

MARA LÚCIA DE AZEVEDO SANTOS

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO PÓLEN E DA  
INFLORESCÊNCIA DE *Stryphnodendron polyphyllum*, EM RELAÇÃO À CRIA-  
ENSACADA BRASILEIRA EM *Apis mellifera*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2000

MARA LÚCIA DE AZEVEDO SANTOS

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO PÓLEN E DA  
INFLORESCÊNCIA DE *Stryphnodendron polyphyllum*, EM RELAÇÃO À CRIA-  
ENSACADA BRASILEIRA EM *Apis mellifera*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 18 de agosto de 1999.

---

Prof. Luiz Cláudio de A. Barbosa  
(Conselheiro)

---

Prof. Lúcio A. de O. Campos  
(Conselheiro)

---

Prof. Antônio Jacinto Demuner

---

Prof. Raul Narciso C. Guedes

---

Prof. Dejour Message  
(Orientador)

À minha família.

Ao Professor Antenor Bissoqui.

A Deus, força presente em todos os momentos.

## AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Curso de Entomologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dejair Message, pela orientação, pela dedicação, pelos expressivos ensinamentos e pela amizade .

Ao Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, por ter-me aceito em seu laboratório, pelo apoio e pelas valiosas contribuições a este trabalho.

Ao Prof. Lúcio Antonio de Oliveira Campos, pelas críticas construtivas e pelas sugestões.

Ao Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes, pelo auxílio durante a produção desta tese e pelas conversas, que influenciarão, positivamente, o meu futuro.

Ao Prof. Antônio Jacinto Demuner, pelas informações, pelo incentivo e pelo apoio.

À amiga Angelina Eliza Toassa, pela amizade, pelo apoio e pelo carinho nos momentos de elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Fernando Reis, pela atenção e pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigos Wagner Vieira, Cecília, Eva, Mayra, Isabel Christina, Andréa, Maria, Eva Toassa e José Miranda, pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas do Curso, em especial a Eduardo Antunes, Isaís e Lídia, pelo convívio e pela amizade.

À secretária do Curso de Entomologia Paula, pela competência, pela amizade e pela ajuda sempre indispensável.

Aos professores do Curso, que contribuíram para a minha formação profissional.

Aos funcionários do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) Adilson, Lourdinha, Barcelos, Larissa e Patricia e aos técnicos Antônio e Ricardo, pela convivência agradável e pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Espectroscopia de Infravermelho Sr. Márcio José Gomes Alvarenga, pela atenção e pela ajuda na obtenção dos espectros no infravermelho.

Aos meus avôs, tios e primos, que, mesmo longe, torciam, positivamente, para a realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram, de forma positiva, para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Mara Lúcia de Azevedo Santos, filha de Celso dos Santos e Jandira de Azevedo Santos, nasceu em Araçatuba, Estado de São Paulo, em 4 de outubro de 1967.

Em fevereiro de 1996, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, PR.

No período de julho de 1996 a julho de 1997, foi bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) de Londrina, PR, e, em agosto desse mesmo ano, iniciou o Curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese no dia 18 de agosto de 1999.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Principais doenças de crias de <i>Apis mellifera</i> .....	1
1.2 Barbatimão ( <i>Stryphnodendron</i> sp.) .....	3
1.2.1. Características gerais do gênero .....	3
1.2.2. Taninos .....	4
1.2.3. Importância econômica do gênero .....	9
1.2.4. Efeitos tóxicos .....	10
1.3. Objetivos .....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
2.1. Procedimentos experimentais gerais .....	12
2.2. Metodologia de criação de larvas de <i>Apis mellifera</i> em laboratório para teste de patogênese .....	13
2.3. Coleta de pólen e inflorescência de <i>Stryphnodendron</i> <i>polyphyllum</i> .....	14
2.4. Isolamento dos constituintes do pólen e da inflorescência e ensaios biológicos .....	14

