

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SUPLEMENTO PROTEICO FERMENTADO PARA
ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

Autora: Erica Gomes de Lima
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

MARINGÁ
Estado do Paraná
Dezembro - 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SUPLEMENTO PROTEICO FERMENTADO PARA
ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

Autora: Erica Gomes de Lima
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Josiane Sereia

Tese apresentada como parte das exigências
para obtenção do título de DOUTORA EM
ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia da Universidade Estadual de
Maringá – Área de concentração Produção
Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
Dezembro - 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

L732s Lima, Erica Gomes de, 1988-
Suplemento proteico fermentado para abelhas *Apis mellifera* Africanizadas / Erica Gomes de Lima. -- Maringá, 2017.
60 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Josiane Sereia.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2017.

1. *Apis mellifera*. 2. *Bifidobacterias*. 3. Inulina. 4. *Lactobacilos*. 5. *Saccharomyces*. 6. Abelha africanizada - Suplementos I. Toledo, Vagner de Alencar Arnaut de, orient. II. Sereia, Maria Josiane, 1961-. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 638.1

Gláucia Volponi de Souza - CRB-9/948



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SUPLEMENTO PROTEICO FERMENTADO
PARA ABELHAS *APIS MELLIFERA* AFRICANIZADAS

Autora: Erica Gomes de Lima
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal

APROVADA em 12 de dezembro de 2017.

Prof.ª Dr.ª Maria Josiane Sereia

Prof.ª Dr.ª Maria Claudia Colla
Ruvolo Takasusuki

Prof. Dr. Diogo Francisco Rossoni

Prof. Dr. David De Jong

Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
Orientador

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez”.

Thomas Edison

Aos meus familiares, mãe, irmãs e noivo, pela compreensão e incentivo
nessa caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda, por me guiar e permitir passar por situações que só me fizeram progredir espiritualmente.

Ao professor Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, pelos ensinamentos, paciência e orientação.

À professora Dr.^a Maria Josiane Sereia, pela coorientação, amizade, companhia, estímulo e auxílio nas análises.

Ao professor Dr. Alexandre Santa Bárbara Azevedo, pelo planejamento experimental.

A grande amiga, Kaliane Nascimento de Oliveira, pelas análises estatísticas e por todos os momentos vividos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em especial a todos os professores pelos ensinamentos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), por permitir o acesso às estruturas físicas, utilização de seus equipamentos e doação de materiais para a execução do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Aos amigos, que aqui conquistei e levarei para sempre em minhas boas

memórias, Rejane Stubbs Parpinelli, Simone Cristina Camargo, José Washington Santos Oliveira, Lucilene de Mattos Almeida, Camila Thiara Gomes Carvalho, Fabiana Castelani Andreotti, Fernando Antônio Anjo, Sandra Leiko Narimatsu, Jheniffer Fernandes, Beatriz Fernanda Bonfim de Souza, Djanety Araujo, Donizete de Jesus Sereia, José Carlos Rodrigues, Heber Luiz Pereira, Francieli das Chagas, Priscila Wielewski, André Luiz Halak, Pedro da Rosa Santos, William Cristian da Silva Pizzaia, Érika Cavalheiro Cardoso, Daniele de Amorin Venturini, Idinea Fernandes dos Santos e Rebeca Melo Lima.

BIOGRAFIA

ERICA GOMES DE LIMA, filha de José Manoel de Lima e Maria Edna Gomes de Lima, nasceu em Paulista - Pernambuco, no dia 07 de outubro de 1988.

Em fevereiro de 2011, concluiu a graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Em fevereiro de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, Área de Concentração Produção Animal, Linha de Pesquisa Apicultura na Universidade Federal de Alagoas, obtendo o título de Mestre em Zootecnia em fevereiro de 2014.

Em março de 2014, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível Doutorado, Área de Concentração Produção Animal, Linha de Pesquisa Apicultura na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Em junho de 2017, foi aprovada no exame geral de qualificação para a obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Em dezembro de 2017, foi aprovada na defesa para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I – INTRODUÇÃO.....	1
1. Pão da abelha.....	2
1.1. Composição nutricional.....	2
1.2. Composição microbiológica.....	2
2. Suplementos proteicos para abelhas <i>Apis mellifera</i>	4
3. Avanço na suplementação proteica.....	5
3.1. Fermentação por probióticos.....	5
3.2. Simbiose entre as abelhas e os micro-organismos.....	7
3.3. Probióticos em suplemento proteico para abelhas <i>Apis mellifera</i>	9
4. Influência da alimentação proteica na longevidade das abelhas.....	10
Referências.....	11
II – OBJETIVO GERAL.....	18
III – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE RAÇÃO PROTEICA PARA SUPLEMENTAÇÃO DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADAS.....	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	27

Discussão.....	34
Conclusão.....	37
Referências.....	38
IV – LONGEVIDADE DE ABELHAS AFRICANIZADAS ALIMENTADAS COM SUPLEMENTO PROTEICO FERMENTADO POR PROBIÓTICOS	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	51
Discussão.....	53
Conclusão.....	56
Referências.....	57

LISTA DE TABELAS

**III – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE RAÇÃO
PROTEICA PARA SUPLEMENTAÇÃO DE ABELHAS *Apis mellifera*
AFRICANIZADAS**

- Tabela 1 Matriz do planejamento experimental para a fermentação do suplemento proteico e valores (n=3) do pH e ácido lático no primeiro e quinto dia de fermentação..... 27
- Tabela 2 Matriz do planejamento experimental com as variáveis temperatura (X1) e umidade (X2) e valores das respostas (n=3) pH (Y1), ácido lático produzido (Y2) e probióticos (Y3) após a fermentação do suplemento proteico..... 29

LISTA DE FIGURAS

III – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE RAÇÃO PROTEICA PARA SUPLEMENTAÇÃO DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

- Figura 1 Efeitos padronizados (tcalc) das variáveis: média, umidade, curvatura, temperatura, probiótico e inulina sobre o pH..... 28
- Figura 2 Efeitos padronizados (tcalc) das variáveis: média, umidade, curvatura, temperatura, probiótico e inulina sobre o ácido láctico..... 28
- Figura 3 Efeitos padronizados (tcalc) das variáveis: média, temperatura e umidade sobre o pH (A) e comportamento do pH com valores experimentais x previstos pelo modelo (B)..... 30
- Figura 4 Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a resposta pH (Y1) em função da temperatura (X1) e umidade (X2)..... 31
- Figura 5 Efeitos padronizados (tcalc) das variáveis: média, temperatura, umidade sobre a produção de ácido láctico (A) e comportamento da produção de ácido láctico com valores experimentais x previstos pelo modelo (B)..... 32
- Figura 6 Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a resposta produção de ácido láctico (Y2) em função da temperatura (X1) e umidade (X2)..... 33

IV – LONGEVIDADE DE ABELHAS AFRICANIZADAS ALIMENTADAS COM SUPLEMENTO PROTEICO FERMENTADO POR PROBIÓTICOS

- Figura 1 Médias e diferenças estatísticas (n=5) da quantidade total (g) da dieta consumida pelas abelhas até o trigésimo dia de vida..... 51
- Figura 2 Médias e diferenças estatísticas (n=5) da taxa de mortalidade (%) de abelhas alimentadas com diferentes suplementos no 36º dia de vida..... 52
- Figura 3 Médias e diferenças estatísticas (n=5) do incremento da longevidade (dias) das abelhas alimentadas com diferentes suplementos a partir do 36º dia de vida..... 52

RESUMO

SUPLEMENTO PROTEICO FERMENTADO PARA ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um método com condições ideais para a fermentação de um suplemento proteico que exerça efeito positivo sobre a longevidade das abelhas africanizadas, confinadas em gaiola. Os probióticos utilizados para a fermentação do produto foram: *Bifidobacterias*, *Lactobacilos*, e *Saccharamyces* e o prebiótico inulina. Para o desenvolvimento do método, foram realizados o Planejamento Fatorial Fracionado ($2^{4-1} + 4pc$) e o Delineamento Composto Central Rotacional ($2^2 + 4$ axiais + 4 pc), totalizando 24 ensaios. Em um período de fermentação de cinco dias houve a diminuição do pH e aumento de ácido lático. A maior quantidade de bactérias acidoláticas presentes foi de 10^9 UFC/g de suplemento. Temperaturas baixas e umidades altas produziram os melhores efeitos sobre as respostas fermentativas. A condição ideal que possibilitou eficiente fermentação foi: 38,96°C de temperatura, 66,00% de umidade, 2,00% de inulina e 10,00% de probióticos. Para testar o efeito do suplemento fermentado por probióticos em abelhas africanizadas, foram utilizados quatro tratamentos com cinco repetições. Os tratamentos foram: xarope, pólen, suplemento proteico e suplemento proteico fermentado. As respostas avaliadas foram: consumo do suplemento, taxa de mortalidade e aumento da longevidade. Observou-se em abelhas alimentadas com suplemento proteico fermentado por probióticos: menor consumo médio, menor taxa de mortalidade e a maior longevidade. Foi possível criar um ambiente ideal que permitiu a fermentação do suplemento proteico em apenas cinco dias. A fermentação e a presença de probióticos promoveram nas abelhas aumento da longevidade em sistema fechado.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, *Bifidobacterias*, inulina, *Lactobacilos*, *Saccharomyces*

ABSTRACT

FERMENTED PROTEIN SUPPLEMENT FOR AFRICANIZED HONEYBEES *Apis mellifera*

This research was carried out to develop a method with ideal conditions for fermentation of a protein supplement that promotes a positive effect on longevity of Africanized honeybees confined in cages. The probiotics used for fermentation were: *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, and *Saccharomyces* and the inulin prebiotic. For the method development, Fractional Factorial Planning ($2^{4-1} + 4pc$) and Rotational Central Compound Design ($2^2 + 4$ axial + 4 ch) were performed, totaling 24 trials. In a fermentation period of five days there was a decrease in the pH and an increase in the lactic acid. The greater amount of lactic acid bacteria present was of 10^9 CFU/g of supplement. The low temperatures and high humidity produced the best effects on the fermentative responses. The ideal condition that made possible an efficient fermentation was: temperature 38.96°C , humidity of 66.00%, inulin 2.00% and probiotics 10.00%. To try out the effect of the fermented supplement by probiotic on Africanized honeybees, four treatments with five repetitions were used. The treatments were: sugar syrup, pollen, protein supplement and fermented protein supplement. The responses evaluated were: supplement intake, mortality rate and longevity. It was observed in honeybees fed with protein supplement fermented by probiotics the lowest mean intake, lowest mortality rate and greatest increase in longevity. Also, it was possible to create an ideal environment that allowed fermentation of the protein supplement, in just five days. The fermentation and the presence of probiotics promoted in bees the increase of longevity in closed system.

Key word: *Apis mellifera*, *Bifidobacteria*, inulin, *Lactobacilli*, *Saccharomyces*

I – INTRODUÇÃO

Todo e qualquer alimento fornecido a um animal deve atender as suas exigências nutricionais. As necessidades nutricionais das abelhas são atendidas pela coleta de água, néctar e pólen. O néctar fornece carboidratos e minerais e o pólen fornece proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (Gilliam, 1979). O pólen é o alimento mais rico em nutrientes, fundamental para a sobrevivência e o desenvolvimento da colônia (Somerville, 2005).

Logo após a emergência, a abelha necessita principalmente do consumo de pólen para completar seu desenvolvimento interno durante os próximos oito a dez dias de vida (Winston, 1987). Após o consumo, o pólen é digerido e a proteína é absorvida, podendo ser observados valores maiores de proteína na hemolinfa no sétimo dia de vida (Morais et al., 2013a).

Há uma variação na qualidade do pólen consumido. A qualidade pode ser observada pela porcentagem de proteína contida. A exigência mínima de proteínas para as abelhas é de 20-25%. Considera-se baixo teor de proteína no pólen uma quantidade inferior a 20%, médio 25% e alto mais de 25% (Somerville, 2005). O pólen com baixa proteína limita um ou mais aminoácidos, segundo De Groot (1953), as proporções de aminoácidos essenciais necessários para o crescimento das abelhas são: arginina (3,0%), histidina (1,5%), lisina (3,0%), triptofano (1%), fenilalanina (2,5%), metionina (1,5%), treonina (3,0%), leucina (4,5%), isoleucina (4,0%) e valina (4,0%).

Os nutrientes presentes no pólen não são facilmente utilizados quando ingeridos devido à exina, microestrutura resistente que cobre o pólen, responsável por proteger a célula geradora. Alguns grãos de pólen possuem paredes mais finas, de modo que, seus nutrientes são mais absorvidos (Dimou & Thrasyvoulou, 2009; Ariizumi & Toriyama, 2011).

A coleta dos grãos é realizada em diversas flores. A quantidade a ser coletada por uma colônia vai depender das condições florais e da área de cria. Uma colônia de tamanho médio coleta entre 40 a 60 kg de pólen por ano (Nogueira-Couto & Couto, 2006). O consumo deste pólen coletado só é realizado na forma de pão da abelha.

1. Pão da abelha:

Para que ocorra a conversão do pólen em pão da abelha, os grãos de pólen são recolhidos nas flores e carregados para a colmeia nas corbículas das abelhas operárias mais velhas. Estes grãos são estocados em alvéolos dos favos próximos a área de cria, em uma área com temperatura entre 35-36°C. As abelhas depositam secreções glandulares e algumas enzimas sobre o pólen antes de ser selado com néctar preenchendo por volta de $\frac{3}{4}$ do volume do alvéolo, criando um ambiente anaeróbico para então ser convertido em pão da abelha (Herbert & Shimanuki, 1978; Winston, 1987; Barene, Daberte, & Siksna, 2015). Durante a conversão, o pólen sofre alguns processos bioquímicos, que permitem alterações nutricionais e microbiológicas (Gilliam, 1979).

1.1. Composição nutricional:

O pão da abelha é composto de proteínas, carboidratos, lipídios, minerais, vitaminas, vários ácidos orgânicos, enzimas e outras substâncias (Risco-Ríos et al., 2012; Barene, Daberte, & Siksna, 2015). Durante o processo ocorre aumento no teor de umidade, carboidratos, ácido lático, aminoácidos, vitaminas do complexo B, K, E e carotenoides e queda no teor de lipídeos, pH e no teor de proteína (Human & Nicolson, 2006; Anderson et al., 2011; DeGrandi-Hoffman, Eckholm, & Huang, 2013; Barene, Daberte, & Siksna, 2015).

Com a fermentação as paredes do pólen são destruídas facilitando a assimilação do conteúdo (Mutsaers et al., 2005). Na parede estão presentes pectinas e polissacarídeos, e os responsáveis por romper a parede rígida e assim liberar monossacarídeos constituintes são os micro-organismos (Engel, Martinson, & Moran, 2012).

1.2. Composição microbiológica:

Pouco se sabe sobre a microbiologia do pólen e pão da abelha (Gilliam & Prest,

1987). Os estudos com a microflora do pão da abelha são válidos apenas para a sua região ou para uma região de um clima similar (Pain & Maugenet, 1966; Babendreier et al., 2007). Quando uma flor floresce pela primeira vez, fornece néctar e pólen estéreis, mas eventualmente tornar-se invadido por micro-organismos em suspensão e pelo contato de outros insetos. A composição e os números destes micro-organismos transitórios podem variar com o tempo, tipo de flor, insetos visitantes, temperatura e composição nutricional do pólen e néctar (Vásquez et al., 2012).

O pólen carregado na corbícula da abelha já vem com uma microbiota adquirida no ambiente (Corby-Harris, Maes, & Anderson, 2014). Os gêneros *Saccharomyces*, *Lactobacillus* e *Pseudomonas* são os micro-organismos considerados mais importantes na fermentação do pólen (Pain & Maugenet, 1966).

As leveduras isoladas do pólen fresco e/ou fermentado fermentam os açúcares. A maioria das espécies encontradas fermentam a glicose, sacarose e maltose (Gilliam, 1979). O néctar regurgitado no pólen é predominantemente composto pelo dissacarídeo sacarose e monossacarídeos, frutose e glicose (Herrera, Pérez, & Alonso, 2006). Com isso, a microbiota facilita o metabolismo do açúcar. Além disso, as leveduras produzem vitaminas do complexo B e aminoácidos, que são necessários para as abelhas, podendo ser utilizadas também pelas bactérias acidoláticas (Egorova, 1971). Outro papel da levedura é o consumo do oxigênio no meio proporcionando o crescimento de bactérias anaeróbicas (Hu et al., 2008). As leveduras presentes no pólen e pão da abelha de acordo com uma revisão realizada por Gilliam (1979) são: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Sporobolomyces*, *Torula*, *Torulopsis* e *Zygosaccharomyces*.

Outro grupo que ocupa papel central nos processos de fermentação e bioconservação são os das bactérias acidoláticas. Estas convertem a fonte de energia disponível, oxidando parcialmente a glicose, gerando ATPs e piruvato, em seguida liberam energia e produzem compostos orgânicos como o ácido láctico (Leroy & Vuyst, 2004). Uma parte da microbiota do intestino da abelha realiza a fermentação de carboidratos, essas bactérias fermentativas incluem espécies específicas dentro dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Kwong & Moran, 2016). De um modo geral, os *Lactobacillus* spp. tanto em abelhas solitárias como nas abelhas sociais são responsáveis por proteger os alimentos armazenados e inibir micro-organismos patogênicos, diminuindo os níveis de pH ou produzindo metabólitos secundários (Pain

& Maugenet, 1966).

Gilliam (1979) observou a simbiose entre os micro-organismos e descreveu as quatro fases de desenvolvimento microbiano durante a fermentação do pólen: Fase 1: presença de leveduras responsáveis por liberar gás carbônico, produzir metabólitos secundários e assim cooperar para o crescimento de bactérias ácidoláticas anaeróbicas, os *Streptococcus*; Fase 2: presença dos *Streptococcus*, estes produzem ácidos que contribuem para a queda do pH e proporciona um ambiente favorável para os *Lactobacillus*; Fase 3: desaparecimento dos *Streptococcus* e o desenvolvimento intenso de *Lactobacillus*; Fase 4: desaparecimento das bactérias ácidoláticas e leveduras, pela grande quantidade de ácido láctico produzido. O pão da abelha torna-se microbiologicamente estéril com o pH por volta de 4 e pronto para consumo. Além do pão da abelha, alimento proteico natural, as abelhas também podem consumir alimento proteico artificial.

