão a 10x; 0,75 µL de MgCl₂ a 50 mM; 2, 5 µL de cada um dos iniciadores ITS1 e ITS4; 0,8 µL de Taq DNA polimerase 5µ/ml (Ludwig) e 1 µL da amostra de DNA.

O volume final de cada reação foi de 25 μ L e os microtubos foram colocados em um aparelho termociclador Peltier-based thermal gyder (Biosystem, EUA) que foi programado para realizar 30 ciclos, após uma desnaturação inicial de quatro minutos a 95 °C. Cada ciclo de amplificação consistirá das seguintes etapas: a etapa da desnaturação (95 °C, 45 segundos), a etapa de anelamento (55 °C, 45 segundos), a etapa da extensão (72°C, um minuto) e uma etapa de extensão final a 72 °C durante dez minutos. Ao final da PCR produz um fragmento, que varia entre 500 a 800 pares de bases, dependendo da espécie.

3.6.2.3 *Eletroforese*

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (100 V por 60 minutos) em gel de agarose a 1% (m/v), diluído em tampão de corrida com Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE). Foram colocadas separadamente gotas de 2 μ L de azul de bromofenol (1% de azul de bromofenol e 5% de sacarose) e 2 μ L de Gel Red™ Nucleid Acid Gel Strain 10.000X (Biotium) para cada amostra e 5 μ L do produto amplificado, misturou-se com cada gota do tampão e gel Red, utilizando um filme de PVC como suporte. A amostra então foi aplicada imediatamente nos poços no gel. Após a aplicação de todas as amostras a tampa da cuba de eletroforese foi fechada e conectaram-se os condutores elétricos à fonte.

A presença e o tamanho dos fragmentos foram registrados em um fotodocumentador Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems), sob emissão de luz ultravioleta. O tamanho do fragmento foi determinado através da comparação com um marcador de peso molecular de 1000 pares de bases. As amostras foram purificadas utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System antes do procedimento de sequenciamento.

3.6.2.4 *Purificação dos produtos de PCR*

A purificação da PCR consistiu na remoção de nucleotídeos não utilizados ou excesso de reagentes, desta forma, interferências nas reações de sequenciamento foram minimizadas. foi utilizado, para a purificação, o kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA).

A metodologia foi segundo o protocolo do fabricante. No microtubo de 0,2 mL foi adicionado um volume igual de solução de ligação à membrana e homogeneizado, em seguida, a mistura será transferida para a mini-coluna inserida em um tubo coletor e incubar a temperatura ambiente por um minuto. Após a incubação foi centrifugado por 16.000xg por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a mini-coluna foi reinsertada no tubo coletor. Foram adicionados 700 µL de tampão de lavagem e centrifugado a 16.000xg por 1 minuto. O filtrado foi novamente descartado e a mini-coluna inserida ao tubo coletor. A coluna foi novamente lavada com tampão de lavagem. Adicionando 500 µL de tampão de lavagem e centrifugado a 16.000xg por 5 minutos. Foi descartado o filtrado e novamente centrifugado a 16.000xg por 1 minuto. A tampa do microtubo foi aberta para a evaporação completa do etanol residual. A mini-coluna foi transferida cuidadosamente para um microtubo de 1,5 mL livre de nucleasse e foi adicionado a mini-coluna 50 µL de água livre de nucleasse. Foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida centrifugada a 16.000xg por 1 minuto. A mini-coluna foi descartada e o DNA foi armazenado até o momento de uso a -20°C.

3.6.2.5 Sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2

O produto da PCR correspondentes à região ITS1-5,8S-ITS2 rDNA foi sequenciado de acordo com Magnani et al. (2005). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit de sequenciamento BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem, EUA). O protocolo de sequenciamento foi segundo instruções do kit, onde a reação de sequenciamento teve volume final de 10 µL, contendo: 5,7 µL de ddH₂O; 2 µL de tampão 5x (1 M Tris-HCl pH 9 e 1 M MgCl₂); 1 µL para cada iniciador a 3,3 µM (ITS1 e ITS4). Foi utilizado em cada uma das reações somente um dos iniciadores (senso e anti-senso). A reação foi submetida a um gradiente de temperatura no termociclador conforme sugestão protocolo. Sendo as amostras analisadas em um sequenciador automático modelo ABI3130 (Applied Biosystems™, USA).

3.6.2.6 Edição e alinhamento das sequências de DNA

As sequências obtidas foram analisadas inicialmente, montadas e combinadas para obter uma sequência consenso e os cromatogramas foram analisados através do *software* MEGA5 (TAMURA et al., 2011).

As sequências dos consensos obtidas foram revisadas com o auxílio do *software* MEGA5 (TAMURA et al., 2011). A edição das sequências visará identificar possíveis erros de alinhamento e uniformizar a extensão das sequências. Para estabelecer homologia entre as sequências nucleotídicas obtidas, foi realizado um alinhamento múltiplo automatizado utilizando o programa computacional CLUSTALW, incluído no pacote MEGA5 (TAMURA et al., 2011).

As sequências nucleotídicas, após editadas, foram comparadas às depositadas no banco de dados do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com o auxílio da ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a fim de identificar homologia entre as sequências obtidas e os presentes no banco de dados que fornecem informações relativas à sequências de micro-organismos. As que apresentarem maior similaridade com as sequências obtidas foram utilizadas na construção filogenética.

3.7 Preservação dos fungos

Os morfotipos dos fungos filamentosos isolados dos méis foram preservados em tubos com meio Sb inclinados para auxiliar na macromorfologia, e pelo método de Castellani, com modificações de acordo com Diogo, Sarpieri e Pires (2005). As modificações foram as seguintes: dois pequenos blocos de 1cm² foram retirados das colônias puras, e alocados em microtubos estéreis, onde foram acrescentados aproximadamente 1,5 ml de água esterilizada. Este procedimento foi realizado em triplicata. Os frascos foram fechados e identificados com caneta permanente com seus respectivos códigos de identificação e estocados à temperatura ambiente para posterior depósito na coleção de cultura do CBio/UFRR, e as amostras de DNA serão armazenadas no freezer a - 80°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se o crescimento de fungos filamentosos e leveduras nas amostras A2, A3 e A4 em ambos os períodos, diferentemente das amostras A1 no PC e do PS, onde não houve crescimento. O pH das amostras analisadas do PC variou entre 2,97 a 4,13 e no PS entre 2,33 a 3,06 (tabela 1).

Das oito amostras de méis roraimenses analisadas, seis apresentaram crescimento de fungo filamentoso e/ou levedura. Na amostra A2/PS não houve desenvolvimento de fungo filamentoso e a amostra A1, a marca comercial, foi a única que não apresentou crescimento de fungo em nenhum dos períodos. Os fungos filamentosos foram agrupados e identificados convencionalmente de acordo com suas morfologias macroscópicas e microscópicas. Posteriormente foram caracterizados em nível molecular utilizando-se primers ITS1 e ITS4 e as sequências comparadas no GenBank, com auxílio do BLAST, para identificação em nível de espécie.

Foram obtidas 63 UFC de fungos filamentosos das amostras A2, A3 e A4, coletadas no período chuvoso, e amostras A3 e A4, coletadas no período seco, totalizando cinco amostras. Por meio do método de identificação taxonômica convencional, foi possível agrupar estes isolados em 19 morfotipos, pertencentes a sete gêneros e três espécimes não identificados devido à ausência de esporos.

Por meio das técnicas moleculares, dos 19 morfotipos registrados neste trabalho, revelou a identidade em nível de espécie de 12 morfotipos, representando 63% dos isolados.

4.1 Isolamento dos fungos filamentosos obtidos das amostras de méis roraimenses

Não houve isolamento de fungos filamentosos e leveduras por meio de diluição seriada em meio BDA com incubação por sete dias a 25°C e 28°C, conforme aponta a Normativa nº 62 (BRASIL, 2003).

Desta forma, foi utilizado o meio de cultura Sb, em substituição ao BDA, com incubação a 25°C e 28°C. No entanto, houve desenvolvimento dos fungos

filamentosos e leveduras somente na temperatura de 28°C. Siqueira (1995) afirma que maioria dos fungos filamentosos e leveduras são mesófilos, e crescem a temperatura ótima entre 25°C a 30°C em alimentos.

Durante o isolamento foi verificada a frequência dos fungos filamentosos e leveduras em cada amostra nos períodos PC e PS. Cada amostras de mel teve o pH verificado.

4.2 Quantificação dos fungos filamentosos e leveduras obtidos das amostras de méis roraimenses

As UFC de fungos filamentosos e leveduras de cada amostra em cada um dos períodos, que se desenvolveram na diluição 10^{-1} , foram contadas. A frequência foi obtida por meio de média aritmética de três repetições, conforme dados apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Frequência de bolores e leveduras (UFC/g), pH e período de coletas de amostras de méis roraimense.

Período Chuvoso					Período Seco				
Amostras	FF UFC/g	LV UFC/g	FF+LV* UFC/g	pH	Amostras	FF UFC/g	LV UFC/g	FF+LV* UFC/g	pH
A1	0	0	0	2,9	A1	0	0	0	2,3
A2	$0,3 \times 10^1$	$0,3 \times 10^1$	$0,6 \times 10^1$	3,3	A2	0	$1,3 \times 10^1$	$1,3 \times 10^1$	3,1
A3	$0,7 \times 10^1$	0	$0,7 \times 10^1$	4,1	A3	$0,3 \times 10^1$	$0,4 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	2,8
A4	$4,3 \times 10^1$	$9,7 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$	3,4	A4	$0,7 \times 10^1$	0	$0,7 \times 10^1$	3,0

Legenda: LV – Leveduras; FF – Fungos Filamentosos. FF+LV* - Padrão estabelecido pela legislação Mercosul (1994) limite inferior a 100 UFC bolores e leveduras.

Analisados separadamente, os fungos filamentosos ocorreram em 62,5% das amostras de mel, totalizando $6,3 \times 10^1$ UFC/g nos dois períodos; enquanto as leveduras foram detectadas em 50% das amostras, totalizando $1,53 \times 10^2$ UFC/g.

Nas amostras A3 ($0,7 \times 10^1$ UFC/g) no PC e A4 ($0,7 \times 10^1$ UFC/g) no PS se desenvolveram apenas fungos filamentosos. Já, na amostra A2 ($1,3 \times 10^1$ UFC/g) no PS cresceram somente leveduras. Fungos filamentosos juntamente com leveduras cresceram nas amostras A2 e A4 no PC e A3 no PS, sendo contabilizados $0,6 \times 10^1$ UFC/g, $1,4 \times 10^2$ UFC/g e $4,3 \times 10^1$ UFC/g, respectivamente. Na amostra A1, tanto no PC quanto no PS não houve crescimento de fungos filamentosos ou leveduras, conforme apresentado na tabela 1.

Os valores encontrados na contagem de fungos filamentosos e leveduras, obtidas nas amostras de méis A2, A3 e A4 nos PC e PS, estão variaram entre 0 e $1,4 \times 10^2$ UFC/g. Estes resultados corroboram o trabalho de Pezente (2011), que verificou que a quantidade de bolores e leveduras variou entre 0 e $>1,5 \times 10^2$ UFC/g em 29 amostras de méis de *A. mellifera* produzidos nos municípios Cantá, Mucajaí e Boa Vista, Roraima, os mesmos municípios estudados no presente trabalho.

A quantificação dos fungos filamentosos e leveduras dos méis roraimenses nos auxilia a verificar a real identidade do mel no mercado, pois suas características são peculiares e inerentes à sua origem. As informações sobre a contagem dos fungos filamentosos e leveduras presentes no mel possibilita sua padronização e nos fornece informação sobre o controle de qualidade deste alimento. Assim as oito amostras de méis analisadas são considerados de boa qualidade para consumo humano, apenas uma amostra não atendeu à legislação.

Das amostras de méis analisadas nos municípios de Boa Vista, Cantá e Mucajaí do período chuvoso, a maior frequência de colônias dos fungos filamentosos e leveduras foi observada na amostra A4 com valores de $1,4 \times 10^2$ UFC/g. Comparado com o trabalho de Denardi et al. (2005), que ao analisar 60 amostras de méis vendidos em feiras-livres, supermercados e casas de produtos naturais da cidade de São Paulo, registraram a frequência máxima de $3,9 \times 10^2$ UFC/g de fungos filamentosos e leveduras, os méis de Roraima apresentam frequência menor, com diferença de $2,5 \times 10^2$ UFC/g. Da mesma maneira, Lieven et al. (2009) encontram valores maiores ($1,6 \times 10^2$ UFC/g a $4,5 \times 10^3$ UFC/g) do que os verificados em Roraima ($0,3 \times 10^1$ UFC/g a $1,4 \times 10^2$ UFC/g), ao analisarem 18 amostras de mel do comércio informal e formal na região do extremo sul da Bahia. Portanto, a contagem de fungos filamentosos e leveduras é necessária, pois é um dos critérios para indicar

a qualidade do mel, ressaltando a importância do monitoramento deste alimento para garantir um produto seguro para a população de Roraima.

Em relação ao crescimento de fungos filamentosos e leveduras em amostras de méis roraimenses, a amostra A1 (marca comercial) do PC e PS não informa sua origem na embalagem. Esta amostra não apresentou crescimento de fungos filamentosos e leveduras. Em seu estudo, Pezente (2011) verificou que duas amostras, dos municípios de Mucajaí, na região Tamandaré e Boa Vista, na Fazenda Berçário, méis de origem silvestre, também não apresentaram crescimento de fungos filamentosos e leveduras. Vale ressaltar que a amostra que não apresentou desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras, analisada no presente trabalho, refere-se a marca comercial procedente do município de Boa Vista. Trata-se de um mel envasado, cuja embalagem não fornece informações sobre a origem do mel.

Estudo realizado por Bastos et al. (2008) tem demonstrado deficiências nas informações de rótulos de alimentos referentes a ausência de denominação de origem, o que pode levar a riscos à saúde ao consumidor. Desta forma, o controle sanitário, competência da vigilância sanitária, é essencial para garantir a qualidade das informações de rotulagem.