	Página
2.4.1. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico .....	14
2.4.2. Análise fitoquímica para determinação de taninos .....	16
2.4.3. Isolamento dos constituintes do pólen de <i>S. polyphyllum</i> .....	18
2.4.4. Análise de açúcares, realizada por cromatografia de camada delgada na fração PE(3) 1-126 .....	18
2.4.5. Ensaio biológico .....	20
2.4.6. Análise estatística .....	21
2.5. Efeito do ácido tânico no desenvolvimento de crias de <i>Apis mellifera</i> (africanizadas) .....	21
2.5.1. Análise estatística .....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
3.1. Caracterização dos extratos hexânico e etanólico do pólen e da inflorescência de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> .....	23
3.2. Análise dos ensaios biológicos com extratos hexânicos e etanólicos do pólen e da inflorescência de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> .....	26
3.3. Determinação do teor de taninos nos extratos etanólicos do pólen e da inflorescência .....	30
3.4. Isolamento dos constituintes químicos do pólen de <i>S. polyphyllum</i> e resultados de ensaios biológicos .....	32
3.5. Ensaio biológico para avaliar a toxidez de ácido tânico .....	41
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
APÊNDICE .....	57

## EXTRATO

SANTOS, Mara Lúcia de Azevedo, M. S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2000. **Análise dos constituintes químicos do pólen e da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*, em relação à cria-ensacada brasileira em *Apis mellifera*.** Orientador: Dejair Message. Conselheiros: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

O objetivo deste trabalho foi analisar os constituintes químicos do pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão), causador da doença cria-ensacada brasileira (CEB) em *Apis mellifera*. Para isso, coletaram-se pólen e inflorescência de barbatimão para serem submetidos a extrações sucessivas com hexano e, posteriormente, com etanol. Com os extratos hexânico e etanólico do pólen e da inflorescência obtidos, foram realizados ensaios biológicos, nos quais se verificaram pré-pupas com sintomas da doença nos tratamentos em que as larvas eram alimentadas com dieta de operária mais extrato etanólico. Observou-se a presença de taninos nos extratos etanólicos, tendo sido determinado nestes 7,91 e 21,43% de taninos no pólen e na inflorescência, respectivamente. Com o fracionamento do extrato etanólico do pólen, isolaram-se ainda ácidos graxos e frutose, que foram submetidos a ensaios biológicos. Essas frações não determinaram o aparecimento de sintoma da CEB nas abelhas tratadas. Como várias

espécies de barbatimão são conhecidas por possuírem altas concentrações de tanino, realizaram-se ensaios biológicos com concentrações diferentes de ácido tânico para verificar o seu efeito no desenvolvimento das crias de abelhas. Observou-se a presença de sintomas da doença e de alta mortalidade das crias tratadas a partir da terceira alimentação com dieta contendo diferentes concentrações de ácido tânico, tendo sido estimada uma  $CL_{50}$  de 0,012% no referido composto. Diante desses resultados, concluiu-se que o constituinte químico responsável pelos sintomas da cria-ensacada brasileira está presente na fração etanólica do pólen, podendo pertencer ao grupo dos taninos. Os resultados dos ensaios biológicos obtidos com a inflorescência foram semelhantes àqueles conseguidos com o pólen.

## ABSTRACT

SANTOS, Mara Lúcia de Azevedo, M. S., Universidade Federal de Viçosa, January 2000. **Analysis of chemical components of pollen and inflorescence of *Stryphnodendron polyphyllum*, with relation to Brazilian encapsulated-larvae disease in *Apis mellifera*.** Adviser: Dejair Message. Committee Members: Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

The objective of this study was to analyze quimical components of *Stryphnodendron polyphyllum* pollen, which cause the Brazilian encapsulated-larvae disease (CEB) in *Apis mellifera*. Pollen and inflorescence of *Stryphnodendron polyphyllum* were collected and gone through successive extraction with hexane and later with ethanol. Biological assays were carried out with the hexane and ethanol extracts obtained from pollen and inflorescence. In those assays it was verified the presence of pre-pupae showing the symptoms of the disease in the treatments where the larvae were fed with the working bees diet supplemented with ethanol extract. It was detected the presence of tannins in ethanol extracts, which was found to be 7,91 and 21,43% of tannins for pollen and inflorescence, respectively. Fructose and fatty acids were isolated from pollen ethanol extract fractionation and were gone through biological assays; in these fractions no symptom of CEB was detected in the treated bees. Since several