2. Suplementos proteicos para abelhas *Apis mellifera*:

O suplemento proteico é uma alternativa de alimento com valor nutritivo elevado, mas que não substitui permanentemente o alimento natural. Estes suplementos são fornecidos quando existe uma baixa ou nenhuma disponibilidade de alimento natural para as abelhas no campo ou quando as condições meteorológicas não permitem o forrageamento nas flores pelas abelhas naquele período (Kazimierzak-Baryezko & Szymaś, 2006). O fornecimento irá contribuir para que as abelhas consigam estar em atividade durante o ano inteiro (Pătruică & Hutu, 2013).

Alguns alimentos alternativos para as abelhas podem ser observados em uma revisão realizada por Coelho et al. (2008). Atualmente, pesquisas estão sendo realizadas no Brasil, com a intenção de desenvolver e testar nas abelhas formulações de suplementos proteicos.

Pereira et al. (2006) utilizaram ingredientes do Nordeste brasileiro, farinha de feno de folha de mandioca, farinha das vagens de algaroba, farelo de babaçu, purilac, forneceram como alimento proteico e observaram eficiência do produto no desenvolvimento e manutenção das colônias. Toledo et al. (2010) formularam um suplemento proteico com 35% de proteína bruta e não verificaram efeito no aumento da produção de geleia real. O suplemento formulado por Sereia et al. (2010a,b; 2013), teve como ingredientes fontes de óleo e proteína e foi recomendado para aumentar a produção de geleia real, resultou nas abelhas maior longevidade e menor taxa de

mortalidade, além de ser viável financeiramente. Colônias alimentadas com dietas formuladas por Morais et al. (2013b), apresentaram maior desenvolvimento da população. Altas quantificações de proteína na hemolinfa foram observadas em abelhas alimentadas com dietas proteicas (Cappelari et al., 2009; De Jong et al., 2009; Morais et al., 2013a).

Existe a necessidade de sempre melhorar a composição destes substitutos para melhor atender as exigências das abelhas (Kazimierzak-Baryezko & Szymaś, 2006). Estudos recentes se concentraram na possibilidade de desenvolver um produto próximo ao pão da abelha. Para obter esta formulação é necessário atender além das proporções dos diferentes constituintes e conhecer os micro-organismos que as abelhas adicionam para a transformação do pão por meio da fermentação (Araneda et al., 2014).

3. Avanço na suplementação proteica:

3.1. Fermentação por probióticos:

A fermentação é utilizada para a produção de alimentos saudáveis para pessoas e animais (Hu et al., 2008). A primeira produção de alimentos fermentados foi baseada na fermentação espontânea devido ao desenvolvimento da microflora natural presente na matéria-prima. Mais tarde, tornaram disponíveis como preparações probióticas concentradas secas, congeladas e liofilizadas (Leroy & Vuyst, 2004).

Os micro-organismos considerados probióticos possuem como objetivo, colonizar o intestino de forma equilibrada entre as distintas espécies presentes, garantindo funcionalidade e efeitos benéficos ao organismo (Gibson & Roberfroid, 1995). Os probióticos têm ações que juntas se potencializam, isto é, possuem uma simbiose (Saad, Cruz, & Faria, 2011). As principais comercialmente são dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Santos et al., 2008). Além dos seres humanos estes gêneros são também encontrados no trato gastrointestinal das abelhas (Rada et al., 1997; Reuter, 2001; Killer et al., 2009).

O gênero *Lactobacillus* é a mais numerosa e heterogênea unidade taxonômica, que compreende mais de 100 espécies, pertencente ao grupo das bactérias produtoras de ácido láctico (Gaggìa, Mattarelli, & Biavati, 2010; Pattabhiramaiah, Reddy, & Brueckner, 2012). São anaeróbios facultativos, não móveis e, sem formação de esporos. Eles são conhecidos por produzir o ácido láctico como produto final (Jeyaprakash, Hoy, & Allsopp, 2003).

As *Bifidobactérias* por definição não são membros das bactérias ácidoláticas, mas por causa da sua produção de ácido láctico e do seu conhecido efeito positivo sobre a flora gastrointestinal do hospedeiro, são comumente colocadas dentro deste grupo (Ramírez et al., 2011). As *Bifidobactérias* são anaeróbias, não possuem motilidade e possuem diversas formas (Leahy et al., 2005).

As culturas iniciadoras liofilizadas são produtoras de ácido láctico. As principais são os *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Risco-Ríos et al., 2014). Estas não colonizam porque não resistem às condições do trato digestivo. Diferente das culturas probióticas que fornecem efeitos terapêuticos se fixarem na parede do cólon (Antunes, Cazetto, & Bolini, 2004). Os mais usados em animais são os *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces* (Gaggìa, Mattarelli, & Biavati, 2010).

Um ponto importante a ser considerado são as concentrações de bactérias viáveis presentes nas preparações probióticas no momento da administração aos animais (Gaggìa, Mattarelli, & Biavati, 2010). Para o produto destinado ao consumo, é indicado, diariamente, um valor mínimo viável de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias. Comprovando a sua eficácia, valores inferiores são aceitos (Gallina et al., 2011).

O probiótico deve permanecer viável durante a estocagem do produto e estar em atividade metabólica no ecossistema gastrointestinal do hospedeiro (Lee & Salminen, 1995). A atividade e viabilidade são determinadas pelas condições do ambiente. A cepa deve tolerar alguns fatores bióticos e abióticos. Fatores como umidade, acidez, oxigênio dissolvido, fontes de carboidratos, nitrogênio, vitaminas e sais minerais, tipo e quantidade de gêneros, espécies ou linhagem utilizada, interações, método de inoculação e a estocagem podem ter forte influência em sua viabilidade e atividade (Oliveira, Serrão, & Message, 2009; Gaggìa, Mattarelli, & Biavati, 2010; Gallina et al., 2011; Risco-Ríos et al., 2014).

A composição, manutenção e / ou atividade também é fortemente influenciada pela presença de prebióticos, que são ingredientes alimentares não digeríveis, citando como exemplo, a fibra inulina (Gallina et al., 2011). A inulina pode ser extraída da raiz da chicória ou batata yacon e é composta por oligofrutose (Silva et al., 2011). Em um produto desenvolvido com características próximas ao pão da abelha, a inulina propiciou resultados ótimos como prebiótico, estimulando a multiplicação das cepas probióticas (Vamanu et al., 2010). Quando os prebióticos e probióticos estão presentes simultaneamente no produto, o termo utilizado é simbiótico. Com esta combinação, o resultado dos produtos são características funcionais dos dois grupos (Schrezenmeir &

De Vrese, 2001).

A conservação e a viabilidade dos micro-organismos podem ser realizadas por diversos métodos. Os métodos podem ser divididos em curto prazo: repicagem; médio prazo: óleo mineral, água esterilizada, congelamento comum; e longo prazo: liofilização, criopreservação. O método considerado mais eficiente é o de liofilização. O processo consiste em reduzir a água contida, removendo-a por sublimação (Sola et al., 2012). Em condições adequadas os micro-organismos irão fornecer benefícios não só para a indústria alimentar, mas também para a saúde do hospedeiro.

Várias bactérias acidoláticas possuem ação antimicrobiana. Essa ação permite aumento da acidez e redução do pH, restringindo micro-organismos patogênicos, aumentando a vida de prateleira, melhorando a textura e contribuindo ao perfil sensorial do produto final (Leroy & Vuyst, 2004). Além dos benefícios em termos de melhorias no produto final, as culturas probióticas podem também contribuir garantindo benefícios em termos de nutrição e de saúde ao hospedeiro.

Uma equilibrada microbiota constitui em uma barreira contra patógenos (Gaggia, Mattarelli, & Biavati, 2010). Frequentes conversões bioquímicas realizadas pelos micro-organismos melhoram a absorção de nutrientes; estimula o sistema imune; produzem vitaminas e aminoácidos, liberam peptídeos bioativos (Leroy & Vuyst, 2004; Ptaszyńska et al., 2015). Os efeitos benéficos já podem ser percebidos em insetos vivos (Pătruică & Hutu, 2013).

3.2. Simbiose entre as abelhas e os micro-organismos:

A flora bacteriana nativa é tão importante para abelhas como para os humanos e animais (Olofsson & Vásquez, 2008). Pesquisadores têm demonstrado que existe a simbiose entre os insetos sociais e as espécies microbianas e que, possivelmente, a diversificação e o sucesso evolutivo dos insetos dependeram, em parte, destes micro-organismos benéficos (Martinson et al., 2011; Moran, 2015).

Os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal dos insetos incluem: desenvolvimento dos insetos, as condições físico-químicas dos diferentes compartimentos intestinais, fontes disponíveis para a aquisição das bactérias e a capacidade para transferir bactérias para as progênes (Engel & Moran, 2013). A imunidade e/ou diferenças comportamentais entre as colônias influenciam o desenvolvimento e a composição das comunidades intestinais (Powell et al., 2014).

Nas abelhas, as bactérias encontram um ambiente fisicamente e nutricionalmente variável pelo complexo comportamento social desses insetos. As bactérias estão presentes dentro do aparelho digestório da abelha, na colmeia e nos alimentos (Gilliam, 1997; Anderson, 2013).

A comunidade microbiana do aparelho digestório é particular e adaptada à abelha (Kwong & Moran, 2016). Cada espécie possui uma distribuição característica ao meio (Kwong, Mancenido, & Moran, 2017). Crescem em meios ricos, consistentes com sua forma de vida associada à abelha, e exigem condições anaeróbicas ou microaerofílicas, embora algumas cepas conseguem crescer aos níveis de oxigênio atmosférico (Anderson et al., 2013). O sistema digestório desses hymenópteros é relativamente simples, sugerindo uma microbiota muito menos complexa que a de outros animais (Babendreier et al., 2007). No abdômen da abelha adulta o sistema é composto por vesícula melífera, proventrículo, ventrículo, intestino e reto, proporcionando diferentes ambientes para os micro-organismos (Dade, 2009).

A vesícula melífera quando cheia de néctar se torna um meio rico em nutrientes, proporcionando crescimento dos micro-organismos, a condição microaeróbia, também presente dentro do lúmen intestinal consiste com a forma de vida dos micro-organismos presentes (Tajabadi et al., 2011; Anderson, 2013). Durante a coleta de néctar, a vesícula melífera é preenchida e esvaziada consecutivamente, perturbando e evitando a colonização permanente de bactérias neste local (Martinson, Moy, & Moran, 2012; Anderson et al., 2013). Assim como nos alimentos estocados, a vesícula melífera também possui pH baixo, ou seja, um meio ácido, diferente do intestino médio não ácido e intestino posterior pouco ácido (Anderson et al., 2013).

O intestino médio das abelhas é responsável pela digestão e absorção do alimento. Não fornece um substrato estável para a colonização bacteriana, pois neste se encontra a membrana peritrófica composta de quitina e proteínas. Suas funções estão ligadas a digestão do alimento, proteger as células do intestino do atrito de alimentos sólidos, barreira para micro-organismos patogênicos, controla o fluxo de substâncias e protege de toxinas dos alimentos e substâncias tóxicas provenientes dos agrotóxicos e/ou produtos de plantas tóxicas (Cruz-Landim, 2009; Pattabhiramaiah, Reddy, & Brueckner, 2012; Engel & Moran, 2013). É na parte final do intestino que estão presentes a grande comunidade microbiana, aproximadamente 95 % do total, os conteúdos do reto podem servir como fonte de nutrientes para bactérias (Moran, 2015).

Em larvas e em operárias recém-emergidas os micro-organismos estão ausentes

ou em poucas quantidades sendo mais comumente encontrados no sistema digestório das abelhas operárias. Os adultos com 9 dias, após a emergência, possuem uma microbiota totalmente desenvolvida. Abriga grande comunidade bacteriana no intestino, com cerca de 1 bilhão de células bacterianas. A microbiota é estabelecida no intestino da operária adulta por meio do contato com a colônia e trofaláxis entre companheiras, sendo essa a melhor forma de homogeneizar os perfis de microbiota nos indivíduos dentro da colônia (Martinson, Moy, & Moran, 2012; Powell et al., 2014).

Lactobacillus spp. e *Acetobacteraceae* podem ser encontrados em larvas, no alimento e na vesícula melífera (Moran, 2015). Quando os micro-organismos colonizam o intestino da abelha, cria uma microflora permanente no trato digestório composto por leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Grande parte desse grupo: *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* e *Pseudomonas* entre outros pode ser observado na revisão realizada por Anderson et al. (2011). No intestino posterior estão presentes: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apícola*, *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* (Engel & Moran, 2013; Moran, 2015; Kwong & Moran, 2016). Com exceção as paredes do sistema digestivo, todo o ambiente é anaeróbico e ácido e a principal consumidora de oxigênio é a *Snodgrassella alvi*. Observa-se queda do pH, especialmente no íleo e no reto, em que a maioria das bactérias se localizam com valores próximos a 5,2 (Zheng et al., 2017). A existência e importância das bactérias para as abelhas já é documentada, mas a inclusão de preparações probióticas na alimentação das abelhas ainda permanece em fase experimental por todo o mundo.

3.3. Probióticos em suplemento proteico para abelhas *Apis mellifera*:

Dados limitados sobre a inclusão de probióticos na suplementação das abelhas estão atualmente disponíveis (Engel & Moran, 2013). A adição destas preparações em substitutos proteicos resultou em melhor utilização dos nutrientes, maiores quantidades de membranas peritróficas do epitélio do intestino médio das abelhas, maior imunidade, menos mortes, maior desenvolvimento do corpo gorduroso, maior desenvolvimento das glândulas (Łangowska, Szymaś, & Baryczko, 2003; Evans & Lopez, 2004; Kaznowski et al., 2005; Kazimierczak-Baryczko & Szymaś, 2006; Szymaś, Łangowska, & Kazimierczak-Baryczko, 2012). Outras pesquisas com xarope de açúcar contendo substâncias acidificantes e / ou produtos probióticos tem-se mostrado em excelente promotor de crescimento da colônia, desenvolvimento da glândula de cera e melhoria na

saúde das abelhas (Pătruică et al., 2012; Pătruică & Hutu, 2013).

Todas as espécies bacterianas presentes no intestino das abelhas podem ser cultivadas em laboratório e utilizadas para inocular abelhas, e permite o avanço dos estudos experimentais (Engel et al., 2013). Estas recentes pesquisas já comprovam os benefícios ofertados por estes micro-organismos, apresentando uma linha de pesquisa promissora na apicultura (Rangberg et al., 2012). O maior benefício oferecido às abelhas com o avanço da tecnologia seria o aumento do tempo de vida das abelhas.

4. Influência da alimentação proteica na longevidade das abelhas:

O alimento proteico é um dos fatores mais importantes que influenciam a longevidade das abelhas recém-emergidas (Wang et al., 2014). A principal fonte de proteína natural para as abelhas é o pólen. Um pólen de má qualidade possui baixa quantidade de aminoácidos refletindo para a abelha menor longevidade. Quando uma colônia é capaz de coletar quantidades de pólen de três ou mais espécies de planta, as deficiências presentes em qualquer espécie não são susceptíveis e não causarão problemas significativos sobre a sua sobrevivência (Somerville, 2005). A deficiência em nutrientes não é a única desvantagem do pólen, a possível presença de patógenos também afeta a longevidade das abelhas, sendo assim, a alternativa mais favorável, é o fornecimento de substitutos proteicos (Brodschneider & Crailsheim, 2010).

A concentração de proteína e a mistura dos aminoácidos presentes no suplemento são de extrema importância para a longevidade das abelhas, mas a absorção dos nutrientes pode ser insuficiente se for fornecido separadamente do alimento energético e não contribuir para a longevidade da abelha (De Groot, 1953). As abelhas adultas podem sobreviver durante muito tempo sobre os alimentos energéticos, mas as abelhas que consomem também alimento proteico apresentam maior longevidade (Alqarni, 2006; Sereia et al., 2010). A desvantagem do suplemento proteico é a falta de probióticos, bactérias benéficas que contribuem com a saúde e a diminuição da taxa de mortalidade das abelhas (Kaznowskia et al., 2005).

Referências

- Alqarni, A. S. (2006). Influence of some protein diets on the longevity and some physiological conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers. *Journal of Biological Sciences*, 6(4), 734-737.
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Eckholm, B. J., Mott, B. M., DeGrandi-Hoffman, G. (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58(1), 431-444. DOI:10.1007/s00040-011-0194-6
- Anderson, K. E., Sheehan, T.H., Mott, B.M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M.R., Walton, A., Jones, B.M., Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PlosOne*, 8(12), e83125. DOI:10.1371/journal.pone.0083125.
- Antunes, A. E. C., Cazetto, T. F., & Bolini, E. M. A. (2004). Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado proteico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. *Alimentos e Nutrição*, 15(2), 107-114.
- Araneda, X., Velásquez, C., Morales, D., Martínez, I. (2014). Producción de pan de abejas (*Apis mellifera* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Idesia*, 32(4), 63-69. DOI:10.4067/S0718-34292014000400008
- Ariizumi, T., & Toriyama, K. (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual Review Plant Biology*, 62(1), 437-460. DOI:10.1146/annurev-arplant-042809-112312
- Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F., Widmer, F. (2007). Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *Fems Microbiology Ecology*, 59(3), 600-610. DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00249.x
- Barene, I., Daberte, I., & Sikсна, S. (2015). Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos: Teorija ir Praktika*, 21(1), 16-22. DOI:10.15591/mtp.2015.003
- Brodshneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294. DOI:10.1051/apido/2010012
- Cappelari, F. A., Turcatto, A. P., Morais, M. M., De Jong, D. (2009). Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). *Genetics and Molecular Research*, 8(4), 1245-1249. DOI:10.4238/vol8-4gmr628
- Coelho, M., S., Silva, J. H. V., Oliveira, E. R. A., Araújo, J. A., Lima, M. R. (2008). Alimentos convencionais e alternativos para abelhas. *Revista Caatinga*, 21(1), 01-09.
- Corby-Harris, V., Maes, P., & Anderson, K. E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PlosOne*, 9(4), 1-13.