Por outro lado, verificou-se na A1 que o mel tem uma boa qualidade micológica, pois não apresentou desenvolvimento de fungos filamentosos e/ou leveduras. Portanto, os resultados mostram que, possivelmente, os produtores seguem as normas rigorosas de higiene, desde as instalações até os manipuladores e equipamentos utilizados para extração do mel de acordo com as "Boas Práticas de Fabricação de Alimentos" – BPF (SEBRAE, 2009). Esse fato se deve, provavelmente, ao pH ácido do mel - 2,3 e 2,9 respectivamente, PC e PS. Alves et al. (2009) estudando a microbiota de amostras de mel orgânico de *A. mellifera* africanizada verificaram que em condições de pH ácido não ocorre crescimento de fungos filamentosos e leveduras. Entretanto, observou-se na amostra A3/PS (tabela 1) que o pH foi de 2,8 e que houve crescimento de fungos filamentosos e leveduras. Isso demonstra que a ausência destes micro-organismos não está relacionada apenas ao pH, mas, também com a aplicação de BPF. Segundo Opuchkevich, Klosowski e Macohon (2008), o pH inferior a 5,0 é importante na conservação do mel por contribuir para estabilidade frente ao desenvolvimento de fungos

filamentosos e leveduras; caso seja maior que 5,0 pode ter ocorrido manuseio inadequado no apiário, ou a floração influenciou o pH do mel.

O não crescimento de fungos filamentosos e leveduras nas amostras analisadas dos méis roraimenses podem estar relacionados a outros fatores, como discorrem Denardi et al. (2005), ou seja, as características de baixa atividade de água/umidade e baixo pH, determinam um ambiente inóspito para micro-organismos, principalmente os patogênicos. A baixa atividade de água está relacionada às moléculas de água no mel que se encontram ligadas aos açúcares, principalmente por pontes de hidrogênio. A glicose encontra-se ligada a cinco moléculas de água e isto faz com que haja redução na quantidade de água no mel (KUROISHI et al., 2012). Segundo Alves et al. (2005), o mel apresenta ácidos em sua composição, entre eles o ácido glucônico, produzido pela enzima glicose-oxidase, a qual permanece ativa mesmo durante o armazenamento; assim a acidez é significativa na conservação da estabilidade do produto, reduzindo o risco de desenvolvimento de micro-organismos.

Fatores como pH, baixa atividade de água e umidade podem estar relacionados com a inibição de crescimento de fungos filamentosos e leveduras, como observado nas amostras A1(PC e PS) e A3 (PS). Entretanto, Périco et al. (2011) discorrem que, quando os valores de pH são muito baixos, podem indicar adulteração por xarope de sacarose (melato da cana-de-açúcar) ou por adição de xarope invertido, o qual é obtido por hidrólise ácida do xarope de milho que contém altos teores de hidroximetilfurfural. Quando os valores pH forem muito altos no mel, evidenciam caldas de sacarose sem adição de ácido. Dentre as amostras analisadas, A1 e A3 foram as que apresentaram menores valor de pH. Contudo, estudos complementares são necessários para verificar se houve ou não adulterações nos méis estudados.

As amostras de méis A2 no PC e PS e A4 no PC e PS são de origem silvestre e apresentaram valores de pH 3,3; 3,1; 3,4, e 3,0 respectivamente, enquanto a amostra A3 no PC e PS, de mel originário de acácia ou melato, o pH foi 4,1 e 2,8. Moura et al. (2014) afirmam que o pH depende da origem floral, ou seja, está diretamente relacionado à composição floral do ambiente e às condições de solo. No presente trabalho, observou-se que nas amostras analisadas o pH variou de 2,3 a 4,1; sendo todos os méis considerados ácidos. Segundo Evangelista–

Rodrigues et al. (2005) o pH pode ser influenciado também pelo pH do néctar, pelo solo, por associação de vegetais para composição do mel e por substâncias mandibulares da abelha acrescidas ao néctar quando transportados até a colmeia.

Carvalho et al. (2005) discorrem que o pH no mel de origem floral ou silvestre apresenta valor geralmente inferior a 4,0, e o mel de melato superior a 4,5. Entretanto, o mel de melato (A3) de Roraima não apresentou pH superior a 4,5; este fato demonstra um diferencial para a microbiota do mel do estado, pois a média do pH foi inferior (3,46); ao contrário do mel de origem silvestre, o que corrobora a afirmação dos autores.

Com a relação a frequência de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de méis roraimenses, a amostra A2/PC apresentou a menor frequência de fungos filamentosos e leveduras, contabilizando $0,6 \times 10^1$ UFC/g, sendo $0,3 \times 10^1$ UFC/g de fungos filamentosos. Em contrapartida, a amostra A4/PC foi a que apresentou maior frequência, $1,4 \times 10^2$ UFC/g, dos quais $4,3 \times 10^1$ UFC/g referem-se a fungos filamentosos. Mundo et al. (2004) comentam que o aumento do número de colônias nos alimentos pode ser favorecido por fatores extrínsecos, como temperatura e umidade relativa e por fatores intrínsecos como atividade de água, pH e composição do alimento, além das condições físicas e sanitárias do local.

A frequência de fungos filamentosos e leveduras nas amostras A3/PC e a A2/PS e A4/PS, proveniente do município de Cantá, Boa Vista e Mucajaí respectivamente, variou de $0,7 \times 10^1$ UFC/g a $1,3 \times 10^1$ UFC/g. Para os méis roraimenses existem poucos estudos sobre análise micológica, sendo este tipo de análise um critério importante para classificar a qualidade do mel antes e após a comercialização. Silva et al. (2008) corroboram que as características micológicas do mel estão relacionadas à qualidade e a segurança deste alimento. As leveduras e fungos filamentosos podem estar envolvidos diretamente nas atividades de deterioração do mel, produção de enzimas, toxinas, conversão metabólica do alimento e fatores de inibição de micro-organismos competidores.

As análises micológicas em alimentos, principalmente no mel, por ser um alimento consumido *in natura*, são de fundamental importância para a prevenção de doenças causadas pelos metabólitos secundários que os fungos filamentosos produzem. Embora nas amostras A2, A3 no PC e a A2, A3 e A4 no PS tenha havido crescimento dos fungos filamentosos e/ou leveduras, a quantidade desde micro-

organismo foi inferior 100 UFC, o que está de acordo com a Resolução do Mercosul (MERCOSUL,1994). Vale ressaltar que a origem dos fungos filamentosos no mel, muitas vezes, são de ocorrência natural e está associada às abelhas, que em quantidades normais, representam uma micoflora não patogênica (GILLIAM, 1997).

Por meio das análises micológicas, percebe-se a importância da segurança alimentar em saúde pública, pois o consumidor está adquirindo alimentos seguros. Marchi et al. (2011) estudando a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) constataram que a incidência de DTA cresce anualmente. A maioria dos casos de DTA, contudo, não é notificada, pois muitos organismos patogênicos presentes nos alimentos causam sintomas brandos. Portanto, após a ingestão de um determinado alimento de mesma origem considerado contaminado, duas ou mais pessoas podem apresentar sinais e sintomas semelhantes. Muitas vezes os alimentos contaminados, normalmente, têm aparência, odor e sabor normais e a população é pouco esclarecida sobre os perigos envolvidos com esse tipo de alimento.

Ainda em relação a frequência de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de méis roraimenses, a amostra A4/PC apresentou $1,4 \times 10^2$ UFC/g, com maior quantidade de micro-organismos em relação às demais amostras analisadas, apesar do pH ácido (3,35). Este aumento no número de fungos filamentosos e veduras pode ter ocorrido em função de fontes secundárias depois da colheita do mel, ou seja, os apicultores não utilizaram boas práticas apícola, as quais abrangem as atividades de manejo ao longo da criação das abelhas e das extração do mel, ou ainda de fontes primárias, introduzidos pelas próprias abelhas (SILVA et al., 2008).

A amostra A4/PC apresentou maior frequência de micro-organismos ($1,4 \times 10^2$ UFC/g), sendo que houve menor crescimento ($0,7 \times 10^1$ UFC/g) de fungos filamentosos e leveduras na amostra A4/PS. Segundo Silva et al. (2008) a redução destes micro-organismos pode estar relacionada a fontes secundárias que são controladas por meio de BPF. Gois et al. (2013) afirmam que as fontes secundárias de contaminação podem estar relacionadas pela manipulação e os cuidados higiênicos durante a extração do mel elaborados pelas colmeias. Outras contaminações acidentais que provêm de várias fontes, como: resíduos de medicamentos usados nos tratamentos das doenças de abelhas que são administrados por via oral, no momento da alimentação das abelhas com mel

artificiais, sendo xarope de açúcar e resíduos de pesticidas. Também os lixões visitados por abelhas podem ser fontes de contaminação de mel.

Em relação às leveduras, a maior frequência ocorreu também na amostra A4/PC, contabilizando $9,7 \times 10^1$ UFC/g. Segundo Sodré et al. (2005), as leveduras são micro-organismos que podem desenvolver-se no mel por tolerar as condições ácidas e níveis altos de sacarose. Chirife, Zamora e Motto (2006), comentam que as leveduras osmotolerantes podem conduzir o alimento à fermentação, resultando na formação de dióxido de carbono e etanol, o qual pode ser oxidado a ácido acético e água. Assim, entende-se que a amostra A4, devido a sua origem silvestre, apresenta um tipo de mel com propriedades muito variáveis devido à multiplicidade envolvida na origem da flora local, conforme aponta Barth (2004).

Siqueira (1995) discorre que as leveduras osmofílicas são capazes de multiplicar-se em altas concentrações de açúcar. Mendes et al. (2009) corroboram que as leveduras pertencentes à própria flora do mel, são introduzidas pelas abelhas durante as operações de limpeza ou por meio do néctar, pólen ou melato. Contudo, algumas espécies de levedura têm uma ação antagônica, ou seja, impedem o desenvolvimento de fungos filamentosos, que podem ser fungos potencialmente toxigênicos, ou seja, produtores de micotoxinas, que por sua vez podem apresentar efeitos carcinogênicos e teratogênicos (RAMOS et al., 2010).

O mel é um alimento propício para a contaminação por fungos filamentosos, devido ao manejo e a extração de forma incorreta e principalmente por ser um produto não-estéril. Este tipo de alimento é daquele nos quais se admite a presença dos micro-organismos formadores de esporos, transmitidos pelas próprias abelhas. A qualidade da microbiota é um dos critérios, dentre as várias exigências relacionadas com os critérios de segurança alimentar. Em produtos não-estéreis como o mel, há necessidade de se estabelecer padrões micológicos qualitativos e quantitativos na amostra, a fim de assegurar a qualidade do alimento durante o prazo de validade e, desta forma, não apresentar riscos à saúde humana.

4.3 Enquadramento das amostras na legislação

Os valores de frequência de fungos filamentosos e leveduras em méis roraimenses apresentados na tabela 1 foram enquadrados nos padrões da

legislação (MERCOSUL, 1994) que estabelece quantidade de bolores e leveduras $<1,0 \times 10^2$ UFC/g como sendo próprio para consumo.

Os resultados da análise das amostras A1, A2 e A3 do PC e A1, A2, A3 e A4 do PS mostram valores menores que $1,0 \times 10^2$ UFC/g, estando estes méis com padrão apropriado para o consumo. Isto indica que provavelmente os apicultores seguiram as normas de BPF.

Vale ressaltar que A1 é uma marca comercial e não apresentou crescimento de bolores e leveduras em nenhuma das placas em ambos períodos. É de grande relevância este resultado, pois os valores estabelecidos pela legislação até 100 UFC para mel, a ausência total desde micro-organismos é considerado um mel excelente para consumo humano, ou seja, a amostra A1 está dentro dos padrões exigidos pela Mercosul (1994).

Por outro lado, a amostra A4 do PC apresentou o valor de $1,4 \times 10^2$ UFC/g de bolores e leveduras (tabela 1), sendo esta amostra considerada contaminada, pois a legislação do Mercosul estabelece que nenhuma amostra pode exceder $1,0 \times 10^2$ UFC/g. O apiário da amostra A4 localiza-se na vicinal Tamandaré em área de floresta no município de Mucajaí, o mel de origem silvestre. Este resultado sugere que os apicultores não seguiram as normas de BPF.

A presença de fungos filamentosos e leveduras em quantidade elevada nos alimentos pode fornecer várias informações, tais como, má higienização dos equipamentos, estocagem e o produto já contaminado pelo meio (SIQUEIRA, 1995).

Os fungos filamentosos e as leveduras estão naturalmente presentes no mel. No entanto, podem se tornar competidores caso prevaleçam condições adequadas como temperatura e umidade ou o produto seja adulterado. Segundo Silva et al. (2008) a presença de maior quantidade desses micro-organismos está influenciada por fontes secundárias após colheita durante a extração do mel. A fonte secundária refere-se à manipulação incorreta, uso de materiais mal higienizados, locais inadequados de processamento pela incidência de vento, presença de insetos ou permanência de animais domésticos no local.

4.4 Identificação dos fungos filamentosos obtidos nas amostras de méis roraimenses

As 63 UFC de fungos filamentosos obtidas das amostras A2, A3 e A4, analisadas no período chuvoso, e amostras A3 e A4 analisadas no período seco, foram agrupadas em 19 morfotipos de acordo com a tabela 2.

A caracterização e identificação dos fungos filamentosos é necessária para a prevenção e controle da contaminação dos alimentos, principalmente porque esses micro-organismos são potencialmente toxigênicos. Os métodos tradicionais de identificação de gêneros de fungos filamentosos são baseados nas características da macro e micromorfologia, incluindo a morfologia da colônia, forma, cor, textura, tamanho e ornamentação de conídios, conidióforos e hifas septadas ou não.

Tabela 2 - Morfotipos de fungos filamentosos, distribuídos por amostra no período chuvoso e período seco, obtidos de méis roraimenses produzidos pelas abelhas *Apis mellifera*.