*Stryphnodendron* species are known as containing high tannin concentrations, biological assays using different concentrations of tannic acid were carried out to verify its effect on bee young development. It was observed the presence of CEB symptoms and a high mortality of the young which were treated, from the third feed onwards, with diet containing different concentrations of tannic acid, whose  $CL_{50}$  was estimated at 0,012%. Based on these results, it was concluded that the chemical component which is responsible for the CEB symptoms is present in the ethanol fraction of pollen and it may belong to the tannin group. The results obtained from the inflorescence biological assays were similar to those from pollen.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Principais doenças de crias de *Apis mellifera*

Com o crescimento da atividade apícola, tem-se observado aumento de casos de doenças que causam o decréscimo da produtividade (MESSAGE, 1992). Esse decréscimo é consequência da morte de crias na colméia, o que acaba por diminuir o número de abelhas campeiras (FREE, 1980; MESSAGE, 1992).

Em *Apis mellifera* existem quatro doenças de crias que podem afetar o desenvolvimento dentro da colméia, levando, algumas vezes, ao extermínio desta e trazendo sérios prejuízos à apicultura. São elas a cria-pútrida americana, a cria-pútrida européia, a cria-giz e a cria-ensacada.

A cria-ensacada ocorre em várias partes do mundo, sendo o vírus SBV, detectado em *A. mellifera* (BAILEY et al., 1964); e o vírus TSBV, isolado em *A. cerana*, na Tailândia (BAILEY, 1982), os agentes etiológicos. As larvas são contaminadas nos primeiros dias de vida, porém sua morte só ocorre no final do período larval, isto é, próximo à pupação (BAILEY, 1968). Nas larvas afetadas, observou-se mudança de cor, principalmente, na região cefálica. Depois de mortas, elas podem apresentar coloração marrom-escura; adquirem a forma bastante semelhante à de um saquinho quando removidas das células com uma pinça, donde lhe advém a típica denominação, isto é, se não forem removidas pelas operárias,

secam lentamente, permanecendo nas células como escamas, no formato de gôndola (SHIMANUKI e KNOX, 1991). No Brasil, uma doença com os mesmos sintomas da cria-ensacada tem sido registrada em muitas regiões do País, principalmente na Região Sudeste.

Com o objetivo de verificar se essa doença era a cria-ensacada, foram realizados experimentos na tentativa de reproduzir a doença, colocando-se quadros de cria de colônias doentes em colônias sadias (MESSAGE, 1997). Contudo, não se registrou nenhum sintoma nas colônias sadias. Amostras de crias afetadas de várias partes do Brasil foram analisadas na Inglaterra, entretanto nenhum vírus, ou outro agente microbiano, foi detectado (MESSAGE et al., 1995 e 1996; MESSAGE, 1997).

Testes de laboratório com a inoculação de extratos de crias doentes do Brasil e extratos de crias doentes contendo o vírus SBV originado da Inglaterra foram conduzidos, colocando-se esses extratos na dieta de larvas criadas em laboratório. As larvas alimentadas com extratos de abelhas doentes do Brasil não apresentaram sintomas e empuparam normalmente, porém as larvas alimentadas com extrato de crias doentes contendo SBV tiveram sintoma da doença (CARVALHO e MESSAGE, 1997). Como nenhum vírus foi detectado nas abelhas brasileiras que apresentavam os sintomas da doença, esta foi denominada de “cria-ensacada brasileira” (Figura 1) (MESSAGE et al., 1995; MESSAGE, 1997).

Em virtude de muitos apicultores das regiões onde ocorre a doença associarem seu aparecimento a certos tipos de florada e nenhum vírus, ou agente microbiano, ter sido detectado, CARVALHO (1998) estudou a relação do aparecimento da cria-ensacada brasileira com a presença, no alimento, de pólen produzido por algumas das plantas floridas na região de Altinópolis, SP, durante o período epidêmico. Após sucessivas análises, o referido autor concluiu que o pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* seria o causador dessa doença naquela região.