DOI:10.1371/journal.pone.0095056

Cruz-Landim, C. (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Unesp

Dade, H. A. (2009). *Anatomy and dissection of the honeybee*. North Road: International bee research association Press.

De Jong, D., Silva, E. J., Kevan, P., Atkinson, J. L. (2009). Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *Journal of Apicultural Research*, 48(1), 34-37. DOI:10.3896/IBRA.1.48.1.08

DeGrandi-Hoffman, G., Eckholm, B. J., & Huang, M. H. (2013). A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie*, 44(1), 52-63. DOI:10.1007/s13592-012-0154-9

De Groot, A. P. (1953). Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Physiologia Comparata et Oecologia*, 3(1), 197-285.

Dimou, M., & Thrasyvoulou, A. (2009). Pollen analysis of honeybee rectum as a method to record the bee pollen flora of an área. *Apidologie*, 40(2), 124-133. DOI:10.1051/apido/2008066

Egorova, A. L. (1971). Preservative microflora in stored pollen. *Veterinariya*, 8(1), 40-41.

Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects: diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. DOI:10.1111/1574-6976.12025

Engel, P., James, R. R., Koga1, R., Kwong, W. K., McFrederick, Q. S., Moran, N. A. (2013). Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-24. DOI:10.3896/IBRA.1.52.4.07

Engel, P., Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *PNAS Proceedings National Academy of Sciences*, 109(27), 11002-11007. DOI:10.1073/pnas.120297010

Evans, J.D., & Lopez, D. L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 752-756. DOI:10.1603/0022-0493(2004)097[0752:BPIAIR]2.0.CO;2

Gaggìa, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1), s15-s28. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031

Gallina, D. A., Alves, A. T. S., Trento, F. K. H. S., Carusi, J. (2011). Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 13(4), 239-244.

- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10(1), 43-53. DOI:10.1051/apido:19790106
- Gilliam, M., & Prest, D. B. (1987). Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49(1), 70-75. DOI:10.1016/0022-2011(87)90127-3
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155(1), 1-10.
- Herbert Jr., E. W., & Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9(1), 33-40.
- Herrera, C. M., Pérez, R., & Alonso, C. (2006). Extreme intraplant variation in nectar sugar composition in an insect-pollinated perennial herb. *American Journal of Botany*, 93(4), 575-581. DOI:10.3732/ajb.93.4.575
- Hu, J., Lu, W., Wang, C., Zhu, R., Qiao, J. (2008). Characteristics of solid-state fermented feed and its effects on performance and nutrient digestibility in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 21(11), 1635-1641.
- Human, H., & Nicolson, S.W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67(14), 1486-1492. DOI:10.1016/j.phytochem.2006.05.023
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., & Allsopp, M. H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2), 96-103. DOI:10.1016/j.jip.2003.08.007
- Kazimierczak-Baryczko, M., & Szymas, B. (2006). Improvement of the composition of pollen substitute for honey bee (*Apis mellifera* L.), through implementation of probiotic preparations. *Journal of Apicultural Science*, 50(1), 15-23.
- Kaznowski, A., Szymas, B., Jazdzinska, E., Kazimierczak, M., Paetz, H., Mokracka, J. (2005). The effect of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 44(1), 10-14. DOI:10.1080/00218839.2005.11101139
- Killer, J., Kopečný, J., Mrazek, J., Rada, V., Dubna, S., Marounek, M. (2009). Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees. *Anaerobe*, 16(2), 165-170. DOI:10.1016/j.anaerobe.2009.07.007
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374-384. DOI:10.1038/nrmicro.2016.43. Epub 2016 May 3.

- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, 4(2), 1-9. DOI:10.1098/rsos.170003.
- Łangowska, A., Szymaś, B., & Baryczko, M. (2003). Laboratory evaluation of proteinaceous feed for bees containing lactic acid bacteria. *Scientific Papers of Agricultural University Poznań Animal Science*, 5(1), 53-61.
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1303-1315. DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x
- Lee, Y. K., & Salminen, S. (1995). The coming age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 241-245. DOI:10.1016/S0924-2244(00)89085-8
- Leroy, F., & Vuyst, L. D. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. DOI:10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Martinson V. G., Danforth B. N., Minckley R. L., Rueppell O., Tingek S., Moran N. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20(3), 619-628. DOI:10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x
- Martinson, V. G., Moy, J., & Moran, N., A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2830-2840. DOI:10.1128/AEM.07810-11
- Morais, M. M., Turcatto, A. P., Francoy, T. M., Gonçalves, L. S., Cappelari, F. A., De Jong, D. (2013a). Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of haemolymph proteins. *Journal of Apicultural Research*, 52(3), 119-121. DOI:10.3896/IBRA.1.52.3.01
- Morais, M. M., Turcatto, A. P., Pereira, R. A., Francoy, T. M., Guidugli-Lazzarini, K. R., Gonçalves, L. S., de Almeida, J. M. V., Ellis, J. D., De Jong, D. (2013b). Protein levels and colony development of Africanized and European honey bees fed natural and artificial diets. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6915-6922. DOI:10.4238/2013
- Moran, N. A. (2015). Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 10(1), 22-28. DOI:10.1016/j.cois.2015.04.003.
- Mutsaers, M., Blitterswijk, H., Leven, L., Kerkvliet, J., Waerdt, J. (2005). *Bee products: properties, processing and marketing*. Wageningen: Agromisa Foundation.
- Nogueira-Couto, R. H., & Couto, L. A. (2006). *Apicultura: manejo e produtos*. Jaboticabal: Funep.
- Oliveira, R. F., Soudaleff, M., Lima, M. V. S., Lima, H. O. S. (2009). Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melão da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. *Brazilian Journal Food Technology*, 7(1), 34-40.

- Olofsson, T. C., & Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57(4), 356–363. DOI:10.1007/s00284-008-9202-0
- Pain, J., & Maugenet, J. (1966). Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Annales de l'Abeille*, 9(3), 209-236.
- Pătruică, S., Dumitrescu, G., Stancu, A., Bura, M., Dunea, I. B. (2012). The effect of prebiotic and probiotic feed supplementation on the wax glands of worker bees (*Apis mellifera*). *Animal Sciences and Biotechnologies*, 45(2), 268-271.
- Pătruică, S., & Hutu, I. (2013). Economic benefits of using prebiotic and probiotic products as supplements in stimulation feeds administered to bee colonies. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1), 259-263. DOI:10.3906/vet-1110-20
- Pattabhiramaiah, M., Reddy, M. S., & Brueckner, D. (2012). Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus spp.* in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(3), 1135-1143. DOI:10.6088/ijes.00202030002
- Pereira, F. M., Freitas, B. M., Neto, J. M. V., Lopes, M. T. R., Barbosa, A. L., Camargo, R. C. R. (2006). Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos proteicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(1), 1-7. DOI:10.1590/S0100-204X2006000100001
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., Moran, N.A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of *Apis mellifera*. *Applied Environmental Microbiology*, 80(23), 7378-7387. DOI:10.1128/AEM.01861-14
- Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., Małek, W. (2015). Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nose mites? *Parasitology Research*, 115(1), 397-406. DOI:10.1007/s00436-015-4761-z
- Rada, V., Máchová, M., Huk, J., Marounek, M., Dusková, D. (1997). Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie*, 28(6), 357-365. DOI:10.1051/apido:19970603
- Ramírez, J. C. C. R., Ulloa, P. R., González, M. Y. V., Ulloa, J. A., Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2(7), 1-17.
- Rangberg, A., Diep, D.B., Rudi, K., Amdam, G. V. (2012). Paratransgenesis: an approach to improve colony health and molecular insight in honey bees (*Apis mellifera*)? *Integrative and Comparative Biology*, 52(1), 89–99. DOI:10.1093/icb/ics089.
- Reuter, G. (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 2(2), 43-53.

Risco-Ríos, C. A. D., Pérez-Piñeiro, A., Álvarez-Rivera, V. P., Rodríguez-Castro, G., Leiva-Castillo, V., Puig-Peña, Y., García-Neninger, R. (2012). Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 43(1), 17-21.

Risco-Ríos, C. A. D., Peña, Y. P., Castro, G. R., Castillo, V. L., Neninger, R. G., Cervera, Z. M. A. (2014). Optimización de la fermentación ácido láctica del polen apícola a escala de laboratorio. *Apiciencia: La Revista Cubana de Ciencia Apícola*, 16(2), 1-14.

Saad, S. M. I., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2011). *Probióticos e prebióticos em alimentos*. São Paulo: Varela.

Santos, J. S., Xavier, A. A. O., Boneventi, P., Souza, R. B., Garcia, S. (2008). Suco de uva suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose. *Semina: Ciências Agrárias*, 29(4), 839-844. DOI:10.5433/1679-0359.2008v29n4p839

Schrezenmeir, J., & De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361-364.

Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M., Castro, S. E. S., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Furlan, A. C. (2010a). Lifespan of Africanized honey bees fed with various proteic supplements. *Journal of Apicultural Science*, 54(2), 37-49.

Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Sekine, E. S., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M. (2010b). Viabilidade financeira da produção de geleia real com abelhas africanizadas suplementadas com diferentes nutrientes. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 32(4), 467-474. DOI:10.4025/actascianimsci.v32i4.7895

Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Furlan, A. C., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M., Wielewski, P. (2013). Alternative sources of supplements for Africanized honeybees submitted to royal jelly production. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 35(2), 165-171. DOI:10.4025/actascianimsci.v35i2.16976

Silva, W. T. M., Nunes, R. V., Pozza, P. C., Pozza, M. S. S., Appelt, M. D., Eyng, C. (2011). Avaliação de inulina e probiótico para frangos de corte. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 33(1), 19-24. DOI:10.4025/actascianimsci.v33i1.9979

Sola, M. C., Oliveira, A. P., Feistel, J. C., Minafra, C. S., Rezende. (2012). Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14), 1398-1418.

Somerville, D. (2005). *Fat bees, skinny bees: a manual on honey bee nutrition for beekeepers*. Goulburn: Rural Industries Research and Development Corporation.

Szymaś, B., Łangowska, A., & Kazimierzak-Baryczko, M. (2012). Histological structure of the midgut of honey bees (*Apis mellifera* L.) fed pollen substitutes fortified with probiotics. *Journal of Apicultural Science*, 56(1), 5-12. DOI:10.2478/v10289-012-0001-2

Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M. A., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., Nateghi, L.

(2011). Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*, 42(1), 642–649. DOI:10.1007/s13592-011-0069-x

Toledo, V. A. A., Neves, C. A., Alves, E. M., Oliveira, J. R., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Faquinello, P. (2010). Produção de geleia real em colônias de abelhas africanizadas considerando diferentes suplementos proteicos e a influência de fatores ambientais. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 32(1), 101-108. DOI:10.4025/actascianimsci.v32i1.6836

Vamanu, E., Vamanu, A., Popa, O., Băbeanu, N. (2010). The antioxidant effect of a functional product based on probiotic biomass, pollen and honey. *Animal Science and Biotechnologies*, 43(1), 331-336.

Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PlosOne*, 7(3), 1-9. DOI:10.1371/journal.pone.0033188

Wang, H., Shang, S., Zeng, Z., & Yan, W. (2014). Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*, 45(5), 618–625. DOI:10.1007/s13592-014-0276-3

Winston, M.L. (1987). *The biology of the honey bee*. Cambridge: Harvard University Press.

Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18), 4775–4780. DOI:10.1073/pnas.1701819114

II – OBJETIVO GERAL

Desenvolver um suplemento proteico fermentado simbiótico em condições otimizadas que proporcione as abelhas maior longevidade.

III – Otimização do processo de fermentação de ração proteica para suplementação de abelhas *Apis mellifera* africanizadas

RESUMO: O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um método com condições ideais para a fermentação de um suplemento proteico para as abelhas. Os probióticos utilizados foram: *Lactobacilos*, *Bifidobacterias* e *Saccharomyces* e o prebiótico inulina. O Planejamento Fatorial Fracionado (2^{4-1} + 4pc) e o Delineamento Composto Central Rotacional (2^2 + 4 axiais + 4 pc) foram realizados, totalizando 24 ensaios. Houve um aumento de ácido lático e diminuição do pH em um período de cinco dias de fermentação. A quantidade de bactérias acidoláticas presentes foi 10^8 - 10^9 UFC/g de suplemento. No primeiro planejamento, o pH foi $3,58 \pm 0,01$ a $5,35 \pm 0,02$ e a percentagem de ácido lático no último dia de fermentação, foi $1,40 \pm 0,05\%$ a $3,18 \pm 0,03\%$. A temperatura e a umidade tiveram efeitos significativos. As variáveis inulina e probiótico não apresentaram efeitos. No segundo planejamento, o pH foi $3,49 \pm 0,01$ a $3,96 \pm 0,01$ e a produção de ácido lático foi $1,06 \pm 0,01\%$ a $1,66 \pm 0,02\%$. As menores temperaturas e as maiores umidades produziram os melhores efeitos sobre as respostas fermentativas. Concluiu-se que foi possível criar um ambiente ideal com temperatura, umidade, inulina e probióticos, $38,96^\circ\text{C}$, $66,00\%$, $2,00\%$ e $10,00\%$ respectivamente, que possibilitou a fermentação do suplemento proteico obtendo como produto final características fermentativas próximas ao pão da abelha em cinco dias.

PALAVRAS-CHAVE: ácido lático, *Bifidobacterias*, inulina, *Lactobacilos*, probiótico, *Saccharomyces*.

III - Fermentation process optimization of protein feed for supplementation of Africanized honeybees *Apis mellifera*

ABSTRACT: The objective of this research was to develop a method with ideal conditions for fermentation of a protein supplement for honeybees. Probiotics used were: *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Saccharomyces* and inulin prebiotic. Fractional Factorial Planning ($2^{4-1} + 4pc$) and Rotational Central Compound Design ($2^2 + 4$ axial + 4 pc) were done, totaling 24 treatments. There was an increase in lactic acid and pH decrease during the five-day fermentation period. The amount of lactic acid bacteria present was 10^8 - 10^9 CFU/g of supplement. In the first planning pH was 3.58 ± 0.01 to 5.35 ± 0.02 and the percentage of lactic acid on the last day of fermentation was $1.40 \pm 0.05\%$ to $3.18 \pm 0.03\%$. Temperature and humidity had significant effects. Inulin and probiotic variables showed no significant effects. In the second planning, the pH was 3.49 ± 0.01 to 3.96 ± 0.01 and lactic acid production was $1.06 \pm 0.01\%$ to $1.66 \pm 0.02\%$. Lower temperatures and high humidity produced the best effects on the fermentative responses. It was concluded that it was possible to create an ideal environment with temperature, humidity, inulin and probiotics of 38.96°C , 66.00%, 2.00% and 10.00% respectively, that allows a very strong fermentation of the protein supplement, obtaining a final product with fermentative characteristics resembling to bee bread in just five days.

KEY WORDS: lactic acid, *Bifidobacteria*, inulin, *Lactobacilli*, probiotic, *Saccharomyces*.

Introdução

A assimilação de nutrientes é fundamental para o crescimento e o desenvolvimento da colônia (Brodschneider & Crailsheim, 2010). Os principais nutrientes para as abelhas são: carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, minerais e água, presentes no pólen e néctar (Manning et al., 2007). As abelhas convertem o néctar em mel e o pólen em pão abelha, permitindo a disponibilidade do conteúdo nutricional (Altaye et al., 2010).

O pão da abelha é alimento mais nutritivo das abelhas e a principal fonte proteica. O pólen coletado pelas operárias é estocado em alvéolos, misturados com enzimas digestivas e mel. A mistura sofre processos físicos, químicos e microbiológicos com a ação das enzimas, micro-organismos, umidade e temperatura. Em aproximadamente duas semanas o pólen é fermentado e chamado pão da abelha (Nagai et al., 2005).

A fermentação é utilizada como um método eficaz para a produção de alimentos saudáveis. O processo é controlado por bactérias acidoláticas, bolores e leveduras (Giraffa, 2004). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* consome o oxigênio deixando o local anaeróbico, promovendo o crescimento de bactérias (Hu et al., 2008). As bactérias proporcionam queda no pH e acidificação no meio. A acidificação ocorre principalmente pela produção de ácido lático. Diversos antimicrobianos naturais são produzidos, tais como: bacteriocinas, diacetil, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogênio e os ácidos orgânicos acético, fórmico, fenil-lático e ácido graxo caproico (Leroy & Vuyst, 2004).

Na camada superior do pão da abelha, observa-se ação antimicrobiana e na camada inferior maiores valores de fenólicos totais. A atividade antibacteriana do pão de abelha é ocasionada pelos micro-organismos e o conteúdo fenólico está relacionado com o envelhecimento do pão de abelha (Podrižnik & Božič, 2015). A ação dos micro-organismos não está apenas envolvida na produção e preservação dos alimentos, mel e pão da abelha, mas também são importantes para a saúde das abelhas (Vásquez et al., 2012; Raymann, Shaffer, & Moran, 2017). Para compreender os efeitos benéficos é fundamental conhecer alguns fatores, tais como, composição e quantificação dos micro-organismos, genética e fisiologia da abelha e fatores ambientais (Engel et al., 2016).

A transformação intensa da agricultura, degradando o habitat natural e criando monoculturas, alteram a abundância, taxa de transmissão ou a sobrevivência dos micro-

organismos benéficos que habitam o local, como também afeta o fornecimento adequado de nutrientes exigido pelas abelhas comprometendo a nutrição e imunidade (Alaux et al., 2010; Potts et al., 2010; Nicholls & Altieri, 2012; Anderson et al., 2013). O fato da colônia não estar doente não significa que ela esteja saudável. Colônia saudável deve ser livre de doenças e acima de tudo, bem nutrida e capaz de perpetuação (Brodschneider & Crailsheim, 2010).