Código	Morfotipo	Número de colônias				
		PC			PS	
		A2	A3	A4	A3	A4
BM18	<i>Cladosporium</i> like				3	
BM13	<i>Eurotium</i>			3		
BM08	<i>Humicola</i> sp1 like			3		
BM10	<i>Humicola</i> sp2 like			3		
BM02	<i>Monodictys</i> like	1				
BM05	<i>Paecilomyces</i> sp1			3		
BM09	<i>Paecilomyces</i> sp2			3		
BM11	<i>Paecilomyces</i> sp3			3		
BM01	<i>Penicillium</i> sp1	2				
BM06	<i>Penicillium</i> sp2			3		
BM07	<i>Penicillium</i> sp3			3		
BM15	<i>Penicillium</i> sp4			3		
BM16	<i>Penicillium</i> sp5			3		
BM17	<i>Penicillium</i> sp6			7		
BM19	<i>Syncephalastrum</i>					7
BM03	Não identificado		3			
BM04	Não identificado		4			
BM12	Não identificado			3		
BM14	Não identificado			3		
Total		3	7	43	3	7

Legenda: PC – Período chuvoso; PS – período seco.

Das quatro amostras analisadas (A1, A2, A3 e A4) no PC em apenas três (A2, A3 e A4) ocorreu a presença de fungos filamentosos, sendo que a amostra A2/PC apresentou dois morfotipos pertencentes aos gêneros *Monodictys* e *Penicillium*. Da amostra A3/PC foram isoladas dois morfotipos, que por meio do método convencional não foi possível verificar a qual gênero pertencem, devido à

ausência dos esporos. A presença de esporos é visto que uma das características micromorfológicas mais relevantes para identificação dos fungos filamentosos. Por outro lado, constatou-se que a amostra A4/PC apresentou o maior número de morfotipos, totalizando 13, distribuídos em quatro gêneros: *Eurotium*, *Humicola*, *Paecilomyces* e *Penicillium* e dois gêneros não identificados.

No PS houve crescimento de fungos filamentosos em duas amostras, sendo que A3/PS ocorreu um morfotipo pertencente ao gênero *Cladosporium* e A4/OS, um morfotipo pertencente ao gênero *Syncephalastrum*.

Em uma visão geral, os 19 morfotipos registrados neste trabalho, estão distribuídos da seguinte maneira: em A4 (PC e PS) foram identificados 14 morfotipos, sendo dois não identificados em nível de gênero; A3 (PC e PS) apresentaram três morfotipos, os quais não foram identificados e em A2/PC foram verificados dois morfotipos. A amostra A4 foi que apresentou maior número de morfotipos.

Esta avaliação nos fornece informações sobre as condições de processamento e armazenamento deste produto. Na amostra A1 como dito anteriormente não houve a presença de fungos filamentosos em ambos dos períodos. A amostra controle (A2), apresentou menor número de colônias totalizando somente três colônias. A amostra A3 no PC e PS totalizou o número de 10 colônias. Alguns fungos filamentosos no mel estão associados às abelhas, sendo a microflora não patogênica (GILLIAM, 1997). No entanto, na amostra A4 foram contabilizados 50 colônias de fungos filamentosos, sendo 43 no PC e sete no PS. Foi constatado que a amostra A4 foi a que apresentou maior número de microrganismos, agrupados em 14 morfotipos. Isto nos revela que a contaminação geralmente é um indicativo à falta de higiene e limpeza do material de trabalho (GOIS et al., 2013).

Alguns dos fungos filamentosos que cresceram nas amostras de méis analisadas, adquiridas em diferentes municípios do estado de Roraima, são benéficos ao homem (de origem primária), de acordo com os padrões exigido pela legislação, porém outros são prejudiciais (fonte secundária), quando ocorre um aumento no número de colônias no alimento, e neste grupo há ainda aqueles produtores de micotoxinas (SIQUEIRA, 1995).

Nas cinco amostras de mel ocorreu o crescimento de fungos filamentosos, sendo identificados os gêneros *Penicillium* com maior frequência (19/63), o que representa 30,33%; *Paecilomyces* (14,29%); *Syncephalastrum* (11,11%) *Humicola* (9,53%); *Cladosporium* (4,76%); *Eurotium* (4,76%) e *Monodictys* (1,59%) e os não identificados (20,63%).

Os fungos filamentosos geralmente presentes no mel pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Eurotium*. Estes não se reproduzem no mel e caso ocorra uma contagem elevada de colônias, isto pode indicar uma contaminação recente do ambiente ou pelo uso dos equipamentos durante o processamento (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007). Vale ressaltar que nas amostras de méis analisadas nos dois períodos (tabela 2), ocorreu a presença dos gêneros *Penicillium* (30,33%) e *Eurotium* (4,76%).

Nas amostras de méis roraimenses (tabela 2) verificou-se a presença dos gêneros *Eurotium* na amostra A4/PC e *Penicillium* na amostra A4/PC, que são de grande importância toxigênica. Segundo Bando et al. (2007) a presença dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são indesejáveis no mel, pois algumas espécies são capazes de produzir enzimas que deterioram este alimento, bem como a produção de micotoxinas.

Aspergillus, fase anamórfica (estágio assexuado) de *Eurotium*, é responsável pela produção de uma micotoxina, chamada Aflatoxina, conforme Lacaz et al. (2002). Este gênero é agente patogênico oportunista, podendo causar uma doença denominada de Aspergilose, causada por diferentes espécies; são potentes agentes carcinogênicos, visto que podem produzir aflatoxinas em gêneros alimentícios.

Outro metabólito secundário tóxico produzido pelo gênero *Aspergillus* é a micotoxina denominada de ocratoxina, sendo uma das micotoxinas mais comumente produzidas. A presença desta toxina se encontra em diversos alimentos causando os efeitos nefrotóxicos, cancerígenos, imunotóxicos, teratogênicos e genotóxicos (BAU et al., 2005).

O gênero *Penicillium* esteve presente na amostra de mel A4/PC e representou 30,33% dos fungos filamentosos isolados. Ressalta-se que foi a amostras que apresentou maior quantidade de indivíduos fúngicos, distribuídos em seis morfotipos (*Penicillium* sp1, sp2, sp3, sp4, sp5 e sp6). Este gênero também

produz a micotoxina ocratoxina à temperatura máxima de 30°C (JAY, 2005). Os méis roraimenses sofrem esse tipo de influência da temperatura, pois o clima é tropical úmido e equatorial subúmido e a temperatura média está na faixa de mínima de 20°C e máxima de 38°C (BRASIL, 2010). Entretanto, este gênero aumentará a população caso ocorra mal procedimento desde o manejo até o armazenamento do mel.

Considerando que na amostra de mel roraimense ocorreu crescimento do fungo *Penicillium*, é importante comentar que algumas espécies deste gênero são agentes patogênicos oportunistas, podendo causar penicilioses, sendo relativamente raras. Algumas espécies são potentes produtores de micotoxinas e a ingestão de alimentos contaminados pode provocar intoxicações graves e fatais em animais e humanos, causando também distúrbios gastrintestinais (LACAZ et al., 2002).

Outro gênero presente nos méis roraimenses foi *Cladosporium*, registrado somente na amostra A3/PS, representando cerca de 4,76% dos isolados. As espécies de *Cladosporium* são contaminantes ambientais, dematiáceo e oportunista, estando relacionado com quadros de patologias em pacientes imunocomprometidos (MENEZES; LIMA, 2013).

De acordo com os dados da tabela 2, observa-se ainda que na amostra A4/PC o gênero *Paecilomyces* foi o segundo representante com maior frequência de indivíduos, com percentual de 14,29%, distribuído em três morfotipos, (*Paecilomyces* sp1, sp2 e sp3). As espécies de *Paecilomyces* são amplamente encontradas na natureza, sendo sapróbias e oportunistas; têm sido isoladas e identificadas de infecções em pacientes imunocomprometidos e transplantados renais. Na espécie *Paecilomyces* o estágio perfeito (teleomorfo) é *Byssochlamys* (LACAZ et al., 2002). Jay (2005) ressalta que a deterioração por fungos filamentosos em alimentos é menos comum, mas pode ocorrer quando as espécies como *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* estão presente em condições anormais.

O gênero *Syncephalastrum* representou 11,11% e, segundo Pitt; Hocking (2009), não são produtores de micotoxinas, e estão presentes em alimentos fermentados. O fato deste gênero estar presente na A4/PS, indica que possivelmente este mel encontrava-se em início de processo de fermentação, conforme aponta Jay (2005), que a deterioração por fungos filamentosos pode ocorrer em condições anormais do alimento.

O gênero *Humicola*, registrado somente na amostra A4/PC, com percentual de 9,53%, é fungo dematiáceo com relatos de que é endofítico presente no intestino de insetos (ELLIS, 2001). A presença deste fungo em amostra de mel roraimense pode estar relacionada às abelhas, ou seja, os fungos são de origem do intestino das abelhas.

Monodictys, fungo dematiáceo (ELLIS, 2001), esteve presente apenas na A2/PC, totalizando 1,59%. O gênero *Monodictys* está associado ao processo de decomposição da madeira e sua presença no mel roraimense pode ser explicada pelo fato das caixas “Langstroth” serem confeccionadas com madeira.

4.4.1 Características dos morfotipos de fungos filamentosos obtidos de amostras de méis roraimenses

As características morfológicas das colônias, como cor, verso e reverso da colônia, textura, superfície, aspecto, borda e produção de pigmento, foram analisadas e fotografadas. A identidade taxonômica foi baseada nos aspectos macromorfológicas das colônias e micromorfológicas por meio da técnica de microcultivo em lâmina (LACAZ et al., 2002) para a identificação de gêneros dos fungos filamentosos.

Após a identificação por meio do microcultivo em lâmina foram reconhecidos, através das suas estruturas de reprodução, os conídios por sua cor, forma e o tamanho, bem como pelos tipos de hifa dos fungos filamentosos, assim, obteve-se os seguintes resultados:

O *Penicillium* sp1, sp2, sp3, sp4, sp5 e sp6 (figura 4) foram observados morfotipos com algumas diferenças nas características macromorfológicas. No entanto, as estruturas micromorfológicas analisadas foram semelhantes, sendo identificados como gênero *Penicillium*, da divisão Deuteromycota (PITT; HOCKING, 2009).

O *Penicillium* sp1 verificou-se a presença de colônias de coloração verde azulada, com textura aveludada, com borda acinzentada e regular, reverso alaranjado, superfície rugosa com aspecto opaco, pigmento com coloração castanho escuro.

O *Penicillium* sp2 apresentou colônias aveludadas com coloração acinzentada, com borda branca e o reverso na cor castanho. A superfície é rugosa, com borda regular, aspecto opaco e pigmento com coloração castanho claro.

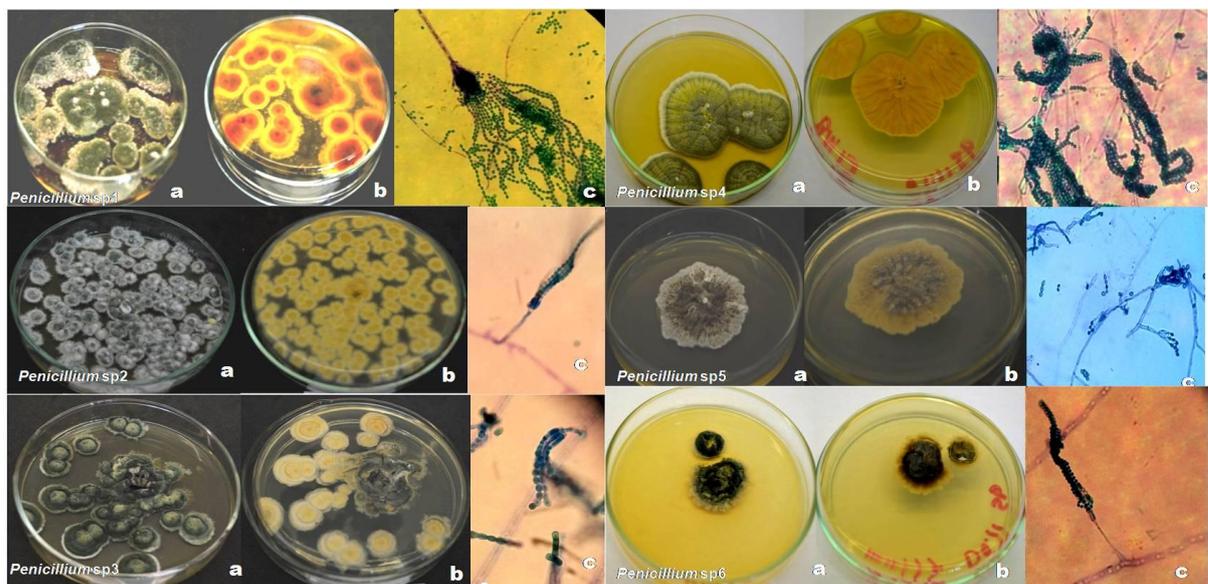
O *Penicillium* sp3 verificou-se colônia com textura aveludada a pulverulenta, com coloração amarelo escuro variando para verde azulado com bordas na cor branca. Reverso da colônia na cor bege escuro e difuso para a cor cinza, superfície rugosa com borda regular, aspecto opaco e o pigmento ausente.

O *Penicillium* sp4 apresentou colônias com textura aveludada, na coloração verde oliva, com borda branca e reverso bege a castanho claro, superfície fissurada com borda regular, aspecto úmido e pigmento na coloração amarelo.

O *Penicillium* sp5, apresentou colônia com textura aveludada, com coloração esverdeado no centro, com bordas brancas e irregulares, o reverso bege claro a escuro, a superfície é rugosa com o aspecto opaco e o pigmento ausente.

O *Penicillium* sp6 apresentou colônia com textura aveludada a pulverulenta com coloração amarela variando para verde azulado com a borda branca. O reverso bege escuro, a superfície é rugosa com borda regular, o aspecto é opaco e não apresentou pigmento.

Figura 4 – Características macromorfológicas e micromorfológicas do *Penicillium* sp1, sp2, sp3, sp4, sp5 e sp6, obtidos das amostras de méis do período chuvoso, em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso; (b) reverso da colônia; (c) estruturas microscópicas.