Figura 1 – Pré-pupa com sintoma da cria-ensacada brasileira.

## **1.2. Barbatimão (*Stryphnodendron* sp.)**

### **1.2.1. Características gerais do gênero**

O gênero *Stryphnodendron* pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae; compreende esta subfamília cerca de 40 gêneros. Apresenta plantas subarbustivas, arbustivas ou arbóreas, com folhas duplamente pinadas. A inflorescência característica do gênero é a espiga, com disposições variadas. As flores são sempre pequenas, na maioria das vezes hermafroditas, raramente unissexuadas masculinas e dispostas em espigas separadas (OCCHIONI MARTINS, 1981).

O nome *Stryphnodendron* provém do grego *Strypnós* (στρυφο΄ζ) e *dendron* (δενδρον), que significa, respectivamente, duro e árvore (ARRUDA, 1950; PANIZZA et al., 1988), uma referência à dureza do lenho das espécies de

barbatimão, todas fornecedoras de madeira útil para marcenaria e construção civil. Ibatimô, nome guarani dado pelos índios, significa planta que aperta, que “amarra na boca”, pois seus frutos e a casca provocam na mucosa da boca a mesma sensação provocada por banana verde (POTT e POTT, 1994).

O gênero *Stryphnodendron* é muito comum em nossos cerrados, ocupando uma área de dispersão limitada ao continente sul-americano, caracterizando-o como táxon neotrópico; a Amazônia é o seu centro de dispersão, podendo ser encontradas desde espécies anãs até grandes árvores com mais de 30 metros de altura, como ocorre na região amazônica (OCCHIONI MARTINS, 1980 e 1981). Esse gênero compreende 25 espécies, incluindo uma subespécie e duas variedades. Nas Amazônias brasileira e extrabrasileira, são encontradas 12 espécies das 25 do gênero; cinco espécies ocorrendo no cerrado de Goiás e Minas Gerais; quatro espécies são encontradas nos campos e cerrados do Brasil-Central e cerrados de Minas Gerais e São Paulo; e, na caatinga do Nordeste brasileiro, encontram-se outras duas espécies: uma espécie nas matas secas de Pernambuco e outra na Serra da Mantiqueira, no Rio de Janeiro (OCCHIONI MARTINS, 1980).

A espécie *S. polyphyllum* Mart. (Figura 2) é uma árvore regular, que pode atingir sete metros de altura; as inflorescências (Figura 3) apresentam flores pinadas e de cor purpúrea, com 15 a 20 jugos, folíolos oblíquos e fruto tipo vagem com 10-12 cm de comprimento (CORRÊA, 1926). A casca desta espécie, bastante rica em tanino, parece ser a verdadeira casca de barbatimão da farmacopéia estrangeira. Apresenta as variedades *polyphyllum* e *villosum*, de folhas maiores e flores brancas (CORRÊA, 1926; OCCHIONI MARTINS, 1981).

### **1.2.2. Taninos**

Os taninos são compostos orgânicos adstringentes solúveis em água e encontrados em mais de 50% das espécies de plantas (BATE-SMITH e METCALFE, 1957); são produtos de secreção que se encontram em maior ou menor quantidade em quase todos os tecidos vegetais, porém sem se constituírem



Figura 2 – Vista de *Stryphnodendron polyphyllum* na região de Altinópolis, SP.



Figura 3 – Inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*.

em elementos essenciais da madeira, sendo extraídos, principalmente, das cascas (MORI, 1997). Frequentemente, os taninos encontrados na casca diferem dos

encontrados em folhagens e frutos. Dependendo do local de crescimento da árvore, da espécie e da maturidade da planta, suas propriedades podem variar muito (MORI, 1997; POZO, 1997; SHIMADA, 1998).

Nas células vegetais, os taninos estão localizados separadamente das proteínas e enzimas do citoplasma e dissolvidos dentro de vacúolos. Quando herbívoros se alimentam, os tecidos são danificados e os taninos reagem com as proteínas, tornando-as menos acessíveis para o suco digestivo dos animais (CASTRO, 1998).