Uma alternativa para nenhuma ou pouca fonte natural de alimento para as abelhas é o fornecimento de suplementos. Pesquisas relacionadas a este fornecimento estão apresentando bons resultados no desenvolvimento e manutenção de colmeias e minirrecrias, além de aumentar a produção de geleia real, aumentar a longevidade das abelhas, diminuir a taxa de mortalidade, aumentar a quantificação de proteína na hemolinfa e ser financeiramente viável (Pereira et al., 2006; Cappelari et al., 2009; De Jong et al., 2009; Sereia et al., 2010a,b; 2013; Morais et al., 2013a,b).

Normalmente os substitutos não são fermentados e não contêm microflora específica. A administração de preparações probióticas com ou sem prebióticos tem efeito positivo nas abelhas (Evans & Lopez, 2004; Kaznowski et al., 2005; Kazimierczak-Baryczko & Szymaś, 2006; Szymaś, Łangowska & Kazimierczak-Baryczko, 2012; Pătruică, & Mot, 2012; Pătruică et al., 2012; Pătruică & Hutu, 2013). O estilo de vida social desses insetos facilita a inoculação e disseminação de probióticos nas populações (Engel & Moran, 2013). A manutenção destes, principalmente as *Bifidobacterias* e *Lactobacilos*, podem ser mantidos com o fornecimento de prebióticos como a inulina (Gallina et al., 2011).

Araneda et al. (2014) afirmaram que é possível desenvolver um suplemento em laboratório, desde que, possua elementos constituintes semelhantes ao pão da abelha. Para produzir um suplemento fermentado deve-se pensar não apenas nos ingredientes da formulação, mas também nos micro-organismos utilizados e método a ser empregado. Alguns fatores provocam efeitos sobre a atividade dos micro-organismos, podendo ser citados: a água disponível, temperatura, oxigênio, pH e nutrientes disponíveis (Siqueira, 1995). Portanto, o método de desenvolvimento deve abranger estes fatores para obter um produto final ideal. Devido à necessidade e a possibilidade de criar um suplemento melhorado este experimento teve como objetivo desenvolver um método com condições ótimas para fermentar um suplemento proteico para as abelhas com características fermentativas ideais próximas ao do pão da abelha.

Material e Métodos

Local:

As análises foram realizadas no Laboratório de Prestação de Serviço da Universidade Tecnológica Federal do Paraná em Campo Mourão no Estado do Paraná, entre o período de junho a dezembro de 2016.

Equipamentos:

Autoclave vertical Primatec; balança de precisão eletrônica Shimadzu BL3200H; balança analítica de precisão Marte Ad500 510g x 0,0022g com capela; estufa de esterilização e secagem Nova Ética Modelo 402/3N; banho metabólico tipo Dubnoff MA093; estufa bacteriológica de modelo TE-392/2 Tecnal; phmetro modelo MB10; agitador magnético modelo Quimis; freezer vertical; liofilizador de bancada LIOTOP, modelo L101; máquina seladora e capela de fluxo laminar.

Soluções:

Caldo Malt Extract Powder Refined da Himedia®; caldo De Man, Rogosa e Sharpe *Lactobacillus* da Acumedia® (MRS); ágar De Man, Rogosa e Sharpe *Lactobacillus* da MicroMed® (MRS); ágar *Streptococcus thermophilus* (ST), desenvolvido em laboratório segundo Dave & Shah (1996); ágar Batata Dextrose da Acumedia® (BDA) e água peptonada.

Suplemento proteico:

O suplemento utilizado foi o desenvolvido por Sereia et al. (2013) composto por proteína isolada de soja, óleo de linhaça, óleo de palma, levedo de cerveja, açúcar refinado, mel, pólen, lecitina de soja e núcleo de vitaminas, com modificação. A modificação foi a eliminação da carga microbiana presente no pólen seguindo o método descrito por Fuenmayor, Quicazán, & Figueroa (2011). Em frascos de vidros de 200 mL devidamente esterilizados, foi adicionada uma mistura de pólen: água destilada (2:1) e autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, os ingredientes do suplemento foram pesados, homogeneizados e peneirados. A percentagem de umidade do suplemento foi determinada seguindo o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Utilizou-se para a análise de umidade, balança e estufa de esterilização e secagem.

Variáveis analisadas:

As variáveis analisadas para verificar seus efeitos na fermentação foram:

- a) Temperatura: controladas em estufa bacteriológica.
- b) Umidade: determinada seguindo o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Posteriormente, foi realizada a equação global para o balanço de massa.
- c) Prebiótico: A inulina da Orafti® GR foi o prebiótico utilizado. A pesagem foi realizada em balança analítica de precisão. Após a inulina ser acrescentada ao suplemento, os ensaios passaram por uma esterilização final permanecendo por 15 minutos em estufa de esterilização e secagem a 90°C.
- d) Probióticos: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*, *Lactobacillus casei shirota* e *Saccharomyces cerevisiae*. As culturas foram adquiridas nas empresas SACCO, Chr. Hansen, Bela Vista e isoladas de bebidas fermentadas comerciais.

Ativação dos probióticos:

A ativação foi realizada em caldos específicos previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. A levedura em Caldo Malt Extract Powder Refined por 30 minutos a 30±2°C sem agitação em banho metabólico. As bactérias produtoras de ácido lático em caldo MRS por 72 horas a 37±2°C em estufa bacteriológica. Após todas as culturas probióticas estarem ativas, foram realizadas as contagens dos micro-organismos.

Contagem dos micro-organismos:

O método utilizado foi o de inoculação em profundidade em triplicata. As culturas ativas em caldo específico formaram a diluição 10⁻¹. Após a diluição inicial, foram realizadas diluições seriadas consecutivas até 10⁻¹⁰, retirando 1 mL da diluição inicial para 9 mL de água peptonada a 0,1%. Das diluições desejadas foram pipetadas 1 mL para placas de Petri esterilizadas. Adicionou a cada placa 15 mL do meio de cultura ágar MRS para o crescimento de *Lactobacillos* e *Bifidobacterias*. Para os *Streptococos* foram adicionados o ágar ST. O ágar acidificado utilizado para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o BDA.

Todos os meios foram previamente fundidos e resfriados à temperatura de 44±2°C. As placas foram movidas manualmente em formato de oito para a mistura uniforme do inóculo no ágar. Após solidificação foram para a incubação em estufa

bacteriológica. As placas com meio ágar MRS foram mantidas em anaerobiose dentro de jarras modelo Probac com indicador de ausência de oxigênio por 72 horas a $37\pm 2^\circ\text{C}$. As placas com meio ágar ST foram mantidas em aerobiose envolvidas por papel filme por 24 horas a $37\pm 2^\circ\text{C}$. As placas com meio BDA foram mantidas em aerobiose envolvidas por papel filme por 72 horas a $25\pm 2^\circ\text{C}$.

Após a incubação foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/g). Após a contagem das bactérias, as mesmas foram pipetadas no suplemento de acordo com a necessidade de cada ensaio.

Fermentação do suplemento proteico:

No interior da capela de fluxo laminar o mix de probiótico foi inoculado em 100g do suplemento com valores de acordo com o planejamento experimental. O suplemento com os probióticos foi mantido em pote de vidro de 200 mL e armazenado em anaerobiose dentro de jarras modelo Probac com indicador de ausência de oxigênio por cinco dias em estufa bacteriológica.

Respostas fermentativas:

No primeiro planejamento experimental foram verificados os efeitos das variáveis no pH e ácido lático durante o primeiro e quinto dia de fermentação. No segundo planejamento experimental foram verificados os efeitos das variáveis no pH, produção de ácido lático e bactérias lácticas viáveis no último dia de fermentação.

pH: seguiu o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). As amostras foram pesadas em balança analítica. O aparelho pHmetro foi calibrado e operado de acordo com o fabricante.

Ácido lático: seguiu-se o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Para a pesagem utilizou a balança analítica. O conteúdo foi agitado em agitador magnético com a agitação controlada em 20 rpm. As cores das amostras interferiam na visualização do ponto de viragem da fenolftaleína, portanto, a titulação utilizada foi a potenciométrica. Para isto, o phmetro foi imerso nas amostras. O ácido lático produzido foi calculado seguindo a equação: $(AL_p = AL_f - AL_i)$, em que: AL_p : Ácido lático produzido; AL_f : Ácido lático final e AL_i : Ácido lático inicial.

Contagem de bactérias acidoláticas viáveis: Seguiu-se o método descrito por Siqueira (1995). Em capela de fluxo laminar foi adicionado a 225 mL de água peptonada a 0,1%, 25 g do suplemento fermentado, formando a diluição 10^{-1} . A partir

desta diluição foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-10} . O ágar utilizado foi o MRS e incubados em anaerobiose dentro de jarras modelo Probac em estufa bacteriológica. Após a contagem das bactérias, todas apresentaram valores acima de 1×10^8 (UFC/g), concentração ideal para serem consideradas probióticas (Gallina et al., 2011).

Liofilização:

O suplemento proteico fermentado foi colocado em placas de Petri cobertas com papel alumínio perfurado e congelado em freezer à temperatura de -20°C por 24°C . A secagem ocorreu em liofilizador a -57°C por 96 horas. Após a liofilização, o suplemento foi embalado em sacos plásticos 100% polietileno com fecho hermético, triturado manualmente, peneirado e armazenado em embalagens laminadas. Foi utilizada a máquina seladora para o fechamento.

Análise estatística:

A estatística utilizada foi segundo Rodrigues & Iemma (2009) utilizando o Software Protimiza Experimental Design. Foram realizados 24 ensaios no total para identificar o suplemento proteico fermentado otimizado.

Na primeira etapa do experimento, foi utilizado o Planejamento Fatorial Fracionado para quatro variáveis independentes com quatro pontos centrais ($2^{4-1} + 4\text{pc}$), totalizando 12 ensaios utilizados para identificar durante cinco dias quais variáveis influenciam na fermentação e assim definir o próximo fatorial a ser adotado. Foram utilizados: temperatura ($35,00^{\circ}\text{C}$, $40,00^{\circ}\text{C}$ e $45,00^{\circ}\text{C}$), umidade (36,00%, 56,00%, 76,00%), probiótico (7,50%, 10,00%, e 12,50%) e inulina (1,00%, 2,00%, 3,00%). Foi considerado o nível de significância de 10% ($p < 0,1$).

Ao identificar as principais responsáveis pela fermentação, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional para duas variáveis independentes com quatro extremos e quatro pontos centrais ($2^2 + 4$ axiais + 4 pc), totalizando 12 ensaios para verificar durante cinco dias a principal condição para obter o suplemento proteico fermentado otimizado. Foram utilizados: temperatura ($38,96^{\circ}\text{C}$, $40,00^{\circ}\text{C}$, $42,50^{\circ}\text{C}$, $45,00^{\circ}\text{C}$ e $46,04^{\circ}\text{C}$), umidade (51,86%, 56,00%, 66,00%, 76,00% e 80,14%). Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram avaliados pela análise de variância e análises de regressão.

Resultados:

Doze ensaios foram realizados por meio do Planejamento Fatorial Fracionado ($2^{4-1} + 4pc$). Os ensaios e os valores do pH e ácido lático no primeiro e quinto dia de fermentação do suplemento proteico podem ser observados na Tabela 1. Em os tratamentos após a fermentação, houve aumento de ácido lático e, conseqüentemente, queda do pH.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental para a fermentação do suplemento proteico e valores (n=3) do pH e ácido lático no primeiro e quinto dia de fermentação

Ensaio	Variáveis				Respostas			
	Temperatura	Umidade	Probiótico	Inulina	pH		Ácido lático	Ácido lático
	(°C)	(%)	(%)	(%)	1ºd	5ºd	(%)	(%)
1	35,00	36,00	7,50	1,00	5,48	5,35	1,33	1,40
2	45,00	36,00	7,50	3,00	5,31	5,28	1,39	1,40
3	35,00	76,00	7,50	3,00	5,62	3,88	0,47	1,54
4	45,00	76,00	7,50	1,00	5,67	3,58	0,43	2,00
5	35,00	36,00	12,50	3,00	5,48	5,34	1,35	1,49
6	45,00	36,00	12,50	1,00	5,37	5,34	1,35	1,45
7	35,00	76,00	12,50	1,00	5,38	3,98	0,63	1,48
8	45,00	76,00	12,50	3,00	5,28	3,62	0,51	1,83
9	40,00	56,00	10,00	2,00	5,38	3,71	0,87	2,89
10	40,00	56,00	10,00	2,00	5,39	3,70	0,90	2,91
11	40,00	56,00	10,00	2,00	5,37	3,70	0,90	3,18
12	40,00	56,00	10,00	2,00	5,46	3,72	0,90	3,02

Os valores do pH após a fermentação variaram de $3,58 \pm 0,01$ (n=3) a $5,35 \pm 0,02$ (n=3), Tabela 1. O pH mais alto após fermentação do produto foi observado no ensaio 1. Os efeitos das variáveis sobre o pH podem ser observados na Figura 1. As variáveis que apresentaram efeitos significativos ao nível de 10% ($p < 0,10$) foram: média, curvatura, temperatura, umidade com valores de efeitos de 4,55, -1,68, -0,18, -1,56, respectivamente. Observou-se efeito significativo negativo da umidade e temperatura. O probiótico e a inulina não apresentaram efeitos significativos.

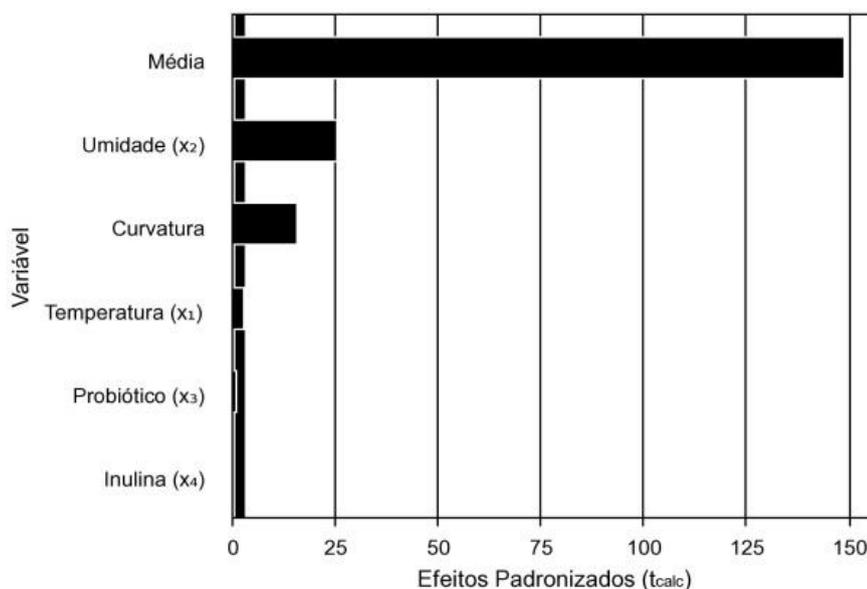


Figura 1. Efeitos padronizados (t_{calc}) das variáveis: média, umidade, curvatura, temperatura, probiótico e inulina sobre o pH

A percentagem de ácido láctico após a fermentação variou de $1,40 \pm 0,05\%$ ($n=3$) a $3,18 \pm 0,03\%$ ($n=3$). O menor valor de ácido láctico ocorreu nas condições do ensaio 1 e 2 (Tabela 1). As variáveis que apresentaram efeitos significativos ao nível de 10% ($p < 0,10$) foram: média, curvatura e umidade com valores de efeitos de 1,57, 2,85, 0,28, respectivamente (Figura 2). Foi observado efeito positivo significativo da umidade, logo, quanto maior a umidade maior a percentagem de ácido láctico no produto. A temperatura, probiótico e inulina não apresentaram efeitos significativos.

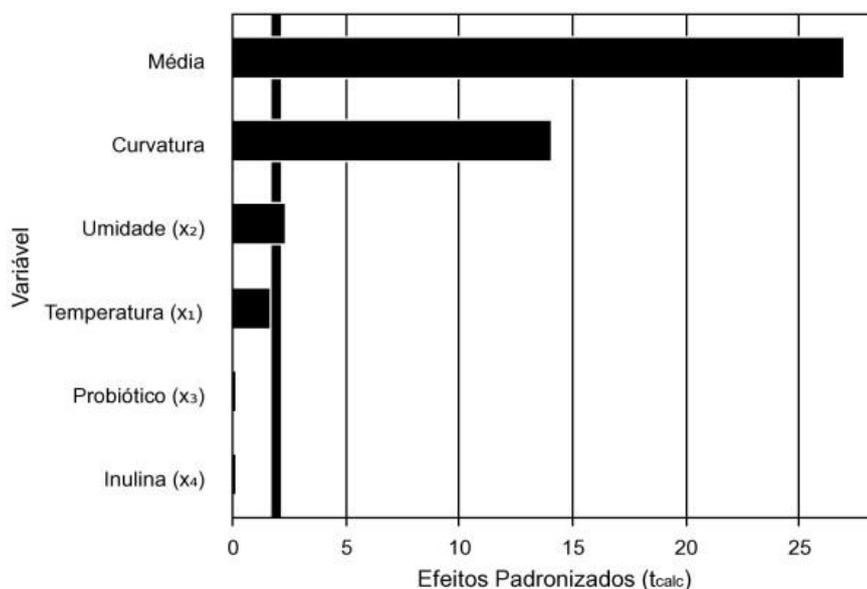


Figura 2. Efeitos padronizados (t_{calc}) das variáveis: média, umidade, curvatura, temperatura, probiótico e inulina sobre o ácido láctico

A partir destes resultados ficou definido para o próximo planejamento eliminar a menor temperatura (35°C), a menor umidade (36%), e fixar as variáveis probiótico e inulina nos valores centrais, 10% e 2%, respectivamente.

Na Tabela 2, são apresentados doze ensaios realizados por meio do Delineamento Composto Central Rotacional ($2^2 + 4$ axiais + 4 pc) e os resultados das análises de pH (y_1), ácido láctico produzido (y_2) e probióticos após a fermentação (y_3).