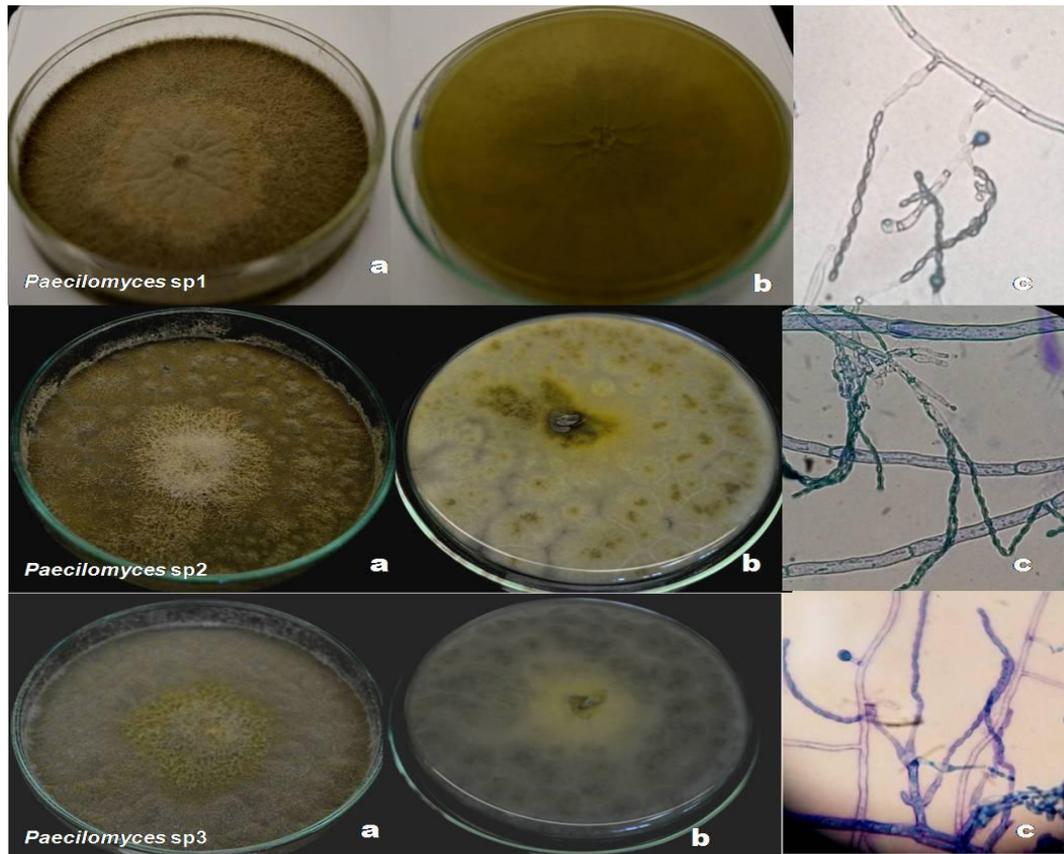
Fonte: Marcos Nogueira (2014).

À microscópica, os morfotipos apresentaram os conídios unicelulares, com coloração esverdeada, lisos a levemente rugosos, arredondados a elípticos. Os conidióforos são hialinos, eretos e ramificados dando a aparência de pincel, fiálides em forma de “garrafa” sustentando longas cadeias de conídios (PITT; HOCKING, 2009). Foi observada a predominância de estruturas monoverticiladas.

Nos *Paecilomyces* sp1, sp2, sp3 (figura 5) as características macromorfológicas revelaram colônias com textura veludada a cotonosa, centro de coloração esverdeada, reverso com coloração variando do amarelo para marrom, de acordo com tempo de crescimento da colônia, superfície lisa com aspecto opaco e pigmento com coloração marrom claro. Apesar das diferenças nas características macromorfológica, quando visualizado ao microscópico todas as estruturas são semelhantes.

As estruturas microscópicas verificadas foram os conídios unicelulares, lisos a levemente rugosos, arredondados e elípticos. Células conidiogênicas em fiálides dilatadas nas bases, afiladas nos ápices, com os conídios em longas cadeias foram observados. Conidióforos sem vesículas terminais apresentaram-se com ramificação divergente. As características macro e micromorfológicas destes fungos indicam o gênero *Paecilomyces*. Microscopicamente o gênero *Paecilomyces* tem grande semelhança com o *Penicillium*, o que dificulta a identificação taxonômica. Este fungo é considerado ubíquo, sapróbio e podendo ser oportunista.

Figura 5 – Características macromorfológicas dos *Paecilomyces* sp1, sp2 e sp3, obtidos das amostras de méis do período chuvoso, em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 40x e 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia. (c) estruturas microscópicas.



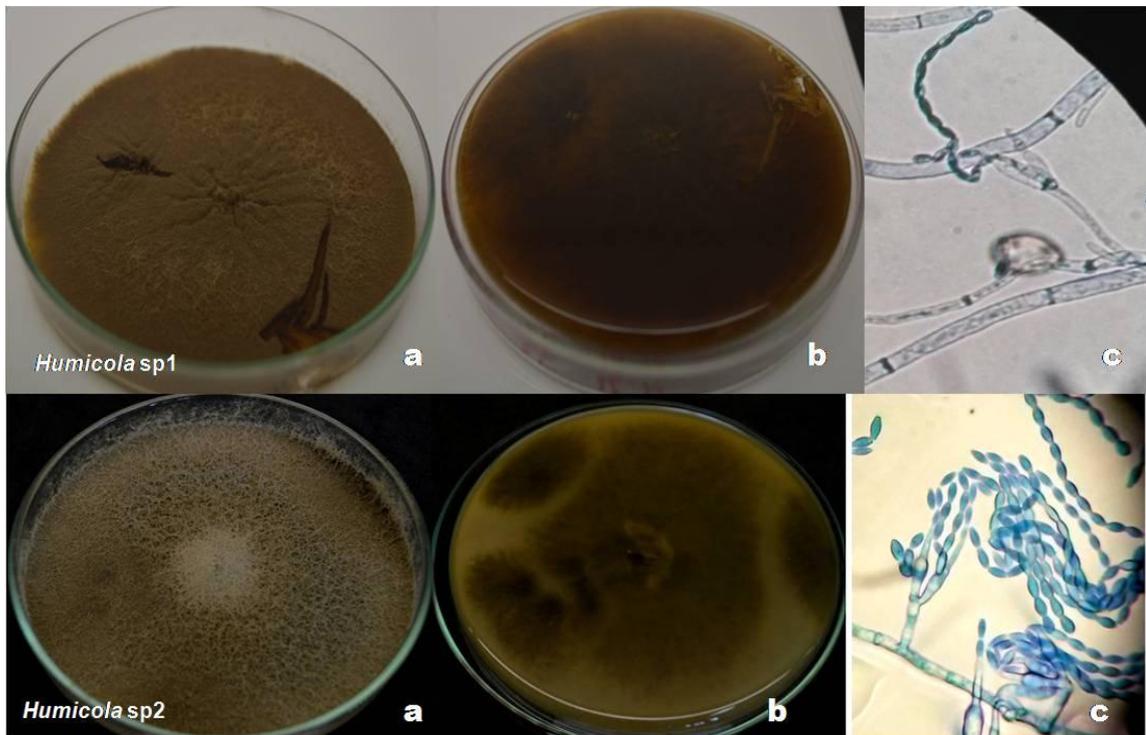
Fonte: Marcos Nogueira (2014).

O gênero *Humicola* sp1 e sp2 (figura 6) revelou fungos dematiáceos, com a textura cotonosa, verso da colônia na cor marrom, reverso com coloração variando do marrom escuro para marrom claro, a superfície é lisa com aspecto opaco e o pigmento com coloração amarelo ocre. As vezes a colônia jovem apresenta cor branco, alterando para cor cinza ou marrom escuro (ELLIS, 2001).

Quanto as características micromorfológicas, os morfotipos apresentaram os conidióforos escuros, eretos, delgados, curtos ou ausentes, septados, com base truncada simples com as extremidades contendo células conidiogênicas com grandes conídios lisos, globosos ou subglobosos a ovoides, com marcas em forma de anéis no ápice (LACAZ et al., 2002; PITT; HOCKING, 2009). Essas características, em conjunto, permitem uma distinção clara para a identidade destes fungos ao gênero *Humicola*.

Figura 6 - Características macromorfológicas e micromorfológicas do *Humicola* sp1 e sp2 obtidos das amostras de méis do período chuvoso em meio Sabouraud. Cultivo

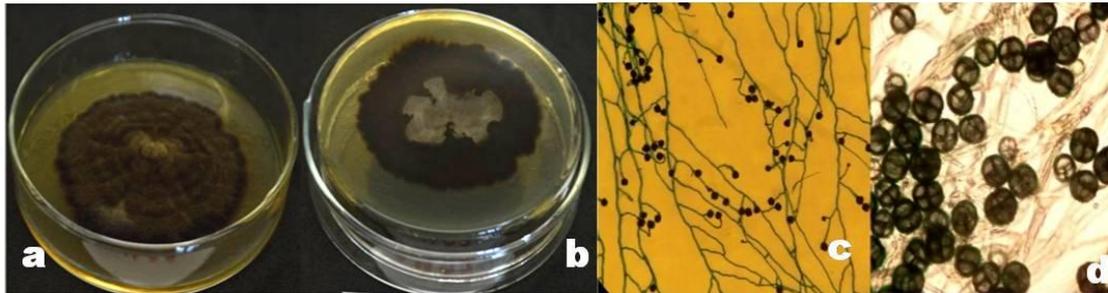
em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; (c) estruturas microscópicas.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

As características macromorfológicas do gênero *Syncephalastrum* da amostra A2/PC (figura 7) revelam colônia de coloração marrom escuro, com textura aveludada, reverso na cor marrom escuro. A superfície é fissurada com borda regular, de aspecto opaco e com pigmento na cor marrom claro. De acordo com as características microscópicas, este fungo apresentou conídios simples, solitários, arredondados nas extremidades, piriformes, verrucosos, com septos transversais e longitudinais. Os conidióforos são macronematosos ou semi-macronematosos, normalmente retos, flexuosos e lisos (ELLIS, 2001). As características macro e micromorfológicas indicam que o morfotipos pertence ao gênero *Monodictys*.

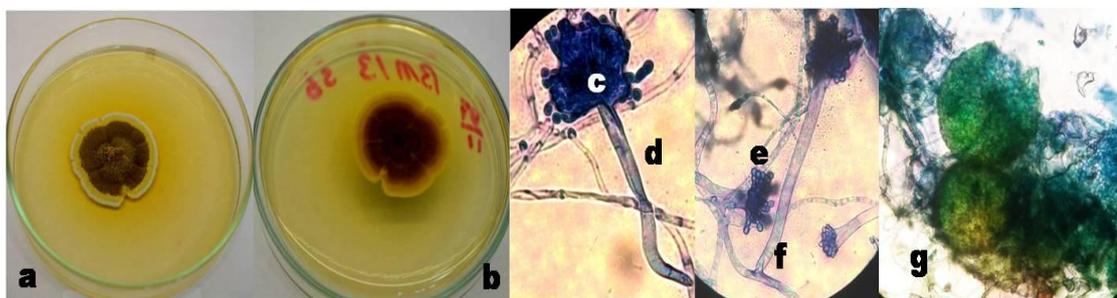
Figura 7 – Características macromorfológicas e micromorfológicas do gênero *Monodictys* obtidos da amostra de mel do período chuvoso em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 40x e 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; (c) Conidióforo; (d) Conídios.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

O gênero *Eurotium* (figura 8) apresentou colônia com a coloração esverdeada no centro, com duas finas margem na cor amarelo claro e branco, com textura pulverulenta aveludada, reverso variando do amarelo a laranja, superfície rugosa, com borda regular e o pigmento com coloração amarelo claro. Dentre as características micromorfológicas, foi observado conidióforos hialinos eretos, não ramificados, terminando em dilatação globosa (vesícula), de onde nascem fiáldes em toda a superfície, em disposição radiada. Os conídios são globosos e lisos. Célula-pé visível na porção basal do conidióforo. Cleistotécios amarelo brilhante presentes. Segundo Jay (2005), quando há ocorrência de cleistotécios com ascóporos, o fungo é chamado de *Eurotium* (estado teleomórfico de *Aspergillus*), todas as espécies são xerofílicas e crescem em uma faixa maior de pH.

Figura 8 – Características macromorfológicas e micromorfológicas gênero *Eurotium*, obtidos das amostras de méis do período chuvoso em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; (c) Vesícula; (d) Conidióforo; (e) Conídios; (f) Célula-pé; (g) Cleistotécios.



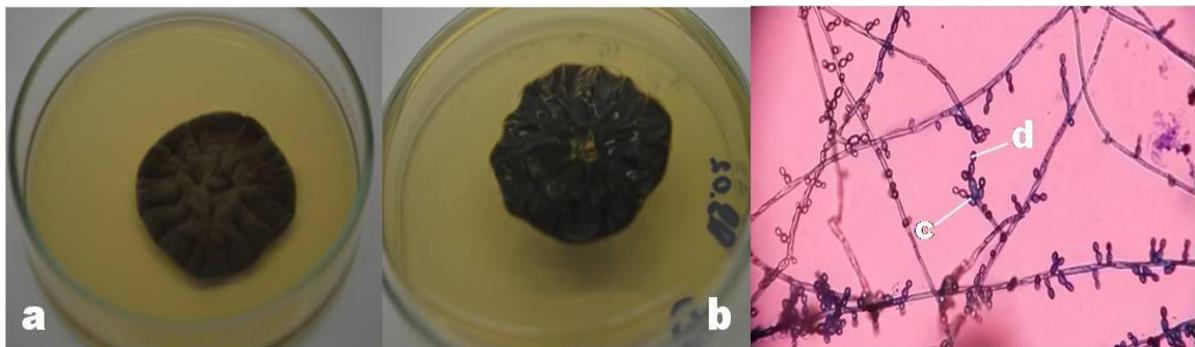
Fonte: Marcos Nogueira (2014).

O gênero *Cladosporium* (figura 9) apresentou colônia com textura aveludada e com coloração verde oliva a negro no centro e amarelo nas bordas. O reverso

verde escuro, superfície é rugosa com borda irregular, aspecto opaco e com pigmento ausente.

A micromorfologia evidenciou os conidióforos escuro, septados, ramificados no ápice. Os conídios são escuros, unicelulares ou bicelulares, variável quanto à forma e o tamanho, ovóides, cilíndricos, em forma de limão ou irregulares com curtas cadeias de conídios (PITT; HOCKING, 2009).

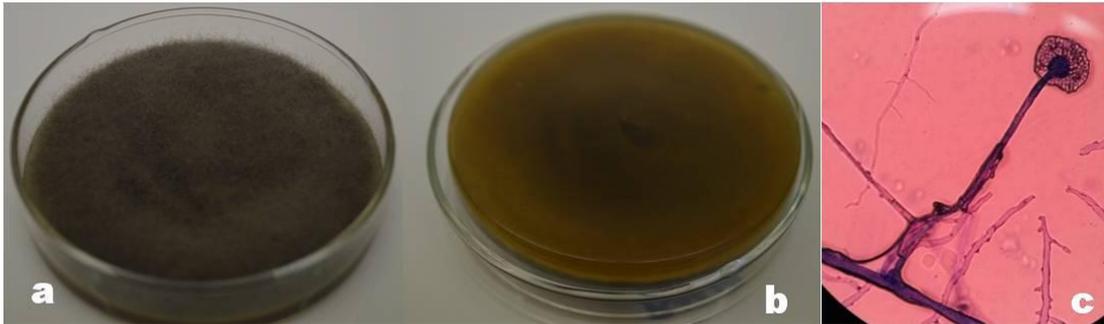
Figura 9 – Características macromorfológicas e micromorfológicas gênero *Cladosporium* obtidos das amostras de méis do período seco em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia; c); Conidióforo d) Conídios.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

O gênero *Syncephalastrum* (figura 10), apresentou colônia com textura cotonosa, com coloração cinza escuro, com reverso negro e borda regular, aspecto úmido, com pigmento ausente. Quanto as características microscópicas apresentadas em lâmina verificou-se esporangióforos curtos, eretos, ramificados, com extremidades terminando em dilatação de onde nascem o esporangióolos (merosporângios) cilíndricos, de membrana evanescente, os quais produzem uma cadeia de esporos esféricos. Os esporangiosporos são liberados pela ruptura ou dissolução da parede dos esporangióolos (PITT; HOCKING, 2009). Estas características pertencem ao gênero *Syncephalastrum*, classe dos Zygomycetes.

Figura 10 – Características macromorfológicas e micromorfológicas do gênero *Syncephalastrum*, obtidos das amostras de méis do período seco em meio Sabouraud. Cultivo em lâmina corado com azul de metileno na resolução de 100x. (a) Verso da colônia; (b) Reverso da colônia; (c) estrutura microscópicas.

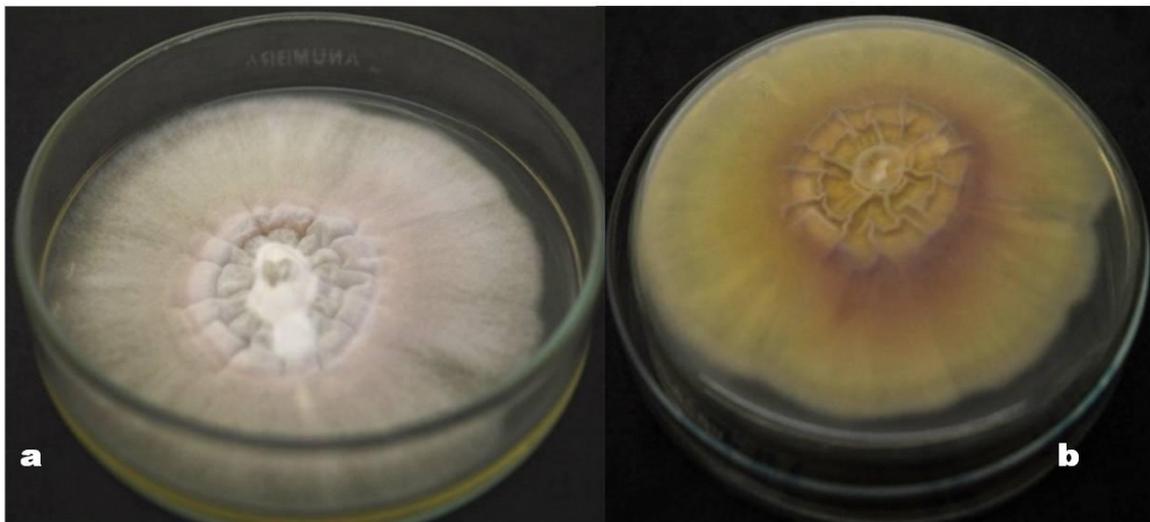


Fonte: Marcos Nogueira (2014).

Os morfotipos BM03, BM04, BM12 e o BM14 não foram identificados pelo método tradicional devido à ausência de esporos no cultivo em lâmina, sendo descritas apenas as características macromorfológicas.

O morfotipo BM03 (figura 11) apresenta colônia com textura aveludada, com coloração branca variando para rosa, reverso da colônia na cor bege, com centro rugoso com coloração rosada, superfície fissurada com borda regular, aspecto opaco e pigmento ausente.

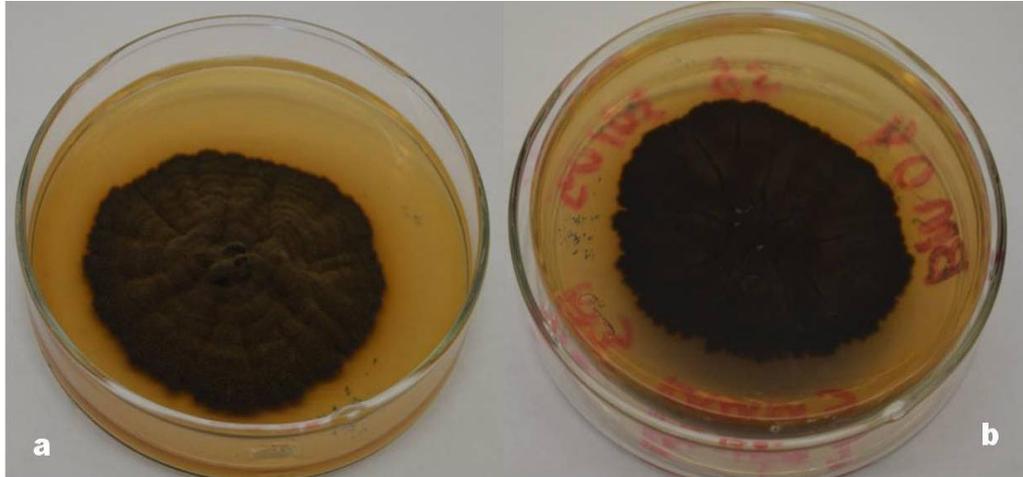
Figura 11 – Características macromorfológicas do fungo filamentosso BM03, obtido de amostra de mel do período chuvoso, em meio Sabouraud.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

As características macroscópicas do morfotipo BM04 (figura 12) mostraram colônia de textura aveludada, com verso e reverso de coloração marrom escuro, a superfície fissurada com borda regular, aspecto opaco e com pigmento na cor marrom claro.

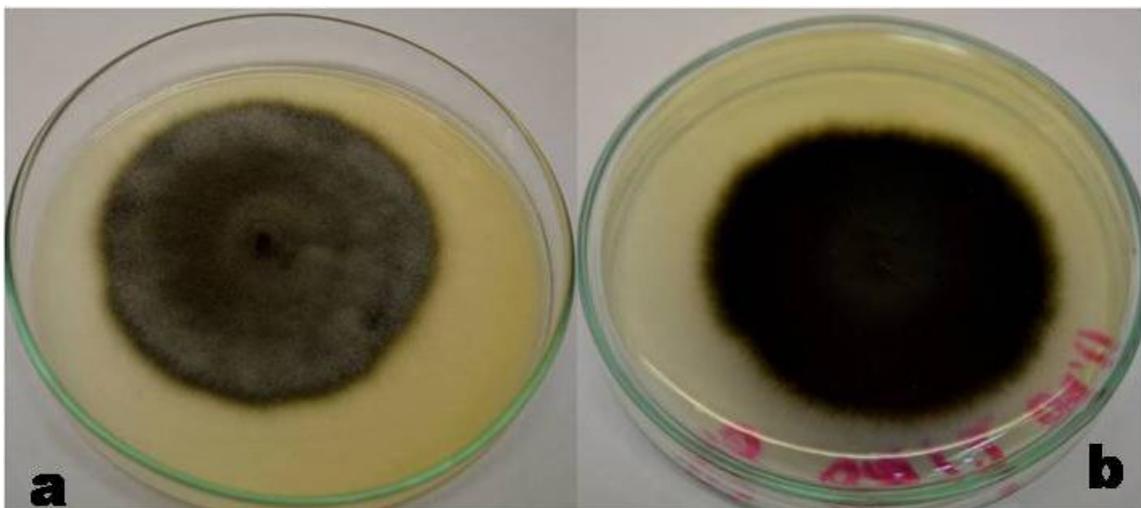
Figura 12 - Características macromorfológicas e micromorfológicas do fungo filamentosso BM04, obtido de amostra de mel do período chuvoso, em meio Sabouraud.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

O morfotipo BM12 (figura 13) apresentou colônia com coloração cinza, com textura veludosa, reverso negro, superfície lisa com borda regular, aspecto opaco e pigmento ausente.

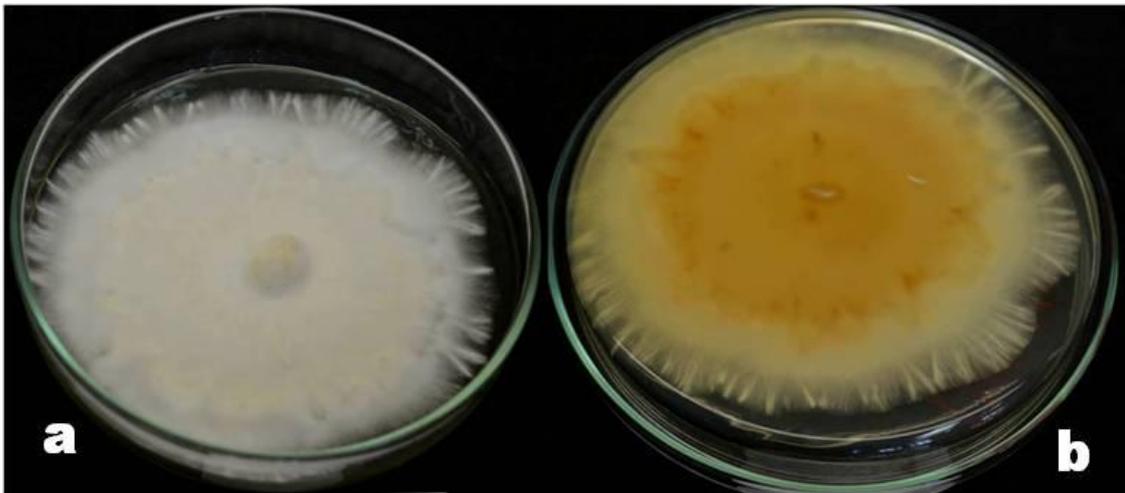
Figura 13 – Características macromorfológicas do fungo filamentosso BM12, obtido de amostra de mel do período chuvoso, em meio Sabouraud. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

O morfotipo BM14 (figura 14) possui colônia com textura cotonosa, com coloração branca, com borda irregular, reverso amarelo claro, superfície umbilicada com aspecto opaco e pigmento ausente.

Figura 14 – Características macromorfológicas do fungo filamentoso BM14, obtido de amostra de mel do período chuvoso, em meio Sabouraud. (a) verso da colônia; (b) reverso da colônia.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

A dificuldade para identificação dos fungos, consiste na caracterização da morfológica e requer experiência. A análise macroscópica e microscópica dos fungos filamentosos nos auxiliam na distinção taxonômica em nível de gênero, como observado nesta pesquisa. Dessa forma, torna-se relevante estudo que complemente as métodos convencionais. A caracterização molecular é uma das ferramenta para identificar a real identidade em nível de espécie desses micro-organismos.

4.4.2 Identificação molecular dos fungos filamentosos isolados dos méis roraimenses

Os 19 morfotipos isolados de amostras de méis roraimenses foram identificadas por meio do sequenciamento da região ITS.

4.4.2.1 Avaliação eletroforética da extração de DNA dos fungos filamentosos obtidos dos méis roraimenses

A extração do DNA dos fungos filamentosos em estudo foi realizada com modificações conforme o protocolo de Hoog et al. (2005), para verificar a qualidade das amostras do DNA extraído.

O processo de extração de DNA nos fungos filamentosos é complexo, pois os meios de cultura e a maioria das espécies possuem grande quantidade de polifenóis e polissacarídeos, os quais podem ser co-extraídos, gerando impurezas na molécula de DNA e interferências na reação de amplificação. Outra dificuldade está relacionada ao fato de apresentarem parede celular rígida, formada por quitina, polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação, dificultando a lise celular durante a extração, o que gera, na maioria das vezes, a fragmentação ou a degradação do DNA e perda da qualidade da molécula (ADAMS, 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

Neste trabalho, foram necessárias modificações no protocolo de Hoog et al. (2005), como segue: os fragmentos de micélio foram colocados diretamente no cadinho congelado a -80°C e com uma alça de platina foi realizado a raspagem dos micélios, foram macerados com o auxílio de um pistilo; adição de álcool isopropanol após repouso deste por 15 minutos a -4°C ; adição de $5\ \mu\text{L}$ de RNase por amostra de DNA, 24 horas após a extração, durante 60 minutos em banho-maria a 37°C . Esta modificação foi utilizada para aumentar o grau de pureza das amostras de DNA dos fungos filamentosos.

Assim, o método descrito por Hoog et al. (2005) se mostrou eficiente no processo de lise das células, após as modificações, e possibilitou a extração do DNA de 16/19 morfotipos de fungos filamentosos isolados dos méis roraimenses. As Figuras 15 e 16 representam géis de agarose a 1% contendo o DNA extraído dos fungos filamentosos.

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA extraído dos fungos filamentosos, 1. BM01, 2. BM04, 3. BM06, 4. BM08, 5. BM12, 6. BM013, 7. BM016, 8. BM17, 9. BM018, 10. BM19, 11. BM19.