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental com as variáveis temperatura (X_1) e umidade (X_2) e valores das respostas ($n=3$), pH (Y_1), ácido láctico produzido (Y_2) e probióticos (Y_3) após a fermentação do suplemento proteico

Ensaio	Variáveis		pH	Respostas	
	Temperatura (°C)	Umidade (%)		Ácido láctico (%)	Bactérias lácticas (UFC g ⁻¹)
1	40,00	56,00	3,83	1,47	2,4x10 ⁹
2	45,00	56,00	3,92	1,33	3,3x10 ⁸
3	40,00	76,00	3,49	1,56	3,5 x10 ⁹
4	45,00	76,00	3,69	1,08	2,8x10 ⁸
5	38,96	66,00	3,64	1,66	3,8 x10 ⁹
6	46,04	66,00	3,82	1,36	3,5x10 ⁸
7	42,50	51,86	3,96	1,38	2,1 x10 ⁹
8	42,50	80,14	3,66	1,06	2,8x10 ⁸
9	42,50	66,00	3,76	1,34	3,2x10 ⁸
10	42,50	66,00	3,76	1,31	3,1x10 ⁸
11	42,50	66,00	3,75	1,35	3,6x10 ⁸
12	42,50	66,00	3,75	1,36	3,7x10 ⁸

O pH variou de 3,49±0,01 (n=3) a 3,96±0,01 (n=3). O menor valor de pH foi observado nas condições do ensaio 3 (Tabela 2). Na equação 1, é apresentado o pH previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas. A média, temperatura e umidade apresentaram efeitos potencialmente importantes para o pH (Figura 3A). O comportamento do pH pode ser observado na Figura 3B.

$$(Eq. 1): Y_1=3,75+0,07X_1-0,12 X_2$$

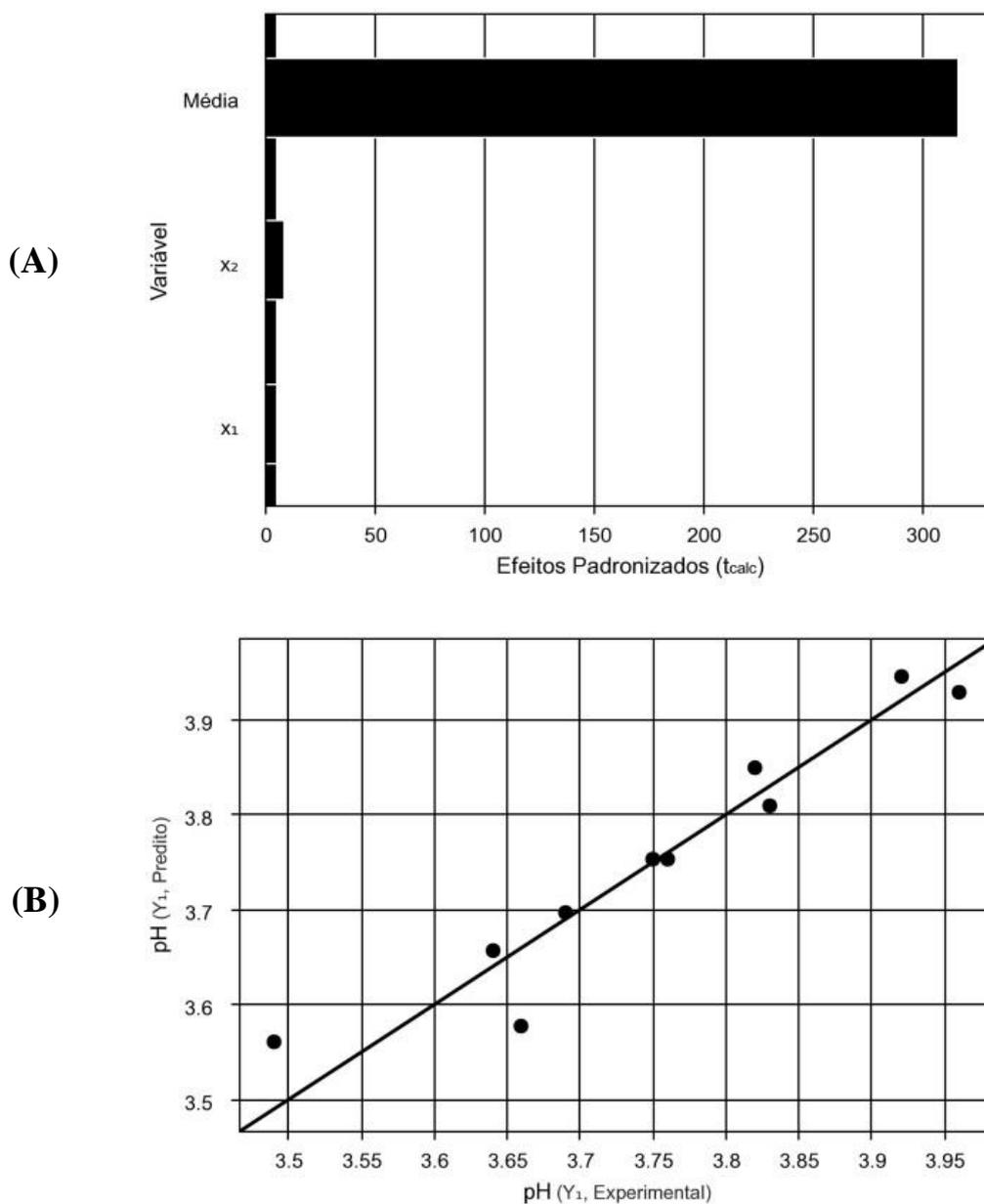


Figura 3. Efeitos padronizados (t_{calc}) das variáveis: média, temperatura e umidade sobre o pH (A) e comportamento do pH com valores experimentais x previstos pelo modelo (B)

O modelo ajustado da reta foi significativo ao nível de 5%, ou seja, houve a existência do comportamento, apresentando uma variação explicada pela regressão de $R^2 = 91,36\%$. Os efeitos da temperatura e umidade para a resposta pH podem ser observados na Figura 4A (superfície de resposta) e 4B (curva de contorno). Houve diminuição no valor de pH com temperatura baixa e umidade alta.

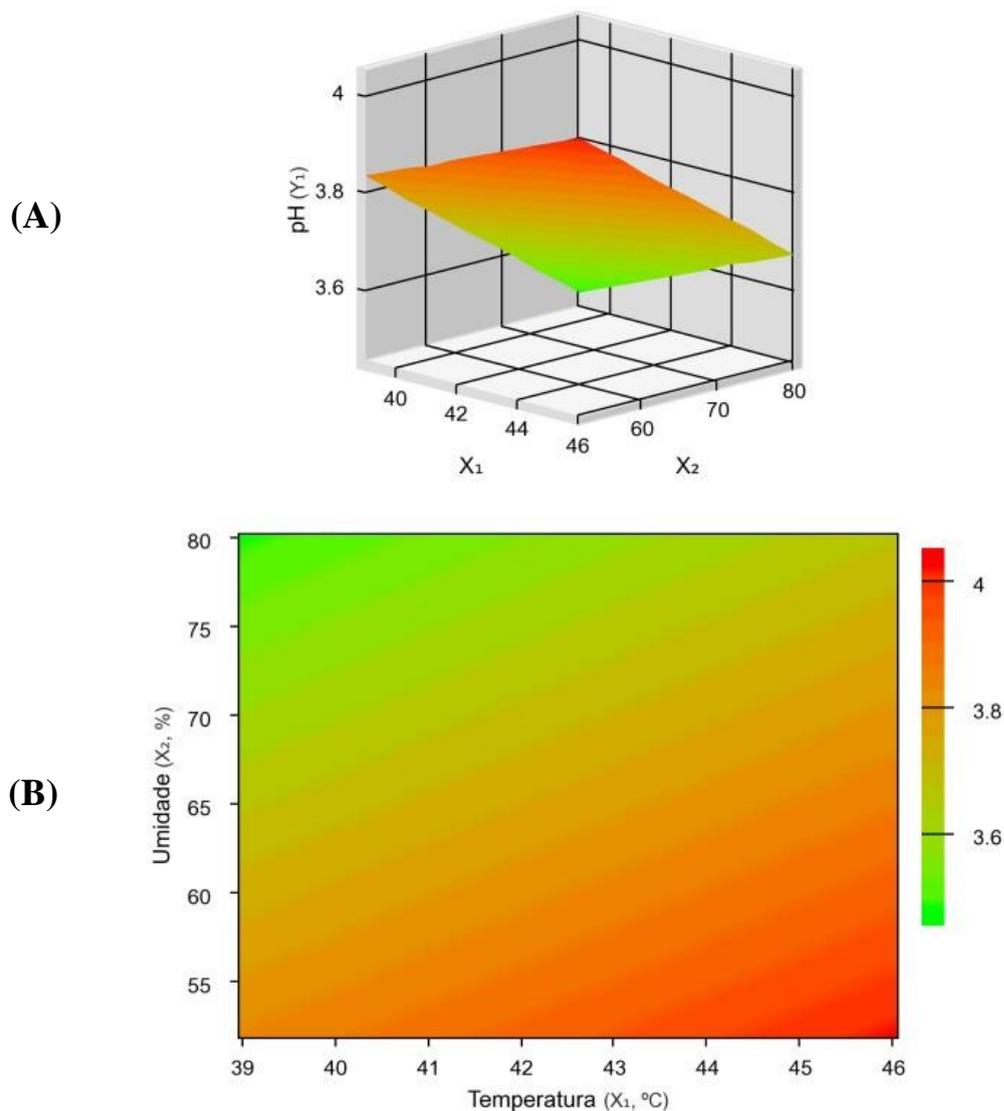


Figura 4. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a resposta pH (Y_1) em função da temperatura (X_1) e umidade (X_2)

A produção de ácido láctico variou de $1,06 \pm 0,01\%$ ($n=3$) a $1,66 \pm 0,02\%$ ($n=3$) sendo maior para as condições do ensaio 5 (Tabela 2). Na equação 2, é apresentado a produção de ácido láctico previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas. A temperatura, umidade e interação entre ambos apresentaram efeitos potencialmente importantes para a produção de ácido láctico (Figura 5A). O comportamento do ácido láctico produzido pode ser observado na Figura 5B.

$$(Eq. 2): Y_2 = 1,34 - 0,13X_1 + 0,08 X_1^2 - 0,08 X_2 - 0,06 X_2^2 - 0,09 X_1 X_2$$

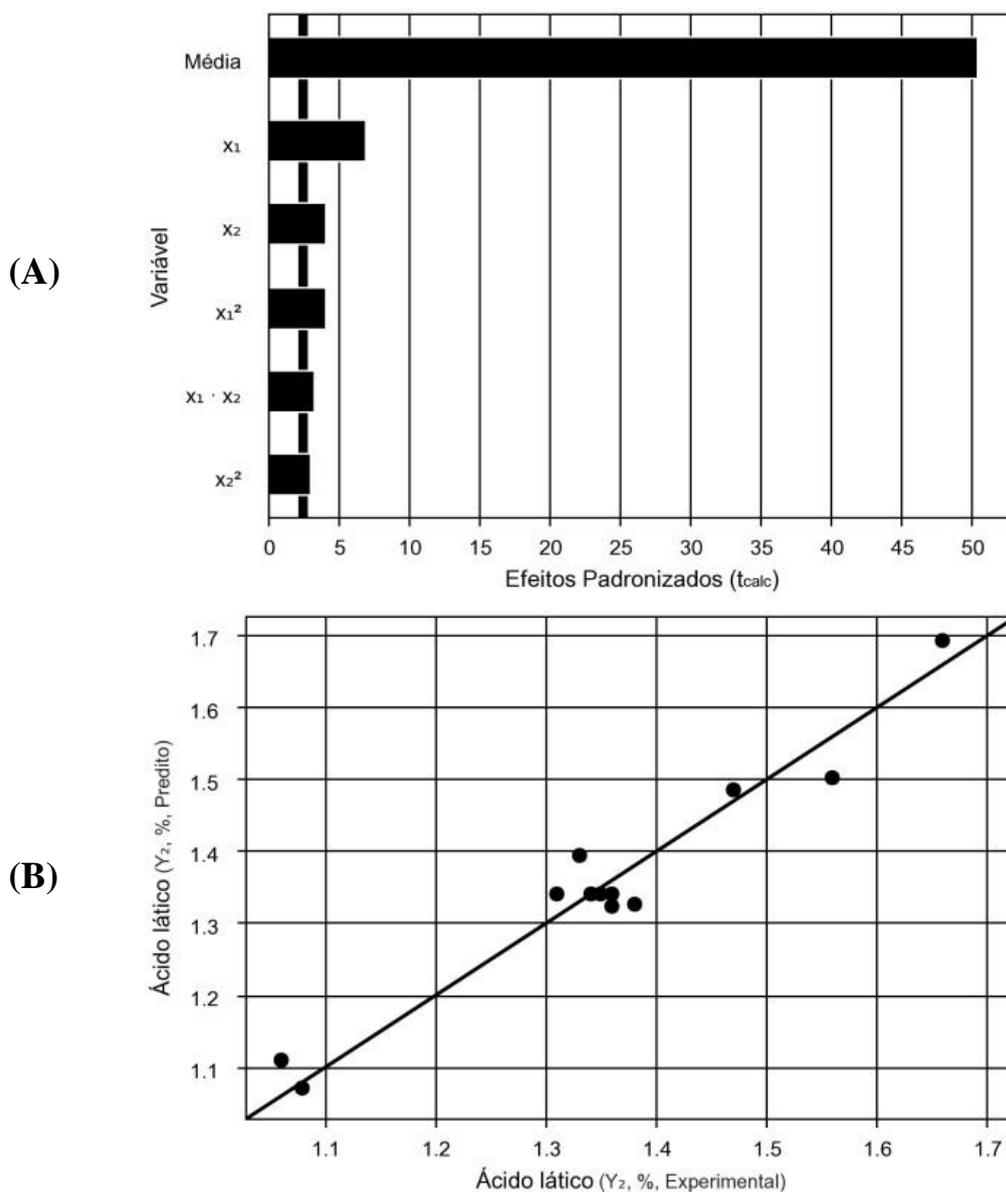


Figura 5. Efeitos padronizados (tcalc) das variáveis: média, temperatura, umidade sobre a produção de ácido láctico (A) e comportamento da produção de ácido láctico com valores experimentais x previstos pelo modelo (B)

O modelo ajustado da reta foi significativo ao nível de 5%, apresentando variação explicada pela regressão de $R^2 = 94,61\%$, houve a existência do comportamento. A superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produção de ácido láctico estão apresentadas nas Figuras 6 A e B. Ocorreu aumento na produção de ácido láctico em temperaturas baixas e umidade central dentro das faixas estudada.

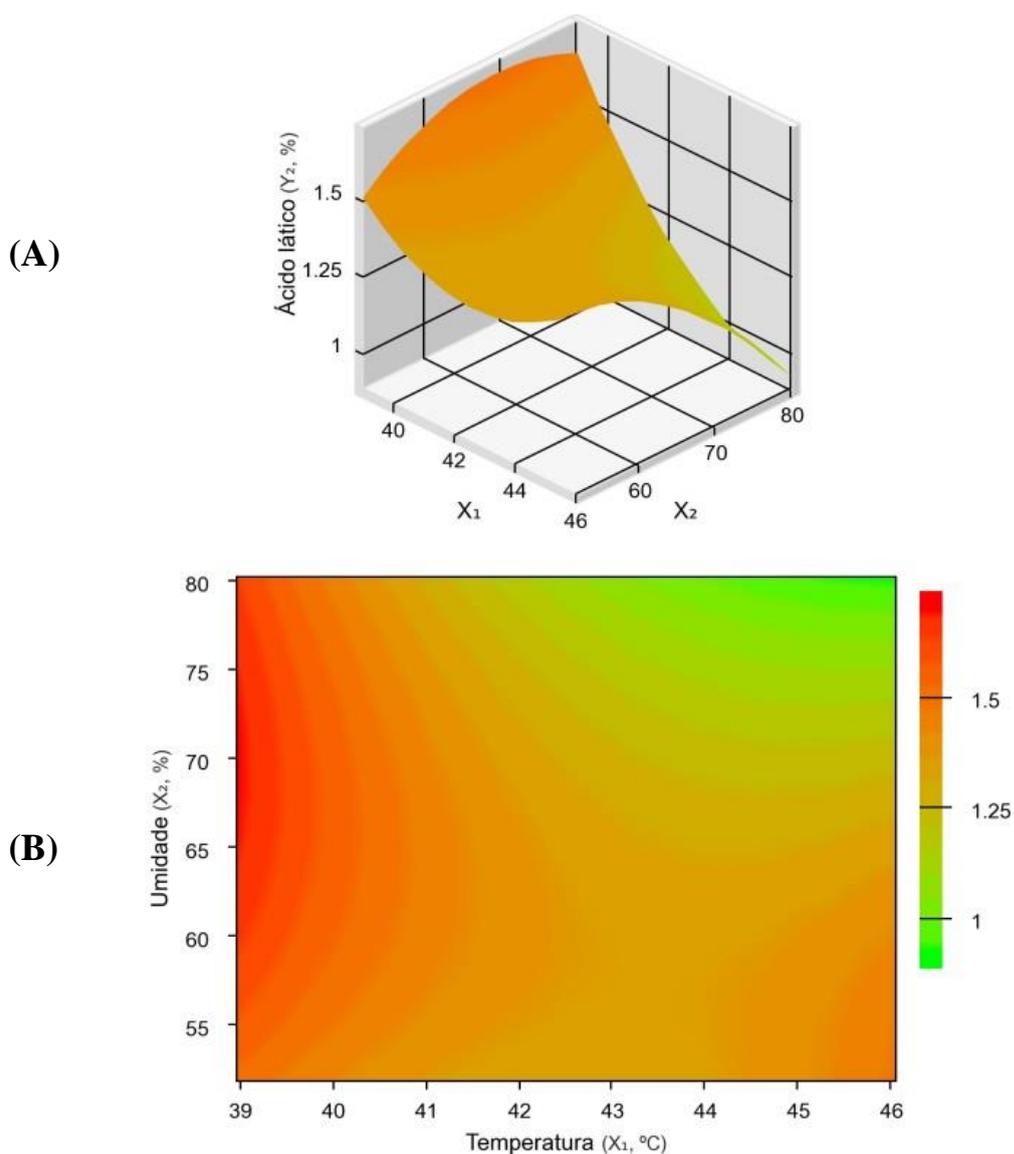


Figura 6. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a resposta produção de ácido láctico (Y_2) em função da temperatura (X_1) e umidade (X_2)

A quantidade de probióticos por grama do produto variou de $2,8 \pm 0,15 \times 10^8$ a $3,8 \pm 0,05 \times 10^9$ (UFC)g⁻¹. As variáveis não apresentaram efeitos para esta resposta. O modelo ajustado da reta não foi significativo ao nível de 5%, determinando a não existência de comportamento.