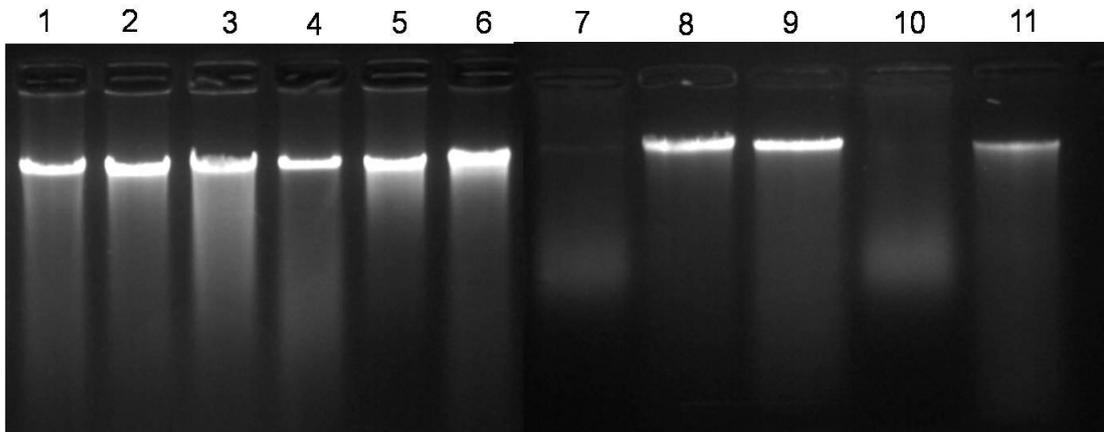
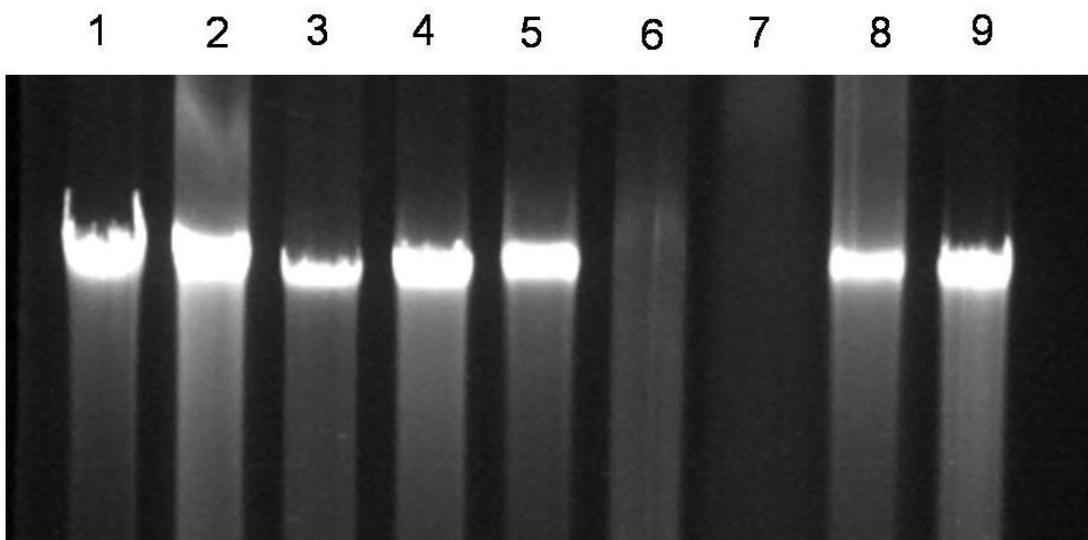


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA extraído dos fungos filamentosos. 1. BM02, 2. BM03, 3. BM05, 4. BM07, 5. BM09, 6. BM10, 7. BM11, 8. BM14, 9. BM15, 10. BM019, 11. BM19.



Pode-se observar que nos morfotipos BM16, BM19 (figura 15), BM10 e BM11 (figura 16) não houve presença de DNA, indicado pela ausência de banda. Nas demais amostras uma banda única, bem definida, pode ser visualizada, indicando a presença do DNA de boa qualidade, garantindo desde modo, que o procedimento da PCR pode ser realizado. O fato do morfotipo BM19 estar presente duas vezes no mesmo gel (figura 16) se deve à grande quantidade de DNA extraído.

4.4.2.2 Quantificação do DNA genômico

A tabela 3 apresenta as concentrações de DNA obtidas dos 19 morfotipos de fungos filamentosos, bem como a absorvância em 260 e 280 nm (relação A260/280) após análise em espectrofotômetro.

Tabela 3 - Valores de absorvância obtidos das amostras de DNA dos fungos filamentosos isolados dos méis roraimenses.

Morfotipos	A260 nm	A280nm	A260/A280
BM01	0,928	0,429	2,22
BM02	1,293	0,623	2,16
BM03	1,699	0,748	2,28
BM04	1,080	0,554	2,04
BM05	0,181	0,109	1,82
BM06	0,718	0,349	2,15
BM07	0,785	0,360	2,22
BM08	0,731	0,337	2,19
BM09	0,251	0,127	2,01
BM10	0,145	0,127	1,39
BM11	0,307	0,188	1,88
BM12	0,588	0,299	2,03
BM13	0,601	0,302	2,04
BM14	0,082	0,080	1,03
BM15	0,046	0,036	1,38
BM16	0,232	0,116	2,02
BM17	-	0,650	-
BM18	1,337	0,629	2,18
BM19	0,938	0,453	2,16

Ferreira e Grattapaglia (1998) discorrem que o DNA absorve luz no comprimento de onda de 260nm e as proteínas no comprimento de onda de 280nm. Nesse sentido, a relação de absorvância 260nm/280nm fornece um parâmetro de qualidade do DNA. Romano (1998) diz que o DNA é considerado puro quando apresenta uma razão entre 1,8 a 2,0 e que dentro desses limites indicam grau de pureza desejável; mas se a razão for menor que 1,8 significa contaminação por proteínas e razão maior que 2,0 por fenol ou polifenóis.

Neste trabalho, como se pode verificar na tabela 3, as amostras de DNA apresentaram grau de pureza que variou de 1,03 a 2,28. As amostras de DNA dos morfotipos BM05 e BM11 foram as únicas que apresentaram maior grau de pureza, com a razão de absorvância 1,82 e 1,88 respectivamente. As demais amostras, possivelmente estejam contaminados por polifenóis, isto é, contaminação da própria célula do fungo, ou contaminadas por proteínas. Estes resultados evidenciam a complexidade de extração de DNA das células fúngicas, conforme apontam Adams (2004) e Oliveira et al. (2005).

4.4.2.3 Amplificação por PCR e sequenciamento da região ITS do rDNA dos fungos filamentosos obtidos dos méis roraimenses

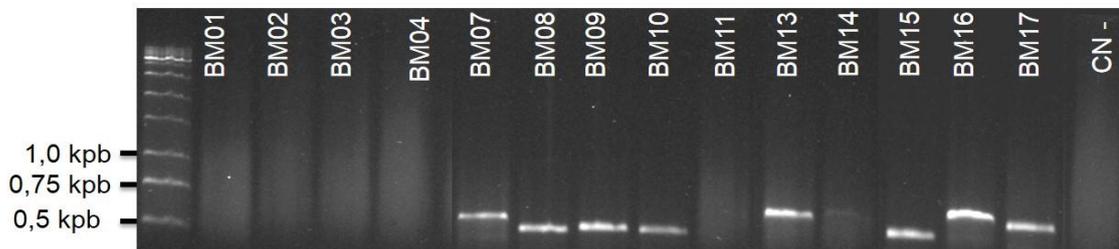
A qualidade do DNA ribossomal (rDNA) dos morfotipos foi avaliada por meio da comparação visual de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo utilizado o padrão de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Ludwig). O surgimento de uma única banda íntegra de alto peso molecular indica que o processo de extração do DNA foi bem sucedido, e que o mesmo não se encontrou degradado.

Para os cálculos da concentração do DNA considerou-se o padrão de uma unidade de absorvância A_{260nm}, com a concentração final de 50 ng/μL da amostra de DNA. Todas as amostras foram colocadas no termociclador com os ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação, como descrito no item 3.6.2.2.

O DNA ribossomal (rDNA), que compreende a região ITS1-5.8S-ITS2 de cada morfotipos dos fungos filamentosos obtidos das amostras de méis roraimenses, foi amplificado na maioria das amostras, usando os primers universais ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990).

Após amplificação, os produtos da PCR foram avaliados através da visualização em gel de agarose 1% (figura 17) e revelaram fragmentos em uma única banda, na ordem de 600 a 900 pares de bases (tabela 4), o que confirma a existência de diferentes morfotipos.

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos amplificados na PCR dos fungos filamentosos, BM01, BM02, BM03, BM04, BM07, BM08, BM09, BM10, BM11, BM13, BM14, BM15, BM16 e BM17; CN- Controle negativo.



Para confirmação da eficiência na identificação dos morfotipos de fungos filamentosos obtidos das amostras de méis roraimenses, por meio da quantidade de pares de bases, as amostras foram sequenciadas e analisadas molecularmente e os dados apresentados na tabela 4. As sequências de bases nitrogenadas obtidas foram analisadas com o programa *software* MEGA5. Com o programa BLAST, do GenBank, realizou-se uma pesquisa cuja comparação ocorreu entre os dados obtidos neste trabalho e os que já se encontram no banco de dados, o que permitiu a caracterização e índice de similaridade dos morfotipos de fungos filamentosos com uma porcentagem de identidade variando de 95 a 100%.

Tabela 4 – Caracterização convencional e molecular dos morfotipos dos fungos filamentosos com suas respectivas quantidades de pares de bases dos fragmentos amplificados

Código	Identificação Convencional	Tamanho do fragmento	Identificação Molecular
BM01	<i>Penicillium</i> sp1	800 pb	<i>Talaromyces mineoluteum</i>
BM05	<i>Paecilomyces</i> sp1	825 pb	<i>Paecilomyces formosus</i>
BM07	<i>Penicillium</i> sp3	690 pb	<i>Penicillium hispanicum</i>
BM08	<i>Humicola</i>	825 pb	<i>Paecilomyces formosus</i>
BM09	<i>Paecilomyces</i> sp2	825 pb	<i>Paecilomyces formosus</i>
BM12	*Não identificado	700 pb	<i>Eurotium rubrum</i>
BM13	<i>Eurotium</i>	600 pb	<i>Eurotium amstelodami</i>
BM15	<i>Penicillium</i> sp4	900 pb	<i>Penicillium citreonigrum</i>
BM16	<i>Penicillium</i> sp5	819 pb	<i>Talaromyces phialosporus</i>
BM17	<i>Penicillium</i> sp6	819 pb	<i>Talaromyces phialosporus</i>
BM18	<i>Cladosporium</i>	711 pb	<i>Paecilomyces formosus</i>
BM19	<i>Syncephalastrum</i>	680 pb	<i>Syncephalastrum racemosum</i>

*Não identificado pelo método convencional.

Dos 19 morfotipos identificados pelo método convencional, obteve-se a amplificação do fragmento de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 em cerca de 63% (12/19) dos isolados, mesmo com a complexidade de extrair o DNA dos fungos filamentosos. O que representa identificação ao nível de espécie de 12 morfotipos (tabela 4), e 68,25% do número total de indivíduos referidos na tabela 2.

De acordo com resultados da tabela 4, os 12 morfotipos identificados por meio da técnica molecular representam oito espécies, distribuídas em cinco gêneros: *Eurotium* (*E. amstelodami* e *E. rubrum*); *Paecilomyces* (*P. formosus*); *Penicillium* (*P. citreonigrum* e *P. hispanicum*); *Syncephalastrum* (*S. racemosum*) e *Talaromyces* (*T. mineoluteum* e *T. phialosporus*).

O morfotipo identificado inicialmente como *Penicillium* sp1, por apresentar apenas estruturas assexuadas, foi confirmado *Talaromyces minioluteus*, por meio do sequenciamento. Da mesma maneira, os morfotipos identificados inicialmente *Penicillium* sp5 e *Penicillium* sp6, são considerados *Talaromyces phialosporus*, por meio da identificação molecular. Embora *Talaromyces* represente ciclo sexuado (teleomórfico) de *Penicillium*, de acordo com novo Código de Nomenclatura de algas, fungos e plantas, é válido afirmar que são gêneros distintos (PRADO; HIRAI; GIULIETTI, 2011). Assim, estes dados não representam um equívoco de identificação taxonomica.

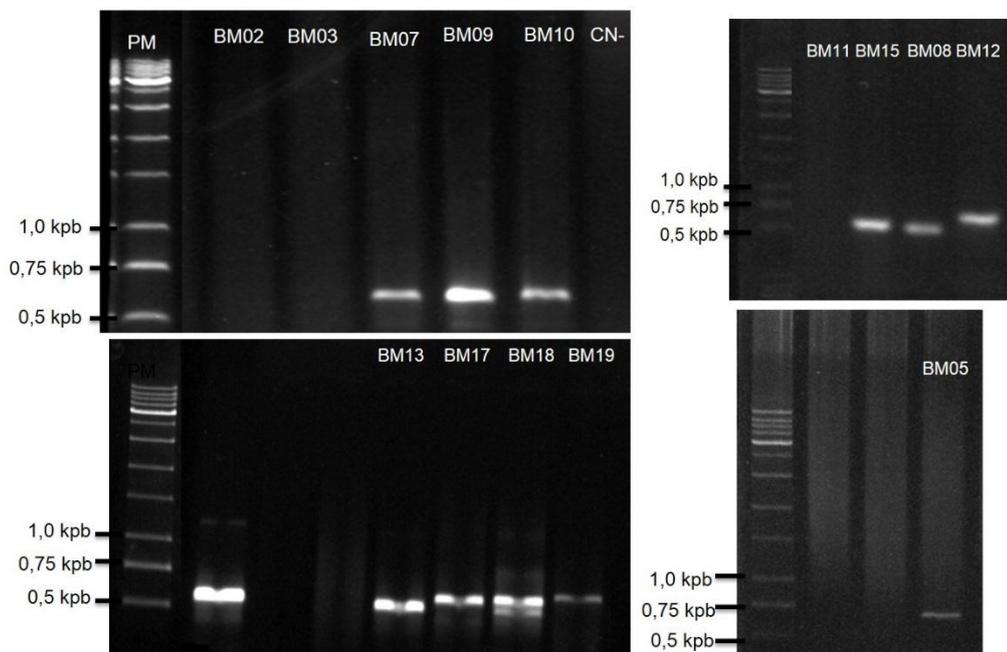
O *Penicillium* sp5 e *Penicillium* sp6 foram identificados como morfotipos diferentes pelo método convencional devido ao fato de variação na morfologia das colônias. Por outro lado, *Penicillium* sp3 e *Penicillium* sp4 foram identificados como sendo, de fato, espécies distintas, *P. citreonigrum* e *P. hispanicum*, respectivamente, pela identificação molecular com os iniciadores universais ITS1 e ITS4. Assim, as análises de fragmentos gerados a partir de produtos amplificados por PCR e as sequências verificadas no banco de dados GenBank vem tornando-se uma ferramenta adequada para estudos taxonômicos e diferenciação entre espécies (OLIVEIRA et al., 2015).