Com o resultado de todas as análises o software forneceu novas formulações otimizadas e originadas pelos modelos construídos utilizando os valores codificados. O modelo formulado aceito nesta pesquisa apresentou o valor de 38,96°C de temperatura e 66,00% de umidade para obter aproximadamente pH de $3,66 \pm 0,02$ e produção de ácido láctico de $1,69 \pm 0,06$ no produto final.

Discussão

Em todos os ensaios observou-se a fermentação. Naturalmente, durante a fermentação ocorre o aumento de ácido láctico e conseqüentemente queda do pH (Hu et al., 2008). Um dos ingredientes do suplemento foi o pólen e, com a fermentação, a exina, microestrutura que serve de proteção para o pólen, pode ser parcialmente destruída e o rico conteúdo de nutrientes assimilado e utilizado (Mutsaers et al., 2005; Ariizumi & Toriyama, 2011). Todos os ingredientes tornam-se biodisponíveis, deixando o produto fermentado mais digestível (Tonheim et al., 2007) e estável, restringindo o crescimento de micro-organismos patogênicos (Pattabhiramaiah, Reddy, & Brueckner, 2012). O produto formulado foi fermentado de forma efetiva, proporcionando ao produto final um suplemento nutricional, protegido e probiótico.

O valor do pH final do produto fermentado variou de $3,49 \pm 0,01$ a $3,96 \pm 0,01$. O pH em dietas fermentadas após 2 semanas é de 4,51 a 4,82 (Ellis & Hayes Jr., 2009), no pão da abelha é de 3,8 a 4,3 (Herbert & Shimanuki, 1978) e 3,93 a 4,23 (Barene, Daberte, & Sikсна, 2015), no pão da abelha fermentado durante 20 dias produzido em laboratório é de 3,83 a 4,25 (Araneda et al., 2014) e pão da abelha fermentado durante 15 dias produzido em laboratório é de 3,89 a 4,24 (Risco-Ríos et al., 2014), no pólen é de 4,1 a 5,9 (Herbert & Shimanuki, 1978) e no pólen desidratado é de 4,12 a 5,35 (Barreto, Funari, & Orsi, 2005). Uma rápida redução do pH no suplemento desenvolvido ocorreu durante os cinco dias de fermentação por causa da fermentação ativa realizada pelos micro-organismos.

A produção de ácido láctico do suplemento fermentado variou de $1,06 \pm 0,01$ a $1,66 \pm 0,02\%$, valor próximo ao encontrado na literatura. No pólen fermentado em laboratório, Risco-Ríos et al. (2012) obtiveram a variação de $0,28 \pm 0,08\%$ a $2,26 \pm 0,08\%$ e Risco-Ríos et al. (2014) de $0,34 \pm 0,05\%$ a $2,00 \pm 0,07\%$. Existe uma dificuldade na comparação dos resultados pela diferença no método de execução, substrato e micro-organismos utilizados. Os micro-organismos produzem substâncias que acidificam o substrato, em destaque, o ácido láctico (Leroy & Vuyst, 2004; Hu et al., 2008). É adequado verificar a adaptabilidade e compatibilidade das culturas selecionadas ao substrato utilizado (Saad et al., 2011). O suplemento formulado foi adequado para a atividade das bactérias e leveduras e, conseqüentemente, o meio foi acidificado apresentando valores altos de ácido láctico produzido.

Foi utilizado um ambiente anaeróbico para a fermentação do suplemento, meio

semelhante à fermentação do pólen quando armazenado no favo. A levedura tem papel fundamental no consumo do oxigênio (Hu et al., 2008). A condição anaeróbica foi um parâmetro essencial para a rápida fermentação do produto, bem como, a temperatura e umidade tiveram efeitos significativos para a permanência e atividade dos micro-organismos no meio.

A temperatura 38,96°C apresentou efeitos representativos sobre a queda do pH e produção de ácido lático. Os micro-organismos são capazes de serem encontrados em ampla faixa de temperatura. Abaixo do valor mínimo são inibidos, acima do valor máximo não sobrevivem. O intervalo ideal para a ativação e sobrevivência das bactérias acidoláticas compreende-se entre 30-40°C (Siqueira, 1995; Gandra & Gandra, 2007; Silva et al., 2010). A temperatura estabelecida para a fermentação do suplemento está de acordo com a temperatura ideal de crescimento e atividade das bactérias acidoláticas.

A umidade de 66% utilizada apresentou efeito nas respostas fermentativas. Hu et al. (2008) e Risco-Ríos et al. (2012) verificaram em seus estudos a existência da relação entre umidade alta, queda do pH e aumento de ácido lático, corroborando com os resultados encontrados. Na colmeia de abelhas *Apis mellifera* L., o alvéolo em que é estocado o pólen para fermentação pode ser comparado a um silo. Em silos a umidade exerce forte influência na fermentação em que o aumento da percentagem de umidade proporciona aumento de acidez e diminuição do pH da silagem (Risco-Ríos et al., 2014). A água precisa estar disponível para os micro-organismos realizarem as atividades metabólicas (Gandra & Gandra, 2007). No suplemento fermentado desenvolvido, a alta umidade permitiu eficiente atividade dos micro-organismos durante o processo de fermentação.

Não houve efeito na quantidade de inulina (1%, 2% e 3%) utilizada sobre as respostas fermentativas. Uma maior atividade das bactérias foi observada quando utilizaram 1% de inulina em um produto com características próximas ao pão da abelha (Vamanu et al., 2010). O mel, prebiótico natural estimulante do crescimento e atividade das bactérias (Vamanu et al., 2010), foi um dos ingredientes do suplemento fermentado desenvolvido. A atividade fermentativa das bactérias ocorreu efetivamente, possivelmente, houve a colaboração dos 2% de inulina, acrescidos do mel.

A quantidade de probiótico (7,50%, 10,00% e 12,50%) adicionada ao suplemento não apresentou efeito significativo sobre as respostas fermentativas. Culturas mistas e o substrato disponível são variáveis importantes para a fermentação, portanto, a presença de uma espécie favorece o desenvolvimento da outra (Gandra &

Gandra, 2007; Martín & Cuenca, 2009). Ellis & Hayes Jr (2009) utilizaram *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum* para promover a fermentação da dieta e sugerem que há melhora no valor nutricional e na palatabilidade do produto. Portanto, a definição do tipo de cultura e a combinação das culturas a serem utilizadas, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*, *Lactobacillus casei shirota* e *Saccharomyces cerevisiae*, interferiram mais na fermentação do que a quantidade utilizada de 10%.

A concentração superior a 10^8 UFC/g presente no suplemento fermentado desenvolvido corrobora com a concentração indicada para produtos probióticos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008). Preparações probióticas comerciais utilizam concentrações médias de 10^9 UFC/g (Kazimierczak-Baryczko & Szymaś, 2006; Szymaś, Łangowska, & Kazimierczak-Baryczko, 2012). Independente do valor adicionado ao suplemento fermentado desenvolvido, o produto final de todos os ensaios apresentaram UFC/g ideais para serem considerados como produto probiótico. As bactérias se reproduziram e colonizaram o substrato existente com quantidades ideais para o meio em que estavam situadas.

Conclusões:

Foi possível desenvolver um suplemento proteico fermentado otimizado em condições de laboratório em cinco dias;

O método desenvolvido para fermentar o suplemento forneceu condições ideais para uma eficiente atividade dos micro-organismos;

O suplemento desenvolvido possuiu características fermentativas próximas ao do pão da abelha, alimento natural das abelhas.

Referências:

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2008). Alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou saúde, novos alimentos/ ingredientes, substâncias bioativas e probiótic. Acessado em: 22 Fevereiro de 2017 de http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm.

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser D., Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 1(1), 1-4. DOI:10.1098/rsbl.2009.0986

Altaye, S. Z., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M., Nicolson, S. W. (2010). Convergence of carbohydrate-biased intake targets in caged worker honeybees fed different protein sources. *Journal of Experimental Biology*, 213(1), 3311-3318. DOI:10.1242/jeb.046953

Anderson, K., E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M., Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PlosOne*, 8(12), 1-16. DOI:10.1371/journal.pone.0083125

Araneda, X., Velásquez, C., Morales, D., Martínez, I. (2014). Producción de pan de abejas (*Apis mellifera* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Idesia*, 32(4), 63-69. DOI:10.4067/S0718-34292014000400008

Ariizumi, T., & Toriyama, K. (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 437-460. DOI:10.1146/annurev-arplant-042809-112312

Barene, I., Daberte, I., & Siksna, S. (2015). Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos: Teorija ir Praktika*, 21(1), 16-22. DOI:10.15591/mtp.2015.003

Barreto, L. M. R. C., Funari, S. R. C., & Orsi, R. O. (2005). Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do distrito federal. *Boletim de Indústria Animal*. 62(2), 167-175.

Brodtschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294. DOI:10.1051/apido/2010012

Cappelari, F. A., Turcatto, A. P., Morais, M. M., De Jong, D. (2009). Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). *Genetics and Molecular Research*, 8(4), 1245-1249. DOI:10.4238/vol8-4gmr628

Dave, R. I., & Shah, N. P. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, 79(9), 1529 - 1536. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(96)76513-X

De Jong, D., Silva, E. J., Kevan, P., Atkinson, J. L. (2009). Pollen substitutes increase

honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *Journal of Apicultural Research*, 48(1), 34-37. DOI:10.3896/IBRA.1.48.1.08

Ellis, A. M., & Hayes Jr, G. W. (2009). An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 215-216. DOI:10.3896/IBRA.1.48.3.11

Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699-735. DOI:10.1111/1574-6976.12025

Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A., Cornman, R. S., Dainat, J., Miranda, J. R., Doublet, V., Emery, O., Evans, J. D., Farinelli, L., Flenniken, M. L., Granberg, F., Grasis, J. A., Gauthier, L., Hayer, J., Koch, H., Kocher, S., Martinson, V. G., Moran, N., Munoz-Torres, M., Newton, I., Paxton, R. J., Powell, E., Sadd, B. M., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., Song, S. J., Schwarz, R. S., vanEngelsdorp, D., Dainatab, B. (2016). The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio American Society for Microbiology*, 7(2), e02164-15. DOI:10.1128/mBio.02164-15

Evans, J.D., & Lopez, D.L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 752-756. DOI:10.1603/0022-0493(2004)097[0752:BPIAIR]2.0.CO;2

Fuenmayor, C. A., Quicazán, M. C., & Figueroa, J. (2011). Desarrollo de un suplemento nutricional mediante la fermentación en fase sólida de polen de abejas empleando bacterias ácido lácticas probióticas. *Revista Alimentos Hoy*, 20(23), 18-40.

Gallina, D. A., Alves, A. T. S., Trento, F. K. H. S., Carusi, J. (2011). Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 13(4), 239-244.

Gandra, E. A., & Gandra, T. K. V. (2007). *Introdução à microbiologia de alimentos*. Maringá: EDUEM.

Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *Mircobiology Reviews*, 2(2), 251–260. DOI:10.1016/j.femsre.2003.10.005

Herbert Jr., E. W., & Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9(1), 33-40.

Hu, J., Lu, W., Wang, C., Zhu, R., Qiao, J. (2008). Characteristics of solid-state fermented feed and its effects on performance and nutrient digestibility in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 21(11), 1635-1641.

Instituto Adolfo Lutz. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

Kazmierczak-Baryczko, M., & Szymaś, B. (2006). Improvement of the composition of pollen substitute for honey bee (*Apis mellifera* L.), through implementation of probiotic preparations. *Journal of Apicultural Science*, 50(1), 15-23.

Kaznowski, A., Szymaś, B., Jazdzinska, E., Kazmierczak, M., Paetz, H., Mokracka, J. (2005). The effect of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 44(1), 10-14. DOI:10.1080/00218839.2005.11101139

Leroy, F., & Vuyst, L. D. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78. DOI:10.1016/j.tifs.2003.09.004

Manning, R., Rutkay, A., Eaton, L., Dell, B. (2007). Lipid-enhanced pollen and lipid-reduced flour diets and their effect on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Australian Journal of Entomology*, 46(3), 251–257. DOI:10.1111/j.1440-6055.2007.00598.x

Martín, M. A. B., & Cuenca, M. C. Q. (2009). Valoración de diferentes indicadores de la fermentación de bebida de soya y de leche de vaca utilizando cultivos probióticos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 7(1), 100-106.

Morais, M. M., Turcatto, A. P., Pereira, R. A., Francoy, T. M., Guidugli-Lazzarini, K. R., Gonçalves, L. S., de Almeida, J. M. V., Ellis, J. D., De Jong, D. (2013a). Protein levels and colony development of Africanized and European honey bees fed natural and artificial diets. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6915-6922. DOI:10.4238/2013

Morais, M. M., Turcatto, A. P., Francoy, T. M., Gonçalves, L. S., Cappelari, F. A., De Jong, D. (2013b). Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of haemolymph proteins. *Journal of Apicultural Research*, 52(3), 119-121. DOI:10.3896/IBRA.1.52.3.01

Mutsaers, M., Blitterswijk, H., Leven, L., Kerkvliet, J., Waerdt, J. (2005). *Bee products: properties, processing and marketing*. Wageningen: Agromisa Foundation.

Nagai, T., Nagashima, T., Suzuki, N., Inoue, R. (2005). Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread. *Zeitschrift für Naturforschung*, 60(1-2), 133-138.

Nicholls, C. I., & Altieri, M. A. (2012). Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(2), 257-274. DOI:10.1007/s13593-012-0092-y

Pătruică, S., & Hutu, I. (2012). The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal micro-flora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bulletin of Entomological Research*, 102(1), 619–623. DOI:10.1017/S0007485312000144

Pătruică, S., Dumitrescu, G., Stancu, A., Bura, M., & Dunea, I. B. (2012). The effect of prebiotic and probiotic feed supplementation on the wax glands of worker bees (*Apis mellifera*). *Animal Sciences and Biotechnologies*, 45(2), 268-271.

- Pătruică, S., & Mot, D. (2013). Economic benefits of using prebiotic and probiotic products as supplements in stimulation feeds administered to bee colonies. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1), 259-263. DOI:10.3906/vet-1110-20
- Pattabhiramaiah, M., Reddy, M. S., & Brueckner, D. (2012). Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus spp.* in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(3), 1135-1143. DOI:10.6088/ijes.00202030002
- Pereira, F. M., Freitas, B. M., Neto, J. M. V., Lopes, M. T. R., Barbosa, A. L., Camargo, R. C. R. (2006). Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos proteicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(1), 1-7. DOI:10.1590/S0100-204X2006000100001
- Podrižnik, B. & Božič, J. (2015). Maturation and stratification of antibacterial activity and total phenolic content of bee bread in honey comb cells. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 81–92. DOI:10.1080/00218839.2015.1090774
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345–353. DOI:10.1016/j.tree.2010.01.007
- Raymann, K., Shaffer, Z., & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *Plos Biology*, 15(3), 1-22. DOI:10.1371/journal.pbio.2001861.g001
- Risco-Ríos, C. A. D., Pérez-Piñeiro, A., Álvarez-Rivera, V. P., Rodríguez-Castro, G., Leiva-Castillo, V., Puig-Peña, Y., García-Neninger, R. (2012). Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 43(1), 17-21.
- Risco-Ríos, C. A. D., Peña, Y. P., Castro, G. R., Castillo, V. L., Neninger, R. G., Cervera, Z. M. A. (2014). Optimización de la fermentación ácido láctica del polen apícola a escala de laboratorio. *Apiciencia: La Revista Cubana de Ciencia Apícola*, 16(2), 1-14.
- Rodrigues, M., I., & Iemma, A., F. (2009). *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. Campinas: Casa do espírito amigo fraternidade fé e amor.
- Saad, S. M. I., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2011). *Probióticos e prebióticos em alimentos*. São Paulo: Varela.
- Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M., Castro, S. E. S., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Furlan, A. C. (2010a). Lifespan of Africanized honey bees fed with various proteic supplements. *Journal of Apicultural Science*, 54(2), 37-49.
- Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Furlan, A. C., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M., Wielewski, P. (2013). Alternative sources of supplements for Africanized honeybees submitted to royal jelly production. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 35(2), 165-171. DOI:10.4025/actascianimsci.v35i2.16976

Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Sekine, E. S., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M. (2010b). Viabilidade financeira da produção de geleia real com abelhas africanizadas suplementadas com diferentes nutrientes. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, 32(4), 467-474. DOI:10.4025/actascianimsci.v32i4.7895

Silva, N, Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., Gomes, R. A. R. (2010). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Varela.

Siqueira, R. S. (1995). *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: EMBRAPA.

Szymaś, B., Łangowska, A., & Kazimierczak-Baryczko, M. (2012). Histological structure of the midgut of honey bees (*Apis mellifera* L.) fed pollen substitutes fortified with probiotics. *Journal of Apicultural Science*, 56(1), 5-12. DOI:10.2478/v10289-012-0001-2

Tonheim, S. K., Nordgreen, A., Høgøy, I., Hamre, K., Rønnestad, I. (2007). In vitro digestibility of water-soluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. *Aquaculture*, 262(2-4), 426-435. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.10.030

Vamanu, E., Vamanu, A., Popa, O., Băbeanu, N. (2010). The antioxidant effect of a functional product based on probiotic biomass, pollen and honey. *Animal Science and Biotechnologies*, 43(1), 331-336.

Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PlosOne*, 7(3), 1-9. DOI:10.1371/journal.pone.0033188

IV – Longevidade de abelhas africanizadas alimentadas com suplemento proteico fermentado por probióticos

RESUMO: O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do suplemento proteico fermentado por probióticos sobre o acréscimo de vida das abelhas africanizadas confinadas em gaiola. Foram utilizados quatro tratamentos com cinco repetições. Os tratamentos foram: xarope, pólen, suplemento proteico e suplemento proteico fermentado. Para a fermentação do suplemento, foram utilizados os probióticos: *Lactobacilos*, *Bifidobacterias* e *Saccharomyces* e o prebiótico inulina. As respostas avaliadas foram: consumo do suplemento, taxa de mortalidade e aumento da longevidade. Nos 30 primeiros dias de vida, o consumo médio mais alto foi das abelhas alimentadas com suplemento proteico não fermentado $17,42 \pm 1,78g$ e o menor das abelhas alimentadas com suplemento proteico fermentado por probióticos $6,75 \pm 1,09g$. A maior taxa de mortalidade foi encontrada em abelhas alimentadas apenas com o xarope, 100% no 36º dia de vida e a mais baixa foi em abelhas alimentadas com suplemento proteico fermentado por probióticos de 92,6% e suplemento proteico não fermentado de 95,4%. A maior longevidade foi observada em abelhas alimentadas com suplemento proteico fermentado por probióticos de $16,8 \pm 1,6$ dias e a menor foi em abelhas alimentadas com o pólen $9,6 \pm 1,3$ dias. Conclui-se que a fermentação e a presença de probióticos no suplemento promoveram nas abelhas que a consumiram, uma rápida saciedade, menos mortes e aumento da longevidade em abelhas mantidas em sistema fechado.

PALAVRAS-CHAVE: *Apis mellifera*, *Bifidobacterias*, consumo, *Lactobacilos*, mortalidade, *Saccharomyces*.

IV - Longevity of Africanized honeybees fed with protein supplement fermented by probiotics

ABSTRACT: The aim of this research was to evaluate the effect of the protein supplement fermented by probiotics at increasing the longevity of the Africanized honeybees confined in cages. Four treatments with five repetitions were used. The treatments were: sugar syrup, pollen, protein supplement and fermented protein supplement. For the supplement fermentation the probiotics used were: *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Saccharamyces* and the inulin prebiotic. The responses evaluated were: supplement intake, mortality rate and longevity increment. In the first 30 days, the highest average consumption was from the treatment with honeybees fed with unfermented protein supplement 17.42 ± 1.78 g and the lowest was from honeybees fed with protein supplement fermented by probiotic 6.75 ± 1.09 g. The highest mortality rate was found in honeybees fed only with sugar syrup, 100% in the 36th day of life, and the lowest was found in honeybees fed with protein supplement fermented by probiotic of 92.6% and unfermented protein supplement 95,4%. The highest longevity was observed in honeybees fed with protein supplement fermented by probiotic of 16.8 ± 1.6 days and the lowest was found in the treatment with honeybees fed with pollen 9.6 ± 1.3 days. It was concluded that fermentation and the presence of probiotics in supplement promoted a quick satiety, fewer deaths and increased longevity in bees kept in a closed system.

KEY WORDS: *Apis mellifera*, *Bifidobacteria*, consumption, *Lactobacilli*, mortality, *Saccharomyces*.

Introdução:

Prolongar a vida das abelhas contribui para maior população de forrageiras, aumento da produção de mel e melhor eficiência da polinização (Yang et al., 2017). A longevidade da operária é fortemente influenciada pela dieta e pode ser beneficiada pelo consumo de proteína (Brodschneider & Crailsheim, 2010; Wang et al., 2014). O pólen fermentado, também denominado pão da abelha, é a principal fonte de proteína para as abelhas (Tomás et al., 2017).

A necessidade pelo consumo de proteína quando adulta aumenta nos primeiros dias de vida e diminui ligeiramente em abelhas mais velhas, sendo fundamental a ingestão de dez aminoácidos essenciais (De Groot, 1953). Para obter estes aminoácidos, as abelhas coletam grãos de pólen de várias espécies para suprir suas necessidades (Dimou & Thrasyvoulou, 2009). As abelhas armazenam a quantidade de pólen necessária para manter a cria, alterando o comportamento de forrageamento (De Lima, 2016).

A falta de alimento armazenado ou a nutrição deficiente é umas das principais razões para as perdas das colônias (Naug, 2009). Para que não enfraqueçam, suplementos são utilizados para manter ou aumentar a população (Barragán, Basualdo & Rodrigues et al., 2015). Não é recomendado fornecer pólen as colônias pelo risco de espalhar patógenos. Os substitutos ou suplementos proteicos são as alternativas mais favoráveis (Brodschneider & Crailsheim, 2010).

Várias dietas proteicas suplementares foram formuladas apresentando benefícios para as abelhas (Pereira et al., 2006; Cappelari et al., 2009; De Jong et al., 2009; Sereia et al., 2010a,b; 2013; Morais et al., 2013a,b). Reconhece-se o alto valor nutritivo dos suplementos, mas ainda não se equivale a alimentação natural, pois não possuem microorganismos que beneficiam a saúde da abelha (Kazimierzak-Baryezko & Szymaś, 2006).

As bactérias identificadas no pólen das flores também são encontradas frequentemente na colmeia e no aparelho digestivo das abelhas (Anderson et al., 2013). Ao emergir a operária não possui microbiota no aparelho digestivo. O pão da abelha é a principal rota de inoculação. Quando adulta abriga grande comunidade bacteriana no intestino, com cerca de 1 bilhão de células bacterianas (Martinson, Moy, & Moran, 2012; Powell et al., 2014).

Os principais grupos de espécies de bactérias estão presentes em regiões

específicas. A vesícula melífera possui pouca bactéria, que toleram as condições de oxigênio e acidez do néctar. O intestino médio, em que ocorre a digestão e absorção do alimento, também possui pouca bactéria, pois é envolvido pela membrana peritrófica. No entanto, o intestino posterior é dominado por bactérias, tais como, *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apícola*, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (Engel & Moran, 2013; Moran, 2015; Kwong & Moran, 2016). Com exceção as paredes do sistema digestivo, todo o ambiente é anaeróbico e ácido e a principal consumidora de oxigênio é a *Snodgrassella alvi*. Ocorre também a redução do pH, para aproximadamente 5,2, especialmente no íleo e no reto, em que a maioria das bactérias se localizam (Zheng et al., 2017).

Os micro-organismos presentes nos suplementos desempenham papel importante no estímulo a resposta imune das abelhas (Evans & Lopez, 2004); crescimento da colônia, aumento do número de cria, aumento da população de abelhas forrageiras, aumento da produção de mel (Pătruică & Hutu, 2013); reduz bactérias patogênicas no intestino e repovoa com as espécies benéficas (Pătruică & Mot, 2012); maior desenvolvimento das glândulas de cera e secreção de cera (Pătruică et al., 2012); maiores quantidades de membranas peritróficas (Szymaś, Łangowska, & Kazimierczak-Baryczko, 2012); melhor utilização dos nutrientes (Kaznowski et al., 2005); maior desenvolvimento das glândulas faciais (Kazimierczak-Baryczko & Szymaś, 2006); maior sobrevivência das abelhas, maior massa seca e corpo gorduroso (Kaznowski et al., 2005, Kazimierczak-Baryczko & Szymaś, 2006).

É essencial o desenvolvimento de substitutos de pólen melhorados, com alto valor nutritivo que aumentem a vida das abelhas. Os substitutos do pólen precisam ser suplementados com microrganismos que colonizam o trato digestivo. Uma alimentação de curto prazo, dois dias, é o suficiente para colonizar o intestino da abelha (Kaznowski et al., 2005). Devido aos benefícios apresentados, esta pesquisa teve como objetivo identificar, em laboratório, o efeito do suplemento proteico fermentado por probióticos na longevidade das abelhas africanizadas.

Material e Métodos

Local:

As análises foram realizadas no Laboratório de Prestação de Serviço da Universidade Tecnológica Federal do Paraná em Campo Mourão no Estado do Paraná, entre o período de março a junho de 2017.

Dieta:

Um total de quatro dietas foi fornecido às abelhas confinadas em gaiolas:

Xarope (controle):

A água mineral e o açúcar cristal foram pesados em balança analítica de precisão na mesma proporção (1:1). Posteriormente, foram homogeneizados com bastão de vidro em Becker, aquecidos em chapa de aquecimento até dissolver todo o açúcar.

Pólen:

O pólen multifloral foi desidratado em estufa de secagem de circulação de ar a 40°C, moído, peneirado e armazenado em plásticos de polietileno em freezer a -20°C.

Suplemento proteico:

O suplemento proteico foi o desenvolvido por Sereia et al. (2013a). A cada 100 gramas, o suplemento era composto por: 17,5g de proteína de soja, 4g óleo de linhaça, 4g óleo de palma, 17,5g levedo de cerveja, 40,9g açúcar cristal, 10g mel multifloral, 5g pólen multifloral, 1g lecitina de soja, 0,1g núcleo de vitaminas.

Suplemento proteico fermentado:

O suplemento submetido à fermentação foi o desenvolvido por Sereia et al. (2013a) com modificação. A modificação foi a eliminação da carga microbiana presente no pólen seguindo o método descrito por Fuenmayor, Quicazán, & Figueroa (2011). A permanência da mistura de pólen multifloral: água destilada (2:1) em autoclave a 121°C durante 15 minutos é suficiente para eliminar os micro-organismos presentes sem alterar a composição do pólen. O pólen foi autoclavado nesta proporção em frasco de vidro de 200 mL devidamente tampado.

Todos os ingredientes do suplemento foram pesados em balança de precisão

eletrônica e acrescentados 2% do prebiótico inulina Orafti® GR. Uma esterilização final foi realizada, permanecendo os ingredientes por 15 minutos em estufa de esterilização e secagem a 90°C. A percentagem de umidade foi determinada seguindo o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Posteriormente, foi realizada a equação global para o balanço de massa. Utilizou água destilada para manter a umidade em 66%.

No interior da capela de fluxo laminar, o mix de 10% dos probióticos foi inoculado em 100g do suplemento. O mix era composto por: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus*, *Bifidobacterium animalis* spp. *Lactis*, *Lactobacillus casei shirota* e *Saccharomyces cerevisiae*. As culturas foram adquiridas nas empresas SACCO, Chr. Hansen, Bela Vista e isoladas de bebidas fermentadas comerciais.

A ativação dos probióticos foi realizada em caldos específicos previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. A levedura em Caldo Malt Extract Powder Refined da Himedia® por 30 minutos a 30±2°C em banho metabólico sem agitação. As bactérias produtoras de ácido lático em caldo De Man, Rogosa e Sharpe *Lactobacillus* da Acumedia® (MRS) por 72 horas a 37±2°C em estufa bacteriológica.

O suplemento inoculado foi mantido em potes de vidros de 200 mL e armazenado em anaerobiose dentro de jarras modelo Probac com indicador de ausência de oxigênio por cinco dias em estufa bacteriológica a 38,9°C. Depois de fermentado, a confirmação dos probióticos no suplemento foi realizada pela contagem das bactérias acidoláticas, conforme descrito em Siqueira (1995).

O método utilizado foi o de inoculação em profundidade em triplicata. Em capela de fluxo laminar foi adicionado a 225 mL de água peptonada a 0,1%, 25 g do suplemento fermentado, formando a diluição 10⁻¹. Após a diluição inicial, foram realizadas diluições seriadas consecutivas, retirando 1 mL da diluição inicial para 9 mL de água peptonada a 0,1%. Das diluições 10⁻⁶ a 10⁻¹⁰ foram pipetadas 1 mL para placas de Petri esterilizadas.

Adicionou a cada placa 15 mL do meio de cultura ágar De Man, Rogosa e Sharpe *Lactobacillus* da MicroMed® (MRS). O meio foi previamente fundido e resfriado à temperatura de 44±2°C. As placas foram movidas suavemente em formato de oito para a distribuição uniforme no crescimento das colônias. Após solidificação as placas foram mantidas em anaerobiose dentro de jarras modelo Probac com indicador de ausência de oxigênio por 72 horas a 37±2°C. Após a incubação foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/g). O suplemento apresentou

valores acima de 1×10^8 (UFC/g), concentração ideal para ser considerado probiótico (Gallina et al., 2011). Após a contagem de bactérias o suplemento foi liofilizado.

Para a liofilização o suplemento fermentado foi adicionado em placas Petri. As placas foram envolvidas em papel alumínio com algumas perfurações e permaneceram por 24 horas em freezer à temperatura de -20°C . A secagem ocorreu em liofilizador de bancada por 96 horas. Após o processo, as placas foram encaminhadas para a capela, para evitar contaminação, o suplemento foi adicionado em embalagem de plástico 100% polietileno com fecho hermético, triturado manualmente, peneirado e armazenado em embalagem metálica e fechada com máquina seladora.

Gaiolas:

As gaiolas foram de madeira, envolvidas em tela com perfurações para a circulação de ar. Na tela, um zíper foi fixado para facilitar a troca de alimento e remoção de abelhas mortas. As gaiolas foram posicionadas na estufa afastadas e em sentidos opostos para evitar contato entre abelhas de outras gaiolas. Dentro da gaiola foi fixado na parte superior, cera alveolada. Na parte inferior, os alimentadores para alimentos sólidos e líquidos. O alimentador para alimentos sólidos foi um pote de plástico transparente que não permitia o desperdício de alimento. O alimentador para alimentos líquidos foi o alimentador de passarinho com algodão para evitar que as abelhas afoquem. Foram utilizadas cinco gaiolas por tratamento, compostas inicialmente por 125 abelhas operárias recém-emergidas. Para homogeneizar a idade das abelhas as gaiolas com os diferentes tratamentos foram montadas no mesmo dia.

Coleta das abelhas operárias:

A espécie de abelha utilizada foi *Apis mellifera* africanizada, seguindo as condições ideais decrita por Williams et al. (2013). Foram coletados no mês de março de 2017, quatro favos novos de cria fechados com abelhas próximas a emergir, ou seja, pupas com olhos escuros e com cutícula. Estes foram removidos de colônias fortes e saudáveis do apiário próximo ao local de estudo. Os favos foram inseridos em gaiolas de aprisionamento com capacidade para um favo, envolvido com jornal e encaminhado para o laboratório de estudo. No laboratório, foram transferidos para estufa B.O.D com temperatura de 35°C e umidade relativa de ar de 70%. Para o controle da umidade, bandejas com água destilada e sal de cozinha foram adicionadas na estufa B.O.D. Após a emergência das abelhas, as mesmas foram transferidas manualmente para as gaiolas

de estudo e mantidas até a morte na estufa B.O.D nas mesmas condições de temperatura e umidade usadas para a emergência.

Consumo:

A cada três dias os alimentos foram removidos e substituídos por alimentos novos. Eram fornecidos a cada troca 10 mL de alimento líquido e três gramas de alimento sólido. O consumo foi calculado pela diferença do peso inicial do alimento fornecido e a sobra de alimento no dia da troca. O registro foi realizado durante os 30 primeiros dias de vida das abelhas.

Mortalidade:

A cada três dias as abelhas mortas eram removidas com pinça e registradas. A mortalidade foi calculada pelo somatório médio das mortes e expressa em porcentagem. Essas observações foram realizadas até o tratamento controle atingir 100% de mortalidade.

Longevidade:

A longevidade foi calculada a partir do somatório médio dos dias adicionais das abelhas após a morte do tratamento controle.

Análises estatísticas:

Foram utilizados quatro tratamentos com cinco repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, ANOVA, e teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o programa SAS (2012).

Resultados:

Foram observados valores significativos para as três variáveis respostas: quantidade da dieta consumida, taxa de mortalidade das abelhas e aumento da longevidade das abelhas. Houve diferença entre todos os tratamentos com relação ao consumo médio total da dieta durante os primeiros 30 dias de vida. O consumo médio maior entre as dietas proteicas foi o das abelhas alimentadas com suplemento não fermentado $17,42 \pm 1,78g$, seguido do pólen $11,16 \pm 1,85g$ e o menor consumo para o suplemento fermentado por probióticos $6,75 \pm 1,09g$ (Figura 1).

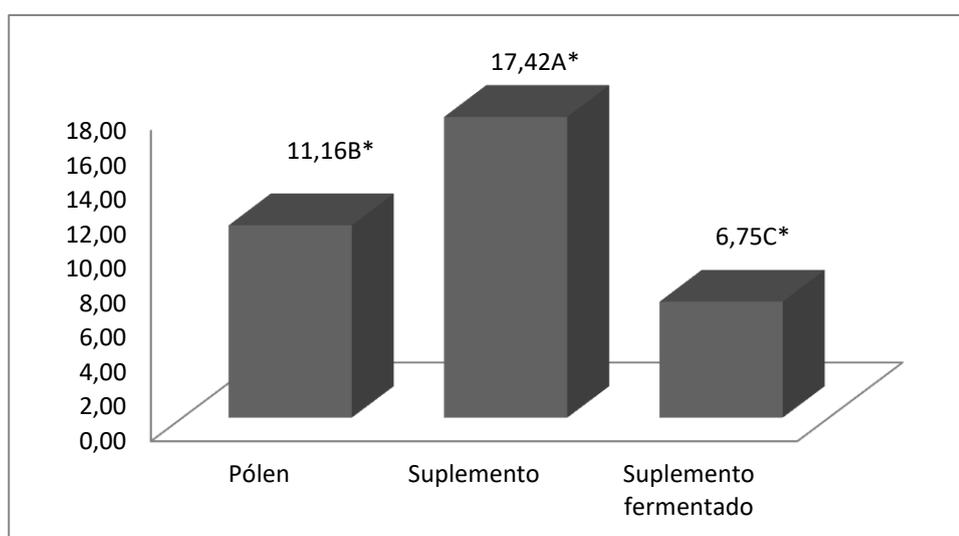


Figura 1. Médias e diferenças estatísticas (n=5) da quantidade total (g) da dieta consumida pelas abelhas até o trigésimo dia de vida. *Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

A taxa de mortalidade mais alta foi observada nas abelhas alimentadas apenas com o xarope, apresentado 100% das mortes no 36º dia de vida, contudo, foi observado que não houve diferença estatística com as abelhas alimentadas com o pólen que apresentaram 97,1% de mortes nesse mesmo período de tempo. A taxa de mortalidade mais baixa foi observada nas abelhas alimentadas com suplemento fermentado com probióticos de 92,6%, mas não diferiu estatisticamente daquelas alimentadas com suplemento não fermentado 95,4% (Figura 2).