Os morfotipos *Paecilomyces* sp1 e *Paecilomyces* sp2, *Humicola* sp1 e *Cladosporium* sp. (figura 18) identificados convencionalmente, por meio da análise molecular foram todos identificados como sendo a mesma espécie, *Paecilomyces formosus*. Este equívoco na identificação de gêneros pode ser atribuído ao fato do morfotipo *Humicola* sp1 apresentar estruturas microscópicas semelhantes ao gênero

Paecilomyces, como a disposição dos conidióforos e conídios em uma das espécies do gênero *Humicola*. Assim, a biologia molecular se dispõe na busca de maior precisão e rapidez na identificação ao nível de espécie.

Em relação ao *Cladosporium* sp. o que chama a atenção é a diferença no número de pares de bases; enquanto este apresentou 711 pb, *Paecilomyces* sp1, *Humicola* sp1 e *Paecilomyces* sp2, apresentaram 825 pb. Este resultado pode ser justificado pela presença de uma banda dupla visualizada na eletroforese após a amplificação do DNA do *Cladosporium* sp. Segundo Janse, Bok e Zwart (2004) a formação de banda dupla ocorre durante o processo da PCR, quando algum produto secundário é formado devido a uma interrupção precoce na elongação, obstruindo a taq polimerase; assim, a incubação final de 30 minutos para elongação a temperaturas altas pode destruir as tais estruturas secundárias e ao mesmo tempo permitir que a taq complete a elongação. Ou pode ter ocorrido contaminação por outro fungo da amostra extraída, resultando em dois tipos diferentes de fungos.

Figura 18 – Perfis eletroforéticos em gel de agarose 1% dos produtos amplificados referente às amostras de DNA dos fungos filamentosos obtidos das amostras analisadas de méis roraimenses.



Legenda: BM02 - *Monodictys* sp.; BM03 - Não identificado; BM05 - *Paecilomyces formosus*; BM07- *Penicillium hispanicum*; BM08 - *Paecilomyces formosus*; BM09 - *Paecilomyces formosus*; BM10 - *Humicola* sp.; BM11- Não identificado; BM15 - *Penicillium citreonigrum*; BM12 - *Eurotium rubrum*; BM13 - *Eurotium amstelodami*; BM17- *Talaromyces phialosporus*; BM18 - *Cladosporium* sp.; e BM19 *Syncephalastrum racemosum*.

Por outro lado, a banda dupla pode ter influenciado o resultado no momento da comparação das sequências obtidas com o banco de dados Genbank. Fungaro (2000) afirma que a presença da banda dupla é considerado contaminação, ou seja, existência de impurezas na amostra de DNA podem, eventualmente, inibir a ação da taq polimerase, resultando em um diagnóstico falso negativo. Neste caso, prevalecerá a identificação taxonômica do morfotipo BM18 pelo método convencional, como gênero *Cladosporium*, sendo consideradas as características macromorfológicas e micromorfológicas.

Em relação a comparação dos métodos convencionais e moleculares, a biologia molecular nos fornece uma taxonomia mais precisa na sistemática de fungos filamentosos, verificando a real identidade dos morfotipos, assegurando uma caracterização dos fungos filamentosos obtidos nas amostras de méis roraimenses. Segundo Fungaro (2000), a técnica molecular desenvolvida a partir de PCR, têm sido uma ferramenta útil na identificação de vários organismos, dentre eles os fungos filamentosos. A região ITS é amplamente utilizada, pois é uma região altamente conservada intra-específica, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção ao nível específico.

Verificar a real identidade dos morfotipos de fungos filamentosos presentes nos méis roraimenses, consiste em proporcionar aos consumidores um alimento seguro. Dentre as espécies identificadas pelo método molecular destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Talaromyces*, visto que são fungos potencialmente toxigênicos, ou seja, são capazes de produzir micotoxinas caso o mel seja manipulado em condições inadequadas de higiene e/ou durante o acondicionamento dos produtos armazenados, influenciados pela temperatura ou adulteração do mel.

Nas amostras analisadas nesta pesquisa, em ambos os períodos, com base nos dados da tabela 5, a caracterização molecular e a identificação mostraram a espécie: *T. mineoluteum* na amostra A2/PC; *Cladosporium* sp. na amostra A3/PC; *Syncephalastrum racemosum* na amostra A4/PS e na amostra A4/PC constatou-se o maior número de espécies: *E. amstelodami*, *E. rubrum*, *P. formosus*, *P. citreonigrum*, *P. hispanicum*, *Syncephalastrum racemosum*, *T. mineoluteum*, e *T. phialosporus*.

Tabela 5 – Ocorrência dos fungos filamentosos em méis roraimenses por período e percentual de ocorrência

Código	Morfortipos	Número de colônias				%
		PC		PS		
		A2	A4	A3	A4	
BM13	<i>Eurotium amstelodami</i>		3			4,76
BM12	<i>Eurotium rubrum</i>		3			4,76
BM05, BM08, BM09	<i>Paecilomyces formosus</i>		9			14,29
BM18	<i>Cladosporium</i> sp.			3		4,76
BM15	<i>Penicillium citreonigrum</i>		3			4,76
BM07	<i>Penicillium hispanicum</i>		3			4,76
BM19	<i>Syncephalastrum racemosum</i>				7	11,11
BM01	<i>Talaromyces mineoluteum</i>	2				3,18
BM16 BM17	<i>Talaromyces philosporus</i>		10			15,87

O *Talaromyces philosporus* foi o mais frequente (10/63), representando 15,87% do total dos isolados, seguido de *Paecilomyces formosus* com 14,29% e *Syncephalastrum racemosum* com 11,11%. *T. mineoluteum* foi o menos frequente, com apenas duas colônias, representando 3,18% e os demais representaram 4,76% cada. Os morfortipos não identificados por não ter ocorrido amplificação, provavelmente por contaminação das amostras de DNA por polifénois, representam 31,75%.

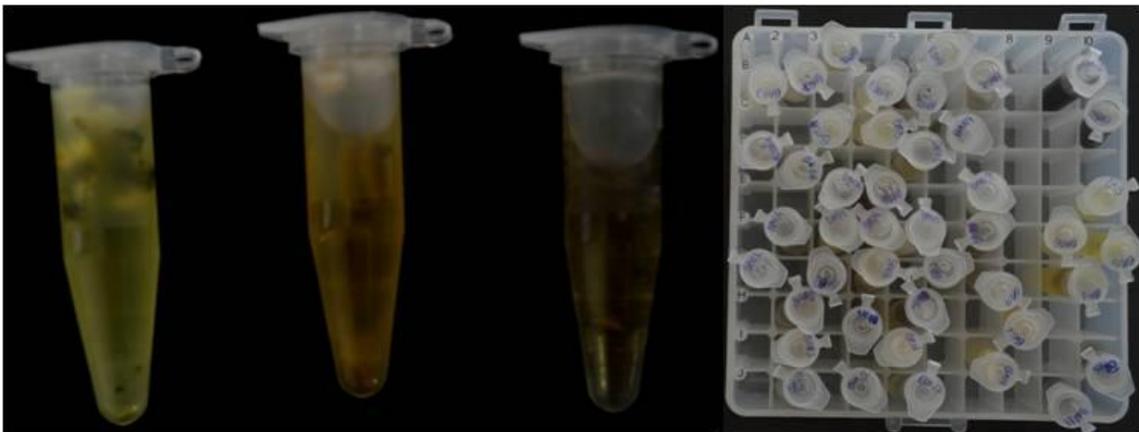
Observa-se que o gênero com maior frequência identificado molecularmente, presente nas amostras de méis roraimenses analisadas, foi o *Penicillium*, juntamente com seu teleomorfo *Talaromyces*, os quais produzem as micotoxinas: ocratoxina, patulina, citrina, rubratoxina, citreoviridina, ácidos penicílico, viridina e rugolina, responsáveis pela intoxicação de seres humanos e animais, quando se utilizam de alimentos eventualmente contaminados por espécies deste gênero. O *Paecilomyces* produz a micotoxina patulina possui efeitos cardiotoxicidade e neurotoxicidade. O *Eurotium* sendo telemórfico do *Aspergillus*, é responsável pela produção das micotoxinas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina, patulina, ácido kójico e matorizina. Todas estas micotoxinas tem efeitos são teratogênico, mutagênicos e carcinogênicos dependendo da quantidade ingerida por alimentos

contaminados. A presença do *Syncephalastrum* no mel pode estar relacionada a deterioração em alimentos fermentados (PITT; HOCKING, 2009).

4.5 Preservação dos fungos filamentosos obtidos das amostras de méis roraimenses

Para preservação dos morfotipos dos fungos filamentosos, obtidos das amostras de méis analisadas nos períodos chuvoso e seco, foi utilizado o método de Castellani (figura 19) para conservar o estado inicial dos micro-organismos evitando mutações indesejáveis.

Figura 19 – Fungos filamentosos obtidos de amostras de méis roraimenses analisadas no período chuvoso e período seco preservados em água destiladas.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

Os morfotipos foram preservados em tubos com meio Sb inclinado (figura 20) para conservar as características macromorfológicas. Os dois métodos visam alcançar a máxima preservação da vitalidade das células. As preservações de cepas são de longo prazo em temperatura ambiente (GIRÃO et al., 2004).

Figura 20 – Fungos filamentosos obtidos de amostras de méis roraimenses analisadas no período chuvoso e período seco preservados em meios Saubourad.



Fonte: Marcos Nogueira (2014).

5 CONCLUSÕES

O meio BDA não foi eficiente para isolar fungos filamentosos e leveduras das amostras de méis do estado de Roraima, isolados em meio Sabouraud.

Os fungos filamentosos e/ou leveduras estão presentes nas amostras dos méis roraimenses coletadas tanto no período seco quanto no período chuvoso, sendo prevalente a ocorrência de leveduras.

As amostras de méis coletadas nos municípios estudados são próprias para consumo humano, com exceção de uma amostra que não atendeu à legislação.

As amostras de méis de marca comercial e do Apiário Experimental da UFRR foram enquadradas como próprias para o consumo.

Amostras de méis oriundas de apiários artesanais apresentaram condições impróprias para o consumo (Mucajaí) ou qualidade preocupante (Cantá), devido a presença de fungos potencialmente toxigênicos.

Os morfotipos identificados pertencem aos gêneros *Penicillium*; *Paecilomyces*, *Syncephalastrum*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Eurotium* e *Monodictys*, e as espécies *Eurotium amstelodami*, *E. rubrum*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium citreonigrum*, *P. hispanicum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Talaromyces mineoluteum* e *T. phialosporus*.

Os gêneros e espécies identificadas são potencialmente toxigênicos, com exceção de *Syncephalastrum*.

Fungos toxigênicos foram detectados nas amostras de méis proveniente dos municípios de Boa Vista, Cantá e Mucajaí, nos períodos estudados.

Os parâmetros micológicos observados nas amostras reforçam a necessidade do controle de qualidade dos méis na região, bem como da implantação de Boas Práticas Apícolas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, Reading, v. 15, n. 7, p. 2029-2035, 2004.
- ALVES, E. M. et al. Presença de coliformes, bolores e leveduras em amostras de mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas do Alto Rio Paraná. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2222-2224, out. 2009.
- ALVES, R. M. O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 644-650, out./dez. 2005.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Washington, v.6, p. 769-779. abr./maio, 2004.
- ANDRADE, R. M.; NASCIMENTO, J. S. Presença de fungos filamentosos em ração para cães comercializadas na cidade de Pelotas, RS. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v.72, n.2, p.10-12, 2005.
- ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D.; SOUSA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, [s.l.] v. 6, n. 1, p. 53-55, 2006.
- AROUCHA, E. M. M. et al. Qualidade do mel de abelha produzidos pelos incubados da *iagram* e comercializado no município de Mossoró/RN. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n.1, p.211- 217, jan./mar. 2008.
- BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 175-180, jun. 2007.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Ilustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. New York: Macmillan Publishin Company, 1987. 241p.
- BARBOSA, A. M.; LOPES, G. N.; BARBOSA, J. B. F. Análise econômica da apicultura no estado de Roraima. **Revista Assuntos Conexos – Interdisciplinary Subjects**, v. 1, n. 1, p. 53 - 58, jul./dez. 2007.
- BARBOSA, R.I.; MIRANDA, I.S. Fitofisionomias e Diversidade Vegetal das Savanas de Roraima. In: BARBOSA, R.I.; XAUD, H. A. M.; SOUZA, J. M. C. **Savanas de Roraima – Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrosilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p. 61-78.

BARROS, L. S. Perdas de solo e água em plantio de *Acacia mangium* Wild e savana em Roraima, norte da Amazônia. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 447-454, 2009.

BARTH, M. O. et al. Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados monoflorais do Sudeste do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.2, p. 229-233, p. abr./jun. 2005.

BARTH, O. M. Melissopalínologia no Brasil: Uma revisão sobre análises palinológicas de mel, própolis e bolotas de pólen de abelhas. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 61, n.3, p.342-350, maio/jun. 2004.

BASTOS, A. A. et al. Avaliação da qualidade sanitária dos rótulos de alimentos embalados de origem animal. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v. 32, n. 2, p. 218-231, maio/ago. 2008.