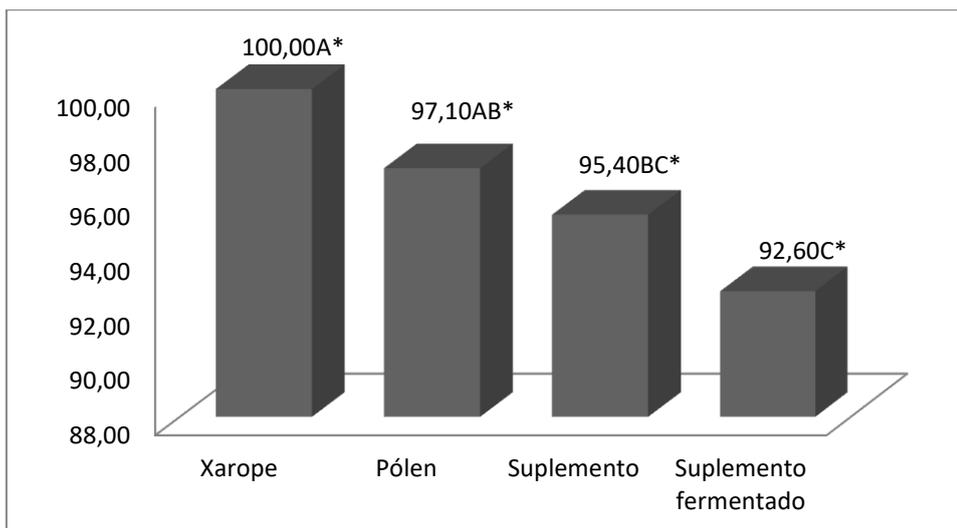


Figura 2. Médias e diferenças estatísticas (n=5) da taxa de mortalidade (%) de abelhas alimentadas com diferentes suplementos no 36º dia de vida. *Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Houve diferença entre todos os tratamentos com relação ao aumento da longevidade das abelhas. A maior longevidade foi observada nas abelhas alimentadas com suplemento fermentado $16,8 \pm 1,6$ dias, seguido das abelhas alimentadas com suplemento não fermentado $13,8 \pm 1,6$ dias, e a menor longevidade foi para as abelhas alimentadas com o pólen $9,6 \pm 1,3$ dias (Figura 3). As abelhas alimentadas com o pólen, suplemento não fermentado e suplemento fermentado viveram 48, 51 e 54 dias, respectivamente.

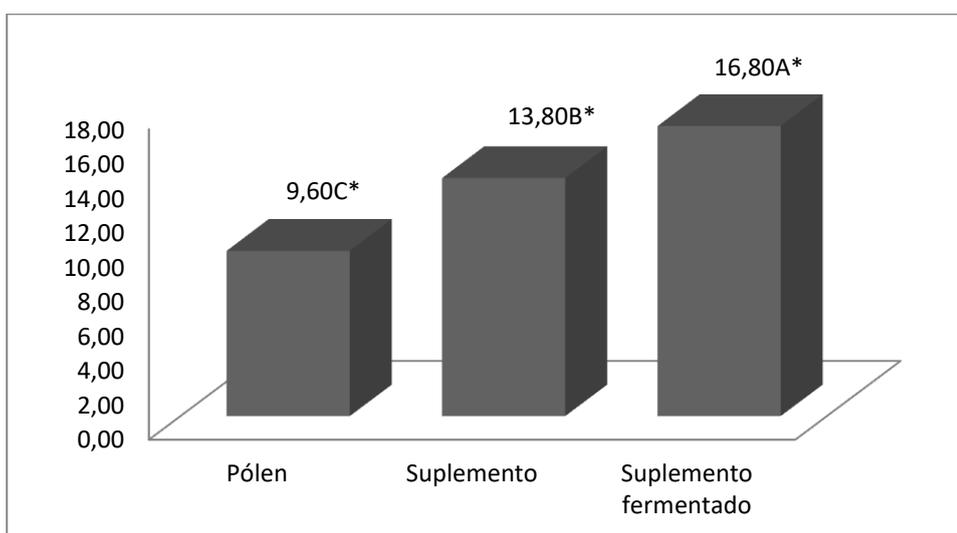


Figura 3. Médias e diferenças estatísticas (n=5) do incremento da longevidade (dias) das abelhas alimentadas com diferentes suplementos a partir do 36º dia de vida. *Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Discussão:*Consumo:*

O maior consumo, 17,42g/gaiola, foi observado em abelhas alimentadas com suplemento não fermentado. Sereia et al. (2010a), utilizando suplemento semelhante, observaram consumo de 11,12g/gaiola, afirmando que o suplemento possuía características sensoriais que estimularam a ingestão. Com a ingestão os insetos atendem os seus requisitos para os nutrientes deficientes (Pirk et al., 2010). Dependendo da composição da dieta, os nutrientes são metabolizados de maneira diferente nas abelhas (Barragán, Basualdo & Rodríguez et al., 2015). Provavelmente, as abelhas engaioladas precisaram consumir mais suplemento não fermentado para se satisfazerem nutricionalmente.

O menor consumo, 6,75g/gaiola, foi observado no suplemento fermentado por probióticos. Não houve diferença no consumo de suplementos proteicos com ou sem probióticos observados por Kaznowski et al. (2005), média de 0,009mg/abelha/dia, e Kazmierczak-Baryezko & Szymaś (2006), média de 0,010mg/abelha/dia. A ação das bactérias acidoláticas não influencia apenas na fabricação do produto fermentado, mas também no sistema digestivo do indivíduo, favorecendo a quantidade e a biodisponibilidade de alguns nutrientes (Saad et al., 2011). O baixo consumo foi atribuído ao suplemento ser fermentado, normalmente, produtos fermentados facilita a absorção dos nutrientes, atendendo com mais rapidez as necessidades nutricionais. Foi fornecido as abelhas menor quantidade com maior qualidade.

Mortalidade:

A maior taxa de mortalidade ocorreu em abelhas alimentadas com xarope. Este resultado é próximo ao observado por Alqarni (2006) em que todas as abelhas mantidas em gaiolas consumindo xarope de açúcar morreram em 33 dias. Sereia et al. (2010a) observaram 100% das mortalidades em abelhas alimentadas com pólen e/ ou xarope em 53 dias. O carboidrato é ideal para o metabolismo energético, de modo que, as abelhas permaneceram vivas por um determinado tempo inferior às abelhas que consumiram proteína, nutriente ideal para finalizar o desenvolvimento corporal no início da vida (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

A menor taxa de mortalidade das abelhas foi observada em abelhas alimentadas com suplemento proteico fermentado, 92,60% que não diferiu do suplemento proteico não fermentado, 95,40% em 36 dias de vida. A menor taxa de mortalidade das abelhas alimentadas com probióticos foram observados por Kaznowski et al. (2005) de 12,33% em

14 dias e Kazimierczak-Baryezko & Szymaś (2006) de 16,20% em 14 dias. O fato dos suplementos proteicos (com ou sem fermentação) apresentarem menores taxas de mortalidade é atribuído à padronização da quantidade de proteína fornecida e a sua esterilidade, diferente do pólen que pode diversificar na quantidade de proteína e conter patógenos e resíduos (Williams et al., 2013). O produto fermentado é facilmente absorvido e, a disponibilidade dos nutrientes é um dos principais determinantes para o crescimento e sobrevivência de qualquer indivíduo (Wang et al., 2014). O bom funcionamento do sistema imunológico da abelha é ligado a sua microbiota e, alterações dos micro-organismos, mortalidade ocasionada por antibióticos, por exemplo, aumenta a susceptibilidade a doenças que acarretam mortes nas abelhas (Li et al., 2017). A formulação de um produto completo em nutrientes, livre de patógenos, fermentado e probiótico beneficiaram as abelhas com taxas de sobrevivências maiores.

Aumento da longevidade:

Uma maior longevidade (17 dias) foi observada em abelhas alimentadas com suplemento fermentado. A fermentação ocasionada por bactérias acidoláticas pode enriquecer o produto aumentando a concentração de vitaminas do complexo B, a liberação de aminoácidos livres e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (Saad et al., 2011). Após colonizar o intestino da abelha, as distintas cepas produzem diferentes concentrações de metabólitos que contribuem para maior resistência a infecções e melhor desenvolvimento da colônia (Piano et al., 2017).

As abelhas alimentadas com suplemento proteico não fermentado também tiveram uma longevidade superior (14 dias) às que consumiram pólen (10 dias). Sereia et al. (2010a) observaram aumento da longevidade de 16 dias em abelhas alimentadas com suplemento não fermentado, atribuindo a este resultado a composição química do suplemento, rico em ácidos graxos saturados, insaturados, aminoácidos e vitaminas do complexo B.

As abelhas alimentadas com xarope, pólen, suplemento proteico e suplemento proteico fermentado por probióticos viveram em média 36, 48, 51 e 54 dias respectivamente. Abelhas de climas tropicais, em atividade, vivem em média de 30-40 dias (Nogueira-Couto & Couto, 2006). O acréscimo observado de 17 dias na vida de uma operária é importante para o progresso e o futuro da colônia pela permanência de abelhas em atividade.

Para compensar o alto custo da alimentação de colônias alimentadas com

prebiótico e/ou probiótico, Patriuca & Hutu (2013) observaram mais forrageiras coletando néctar, aumento da produção de mel e aumento no retorno lucrativo. A polinização das flores é o principal benefício obtido com o aumento do tempo de vida das abelhas (Yang et al., 2017). O acréscimo em vida das abelhas atribuído a alimentação suplementar, poderá favorecer a colônia no campo, o apicultor e o meio ambiente.

Conclusão:

A fermentação do suplemento proteico e a presença de bactérias acidoláticas contribuíram para menor consumo do alimento, diminuição da taxa de mortalidade e maior longevidade de abelhas africanizadas em sistema fechado.

Referências:

- Alqarni, A. S. (2006). Influence of some protein diets on the longevity and some physiological conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers. *Journal of Biological Sciences*, 6(4), 734-737.
- Anderson, K., E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M., Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PlosOne*, 8(12), 1-16. DOI:10.1371/journal.pone.0083125
- Barragán, S., Basualdo, M. & Rodríguez, E. M. (2015). Conversion of protein from supplements into protein of hemolymph and fat bodies in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 399-404. DOI:10.1080/00218839.2016.1158534
- Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294. DOI:10.1051/apido/2010012
- Cappelari, F. A., Turcatto, A. P., Morais, M. M., De Jong, D. (2009). Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). *Genetics and Molecular Research*, 8(4), 1245-1249. DOI:10.4238/vol8-4gmr628
- De Groot, A. P. (1953). Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Physiologia Comparata et Oecologia*, 3(1), 197-285.
- De Jong, D., Silva, E. J., Kevan, P. Atkinson, J. L. (2009). Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *Journal of Apicultural Research*, 48(1), 34-37. DOI:10.3896/IBRA.1.48.1.08
- De Lima, E. G., Camargo, S. C., Santos, P. R., Oliveira, J. W. S., Toledo, V. A. A. (2016). Regulation of pollen foraging activity in *Apis mellifera* Africanized honeybees colonies. *Agricultural Sciences*, 7(6), 335-340. DOI:10.4236/as.2016.76034
- Dimou, M., & Thrasyvoulou, A. (2009). Pollen analysis of honeybee rectum as a method to record the bee pollen flora of an área. *Apidologie*, 40(2), 124-133. DOI:10.1051/apido/2008066
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects: diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699-735. DOI:10.1111/1574-6976.12025
- Evans, J.D., & Lopez, D.L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 752-756. DOI:10.1603/0022-0493(2004)097[0752:BPIAIR]2.0.CO;2
- Fuenmayor, C. A., Quicazán, M. C., & Figueroa, J. (2011). Desarrollo de un suplemento nutricional mediante la fermentación en fase sólida de polen de abejas empleando

bactérias ácido lácticas probióticas. *Revista Alimentos Hoy*, 20(23), 18-40.

Gallina, D. A., Alves, A. T. S., Trento, F. K. H. S., Carusi, J. (2011). Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 13(4), 239-244.

Instituto Adolfo Lutz. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

Kazimierczak-Baryczko, M., & Szymaś, B. (2006). Improvement of the composition of pollen substitute for honey bee (*Apis mellifera* L.), through implementation of probiotic preparations. *Journal of Apicultural Science*, 50(1), 15-23.

Kaznowski, A., Szymaś, B., Jazdzinska, E., Kazimierczak, M., Paetz, H., Mokracka, J. (2005). The effect of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 44(1), 10-14. DOI:10.1080/00218839.2005.11101139

Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374-384. DOI:10.1038/nrmicro.2016.43.

Li, J. H., Evans, J. D., Li, W. F., Zhao, Y. Z., DeGrandi-Hoffman, G., Huang, S. K., Li, Z. G., Hamilton, M., Chen, Y. P. (2017). New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PlosOne*, 12(11), 1-18. DOI:10.1371/journal.pone.0187505

Martinson, V. G., Moy, J., & Moran, N., A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2830–2840. DOI:10.1128/AEM.07810-11

Morais, M. M., Turcatto, A. P., Pereira, R. A., Francoy, T. M., Guidugli-Lazzarini, K. R., Gonçalves, L. S., de Almeida, J. M. V., Ellis, J. D., De Jong, D. (2013a). Protein levels and colony development of Africanized and European honey bees fed natural and artificial diets. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6915-6922. DOI:10.4238/2013

Morais, M. M., Turcatto, A. P., Francoy, T. M., Gonçalves, L. S., Cappelari, F. A., De Jong, D. (2013b). Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of haemolymph proteins. *Journal of Apicultural Research*, 52(3), 119-121. DOI:10.3896/IBRA.1.52.3.01

Moran, N. A. (2015). Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 10(1), 22-28. DOI:10.1016/j.cois.2015.04.003.

Naug, D. (2009). Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, 142(10), 2369–2372. DOI:10.1016/j.biocon.2009.04.007

Nogueira-Couto, R. H., & Couto, L. A. (2006). *Apicultura: manejo e produtos*. Jaboticabal: Funep.

- Pătruică, S., & Hutu, I. (2012). The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal micro-flora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bulletin of Entomological Research*, 102 (1), 619–623. DOI:10.1017/S0007485312000144
- Pătruică, S., Dumitrescu, G., Stancu, A., Bura, M., Dunea, I. B. (2012). The effect of prebiotic and probiotic feed supplementation on the wax glands of worker bees (*Apis mellifera*). *Animal Sciences and Biotechnologies*, 45(2), 268-271.
- Pătruică, S., & Mot, D. (2013). Economic benefits of using prebiotic and probiotic products as supplements in stimulation feeds administered to bee colonies. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1), 259-263. DOI:10.3906/vet-1110-20
- Pereira, F. M., Freitas, B. M., Neto, J. M. V., Lopes, M. T. R., Barbosa, A. L., Camargo, R. C. R. (2006). Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos proteicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(1), 1-7. DOI:10.1590/S0100-204X2006000100001
- Piano, F. G., Maggi, M., Pellegrini, M. C., Cugnata, N. M., Szawarski, N., Buffa, F., Negri, P., Fuselli, S. R., Audisio, C. M., Ruffinengo, S. R. (2017). Effects of *Lactobacillus johnsonii* aj5 metabolites on nutrition, *Nosema ceranae* development and performance of *Apis mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*, 61(1), 93-104. DOI: 10.1515/JAS-2017-0007
- Pirk, C. W. W., Boodhoo, C., Human, H., Nicolson, S. W. (2010). The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Apidologie*, 41(1), 62–72. 0.1051/apido/2009055
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., Moran, N.A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of *Apis mellifera*. *Applied Environmental Microbiology*, 80(23), 7378-7387. DOI:10.1128/AEM.01861-14
- Saad, S. M. I., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2011). *Probióticos e prebióticos em alimentos*. São Paulo: Varela.
- SAS Institute. (2012). *Statistical Analysis System: user's guide*. Version 9.3. Cary, NC.
- Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M., Castro, S. E. S., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Furlan, A. C. (2010a). Lifespan of Africanized honey bees fed with various proteic supplements. *Journal of Apicultural Science*, 54(2), 37-49.
- Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Sekine, E. S., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M. (2010b). Viabilidade financeira da produção de geleia real com abelhas africanizadas suplementadas com diferentes nutrientes. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, 32(4), 467-474. DOI:10.4025/actascianimsci.v32i4.7895
- Sereia, M. J., Toledo, V. A. A., Furlan, A. C., Faquinello, P., Costa-Maia, F. M., Wielewski, P. (2013). Alternative sources of supplements for Africanized honeybees submitted to royal jelly production. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 35(2), 165-171.

DOI:/10.4025/actascianimsci.v35i2.16976

Siqueira, R. S. (1995). *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: EMBRAPA.

Szymaś, B., Łangowska, A., & Kazimierczak-Baryczko, M. (2012). Histological structure of the midgut of honey bees (*Apis mellifera* L.) fed pollen substitutes fortified with probiotics. *Journal of Apicultural Science*, 56(1), 5-12. DOI:10.2478/v10289-012-0001-2

Tomás, A., Falcão, S. I., Russo-Almeida, P., Vilas-Boas, M. (2017). Potentialities of beebread as a food supplement and source of nutraceuticals: botanical origin, nutritional composition and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 219–230. DOI:10.1080/00218839.2017.1294526

Wang, H., Shang, S., Zeng, Z., Yan, W. (2014). Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*, 45(5), 618–625. DOI:10.1007/s13592-014-0276-3

Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D. P., Medrzycki, P., Murray, T. E., Natsopoulou, M. E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R. J., Pernal, S. F., Shutler, D., Tanner, G., van der Steen, J. J. M., & Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-36. DOI:10.3896/IBRA.1.52.1.04

Yang, W., Tian, Y., Hanand, M., Miao, X. (2017). Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. *PeerJ*, 5(1), 1-15. DOI:10.7717/peerj.3118

Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18), 4775–4780. DOI:10.1073/pnas.1701819114