BAU, M. et al Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 125-130, 2005.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 49-52, jan./mar. 2007.

BOGDANOV, S. et al. Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission. **Bee World**, v. 80, n. 2, p. 61-69, 1999.

BRASIL. Decreto-lei n. 30.691, de 08 de setembro de 1997. Dispõe sobre as Normas do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 set. 1997. Disponível em: <http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/182_GED.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Método de Análise Microbiológica para Alimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de ago. de 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS Nº. 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênicas sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 ago.1997. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/cf430b804745808a8c95dc3fbc4c6735/Portaria+SVS-MS+N.+326+de+30+de+Julho+de+1997.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 02 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões

microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de jan. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 02 dez. 2013.

BRASIL. Normativa Nº 11, de 20 de outubro de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 out. 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegisla-cao.do?operacao=visualizar&id=7797>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável. **Propostas de políticas públicas para o território sul de Roraima**. Rorainópolis, 2010. 120 p.

CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Revised Codex Standard for Honey**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/downloadstandards/310/CXSO12e.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

CAMPOS, G. et al. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciências Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 23, n.1, p. 1-5, jan./abr. 2003.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. 7. ed. California: Academic Press, 1994. 603 p.

CARVALHO, C. A. L. et al. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Cruz das Almas: SEAGRI-BA, 2005. 32 p.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010. 84 p.

CASTRO, C.C.; GUTIERREZ, A. H. SOTÃO, H. M. P. Fungos conidiais em *Euterpe oleracea* Mart. (Açaizeiro) na Ilha do Combu, Pará-Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.26, n.4. p. 761-771, jun. 2012.

CBA – CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE APICULTURA. – Brasil Apícola. In: **Brasil Apícola**. Disponível em: <<http://www.brasilapicola.com.br/brasil-apicola>>. Acesso em: 02 dez. 2013.

CHEN, Y. C. et al. Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 6, p. 2302–2310, jun. 2000.

CHIRIFE, J.; ZAMORA, M.C.; MOTTO, A. The correlation between water activity and % moisture in honey: fundamental aspects and application to Argentine honeys. **Journal of Food Engineering**, London, v.72, n. 3, p. 287-292, 2006.

CORDEIRO, C. A. et al. Avaliação da qualidade de méis produzidos no estado de Sergipe. **Revista Scientia Plena**, v. 8, n. 12, p. 121001-121006, jul./dez. 2012.

DENARDI, C. A. S et al. Avaliação da atividade de água e da contaminação por bolores e leveduras em mel comercializado na cidade de São Paulo – SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n.2, p.219-222, 2005.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.80, n. 6, p. 591-594, out. 2005.

DU BOCAGE, A. L. et al. Palinotaxonomia de espécies de Acácia (leguminosae-mimosoideae) no semi-árido brasileiro. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 3, p. 587-596, 2008.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute: CABI Publishing, 2001. 608 p.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A. et al. Análises físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 1166-1171, set./out. 2005.

FACH, P. et al. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 389-392, 1995.

FELŠÖCIOVÁ, S. et al., Microscopic fungi isolated from polish honey. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, Nitra, v. 2, n.3, p. 1040-1049, 2012/2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 220

FIB. FOOD INGREDIENT BRASIL. **Revista Food ingredient Brasil**. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com>>. Acesso em: 27 fev. 2015.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M.C.; MARIOLI, J. M.; Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 4, p. 1649-1653, 2007.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, n.14, p.12-16, 2000.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v. 155, n. 1, p. 1-10, 1997.

GIRÃO, M. D. et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, mai./Jun. 2004.

GOLDZWEIG, R. S. A entrada da Venezuela no Mercosul: análise dos aspectos políticos e econômicos. **Revista de Iniciação Científica em Relações Internacionais**. João Pessoa, v.1, n.1, p. 02-29, 2013.

GOIS, G. C. et al. Composição do Mel de *Apis Mellifera*: Requisitos de Qualidade. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.7, n.2, p.137-147, 2013.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n 3, p. 454-500, 1999.

HOOG G. S. et al. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.51: p.29-66, 2005.

INPA - INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA. **O Lavrado de Roraima: importância biológica, desenvolvimento e conservação na maior savana do Bioma Amazônia**. Brasília: INPA, 2008. 08 p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JANSE, I.; ZWART, G. A. Simple remedy against artifactual double bands denaturing gradient gel electrophoresis. **Jornal of Microbiological methos**, Amsterdam, v. 57, p. 279-281, 2004.

KELLER, K. M. et al. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de rações destinadas à alimentação de equinos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Universidade Rural**, Seropédica, v.25, n.1, p.93-96, jan./jun. 2005.

KIFFLER, E.; MORELET, M. **The deuteromycetes, mitosporic fungi: classification and generic keys**. New York: Science Publisher, 2000. 273p.

KOMATSU, S. S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) no estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n.2, p. 143-146, maio/ago. 2002.

KUROISHI, A. M. et al. Avaliação da cristalização de mel utilizando parâmetros de cor e atividade de água. **Brazilian Jornal of technolgy**. Campinas,v. 15, n. 1, p. 84-91, jan./mar. 2012.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LACERDA, J. J. J. et al. Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos pro *Apis mellifera* no sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1022 - 1026, 2010.

- LIEVEN, M. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do mel comercializado no extremo sul da Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v.33, n.4, p. 544-552, out./dez. 2009.
- LOPES, M. T. R. et al. Alternativas de sombreamento para apiários. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 299-305, jul./set. 2011.
- LUPATINI, M.; MELLO, A. H.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do Dna ribossômico do isolado de Scleroderma UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* w.hill ex- maiden. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p. 2677-2682, 2008.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MAGNANI, M. et al. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, jan./fev. 2005.
- MARCHI, D. M. et al. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas no Município de Chapecó-SC, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Revista Epidemiologia e Serviço de Saúde**, Olinda, v.20, n.3, p. 401-407, juh./set. 2011.
- MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.1, p. 8-17, jan./mar. 2005.
- MARTINS, H.M.; MARTINS, M. L.; BERNARDO, F. M. A. Esporos de Bacillaceae, fungos e aflatoxinas em mel. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.98, n.546, p. 85-88, 2003.
- MATOS, I. T. S. R. et al. Qualidade microbiológica do mel de *Melipona* sp. produzido na Amazônia central (Parintins-AM-Brasil). **Revista Verde**, Mossoró, v.6, n.4, p.91-95 out./dez. 2011.
- MAZARO, I. R. et al. Controle de qualidade de amostras de mel de Maringá-PR. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, V.5, n.3, p.23-26, fev. 2014.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S.; Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.
- MENDES, C. G. et al. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.2, p.07-14, abr./jun. 2009.
- MENDONÇA, K. et al. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellifera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1748-1753, set. 2008.

- MENEZES C. P.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Cladosporium carrionii*. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 49-53, fev. 2013.
- MERABET, L. P. Determinação da atividade de água, teor de umidade e parâmetros microbiológicos em compostos de mel. **Revista Brasileira de Economia Doméstica**, Viçosa, v. 22, n.2, p. 213-232, 2011.
- MERCADO COMUM DO SUL - MERCOSUL. Resolução n. 15/94. **Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Mel**. Buenos Aires: Grupo de Mercado Comum - GMC, 1994. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/PdF/GMC_reS_1994-015.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2013.
- MICHAELSEN, A. et al. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Coimbra, v, 58, p. 133-141, jun. 2006.
- MONTES, A. M. et al. Qualidade de méis de abelhas nativas sem ferrão do estado do Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Viçosa, v.35, n.1, p. 48-54, jan./mar. 2013.
- MOURA, S. G. et al. Qualidade do mel de *Apis mellifera* L. relacionadas às boas práticas apícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.15, n.3, p.731-739 jul./set. 2014.
- MUNDO, M. A. et al. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**, Geneve, v.97, n.1, p.1-8, 2004.
- NETO, J. M.; OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D, C. Caracterização físico-químico de méis de *Apis mellifera* L. provenientes da microrregião de Pau dos Ferros, RN. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**. Niterói, v. 21, n. 4, p. 268-272, out./dez. 2014.
- OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p.
- OLIVEIRA, C. A. et al. Otimização da Metodologia de Extração e Amplificação do DNA de Fungos do Solo. **Circular e Técnica**. Sete Lagoas, v.69, p. 1-6, Dez. 2005.
- OLIVEIRA, A. V. Detecção molecular de fungos com potencial toxigênicos em amostra de amendoim vendidas no comércio varejista de Maringá/PR, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 28, n.1, p. 13-19, mar.2015.
- OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* *Lepeletier*, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na Floresta Amazônica? **Revista Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n.3, p. 389 – 394, 2005.

OPUCHKEVICH, M. H.; KLOWSKI, A. L. M.; MACOHON, E. R. Qualidade do mel no município de Prudentópolis, **Revista Conexão UEPG**, Viçosa, v.4, n.1, p. 36-38, 2008.

PÉRICO, E. et al. Avaliação Microbiológica e Físico-química de Méis Comercializados no Município de Toledo, Pr. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v.13, n 3, p. 365-382, ago./ Nov. 2011.

PEZENTE, L. G. **Características glicídicas e microbiológicas de méis de *Apis mellifera* produzida em Roraima**. 2011. p. 117. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011.

PINHEIRO, M. N. M.; HORTÊNCIO, M. M.; EVANGELISTA, R. A. O. Distribuição espacial da biodiversidade de macrófitas aquáticas nos lagos da região nordeste do estado de Roraima. **Revista Geonorte**, João Pessoa, v. 1, n.4, p.162- 174, 2012.

PIRES, R. M. C. **Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 produzido no Piauí**. 2011. 94p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

PITT, J. I.; L HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. New York: Springer, 2009. 524 p.

PONTARA, L. P. M. et al. Physicochemical and microbiological characterization of cassava flower honey samples produced by africanized honeybees. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n.3, p. 547-552, jul./set. 2012.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2002. 829 p.

PRADO, J.; HIRAI, R. Y.; GIULIETTI, A. M. Mudanças no novo Código de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Melbourne). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 3, p. 729-731 2011.

RAMOS, D. M. B. Inibição *in vitro* de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 397-402, 2010.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. 3. ed. New York: Robert Krieger Publishing Company, 1977.

ROSSI, N. F. et al. Análise da adulteração de méis por açúcares comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.2, p. 199-204, maio/ago.1999.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI. v.1, 1998. p.163-177.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANTIN, E. et al. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.185-190, 2000.
- SANTOS, D. C. et al. Qualidade físico-química e microbiológica do mel de *Apis mellifera* comercializado na cidade de Russas, CE. **Tecnologia e Ciências Agropecuária**, João Pessoa, v.5, n.1, p.41-45, mar. 2011.
- SANTOS, D. C.; OLIVEIRA, E. N. A. Características físico-químicas e microbiológicas de méis de *Apis mellifera* L. provenientes de diferentes entrepostos. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v.4, n.1, p. 67-74, maio/out. 2013.
- SANTOS, M. S. et al. Identificação Molecular baseada no Sequenciamento de rDNA de Fungos Endofíticos Foliares de *Passiflora* spp. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n. 3, p. 134-137, 2013.
- SEREIA, M. J. et al. Flora microbiana em amostras de mel orgânico de abelhas africanizadas provenientes das ilhas do rio Paraná. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n.2, p. 462-466, abr./jun. 2011.
- SEBRAE - SERVIÇO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Manual de Segurança e Qualidade para Apicultura. **Qualidade e Segurança dos Alimentos**. Brasília: SEBRAE, 2009. 86 p.
- SENAI - SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL. **Boas Práticas Apícolas no Campo**. Brasília: SENAI, 2009. 51p.
- SILVA, A. S. et al. Classification of Honeys from Pará State (Amazon Region, Brazil) Produced by Three Different Species of Bees using Chemometric Methods. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 7, p. 1135-1145, jul. 2013.
- SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterizao físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.8, n.2/3, p. 260-265, 2004.
- SILVA, K. F. N. L. et al. Características físico-químicas de mel produzido em Limoeiro do Norte durante o armazenamento. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 246-254, out./dez. 2009.
- SILVA, M. B. L. et al. Qualidade microbiológica de méis produzidos por pequenos apicultores e de méis de entrepostos registrados no serviço de inspeoo Federal no Estado de Minas Gerais. **Alimento e Nutrio Araraquara**, São Paulo, v.19, n.4, p. 417- 420, out./dez. 2008.

SILVA, S. J. N. et al. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 46-50, dez. 2008.

SILVA, R. A. et al. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. **Ciências Agrotécnicas de Lavras**, Minas Gerais, v. 31, n. 2, p. 439-447, mar./abr. 2007.

SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-AMAIA, D. B.; SILVA, W. J. Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays* L.) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 75-85, 1983.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159p.

SCOTT, V. N.; CLAVERO, R. S.; TROLLER, J. A. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: Downes, 2001, p. 649.

SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-AMAIA, D. B.; SILVA, W. J. Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays* L.) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 75-85, 1983.

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

SOARES, K. M. P.; AROUCHA, E. M. M.; GÓIS, V. A. Qualidade físico-química de méis silvestres comercializados no município de Apodi, RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.4, n.1, p.55-58, 2010.

SODRÉ, G. S. et al. Análises multivariadas com base nas características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte no Estado da Bahia. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**. São Paulo, v. 11, n.3, p. 129-137, out. 2003.

SODRÉ, G.S. et al. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p. 1139-1144, jul./ago. 2007.

SOUZA, B. A. et al. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.4, p. 798-802, out./dez. 2009.

STELATO, M. M. et al. Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.3, n. 69, p. 285-290, set. 2010.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 141-158, 1998.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 28, n. 10, p. 2731–2739, out. 2011.

TONINI, H.; SILVIO, B. A. H. V.; SILVA, J. R. *Acacia mangium*: características e seu cultivo em Roraima. Brasília: Embrapa, 2010. 145 p.

VARO, S. D. et al. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.40, n.3, p.326-33, maio/jun. 2007.

VECCHIA, A. D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v 27, n. 2, p. 324-327, abr./jun. 2007.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Eds.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

ZANDONAD, R. P. et al. **Revista Nutrição**. Campinas, v. 20, n.1, p. 19-26, jan./fev. 2007.