Segundo GRIFFITHS (1991), o termo “tanino” foi usado pela primeira vez por Seguin, em 1796, que o definia como princípio adstringente da casca do carvalho, e essa substância apresentava propriedade para curtir a pele de animais, que, segundo TEIXEIRA et al. (1990), ocorria devido às propriedades de se combinarem com a proteína da pele, tornando-a estável e impedindo sua decomposição biológica. O modo de ação desses compostos envolve a precipitação das proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos descobertos, formando revestimentos protetores (CASTRO, 1998). Segundo esse mesmo autor, a sensação de secura que deixa na boca advém da precipitação das proteínas do epitélio bucal e das glicoproteínas da saliva. Tal ação se deve à reação de grupos fenólicos com grupos amins das proteínas.

O tanino vegetal é um composto solúvel em água com massa molecular entre 500 e 3.000 D. Esses polifenólicos contêm grande número de hidroxilas ou outro grupo funcional e, conseqüentemente, são capazes de formar ligações com proteínas e outras moléculas (ZUCKER, 1983). Os taninos também podem-se agregar com alcalóides e proteínas, precipitando-os.

Em países como Austrália e África do Sul, os taninos são usados como adesivos (PIZZI, 1983); no Brasil, têm sido utilizados também para este fim, como os taninos da acácia-negra e os taninos da casca de *Eucalyptus grandis* (MORI, 1997). Várias espécies florestais são produtoras de tanino no Brasil, sendo comercialmente explorados o angico e o barbatimão (TEIXEIRA et al., 1990). Dentre as espécies de interesse econômico que ocorrem nos cerrados, encontra-se o barbatimão (BARRADAS e HANDRO, 1974), que, segundo MORS e RIZZINI (1966), é provavelmente o maior produtor de tanino da flora brasileira.

Os taninos são classificados em duas categorias: hidrolisáveis e condensados (não-hidrolisáveis) (SWAIN, 1979; Freudenberg, citado por CHUNG et al., 1998). A mesma planta possui, simultaneamente, taninos hidrolisáveis e condensados, mas com o predomínio de um deles, pelo menos em determinadas partes (POZO, 1997). Os taninos condensados são estruturas muito mais complexas do que os taninos hidrolisáveis, que são polifenóis com peso molecular variado, formados de unidades de flavonóides, os quais têm vários graus de condensação e estão associados com seus precursores e outros flavonóides análogos ligados por carbonos interflavonóides, que não são suscetíveis à hidrólise (HASLAM, 1966; ZUCKER, 1983; D'MELLO et al., 1991; CHUNG et al., 1998).

Os taninos condensados são, principalmente, produtos polimerizados de flavan-3-ols (catequina) e flavan-3,4-diols (leucoantocianidina) ou da mistura desses dois. Esses flavonóides são os mais estudados devido à sua importância comercial e à sua relativa simplicidade (CHUNG et al., 1998).

Os taninos condensados são distribuídos amplamente, podendo ser encontrados nos tecidos de plantas lenhosas, como árvores produtoras de pêssego e maçãs e certos cereais, embora em quantidades variáveis. Contudo, esses taninos são ausentes em plantas herbáceas (POZO, 1997; CHUNG et al., 1998).

Os taninos hidrolisáveis são misturas de compostos simples, como ácido gálico, pirogalol ou ácido elágico na forma de ésteres de açúcares, principalmente glicose (CHUNG et al., 1998; ZUCKER, 1983).

Os taninos hidrolisáveis são divididos em dois tipos: os galotaninos e os elagitaninos. Ambos os tipos possuem carboidratos, tipicamente glicose, porém, com ácido gálico, são definidos freqüentemente como galotaninos e, quando contêm, além de ácido gálico, um ácido elágico, são chamados de elagitaninos (ZUCKER, 1983). Um dos importantes exemplos de galotaninos é o ácido tânico (Chinese tannin) (Figura 4), que contém uma glicose esterificada e oito moléculas de ácido gálico (D'MELLO et al., 1991).

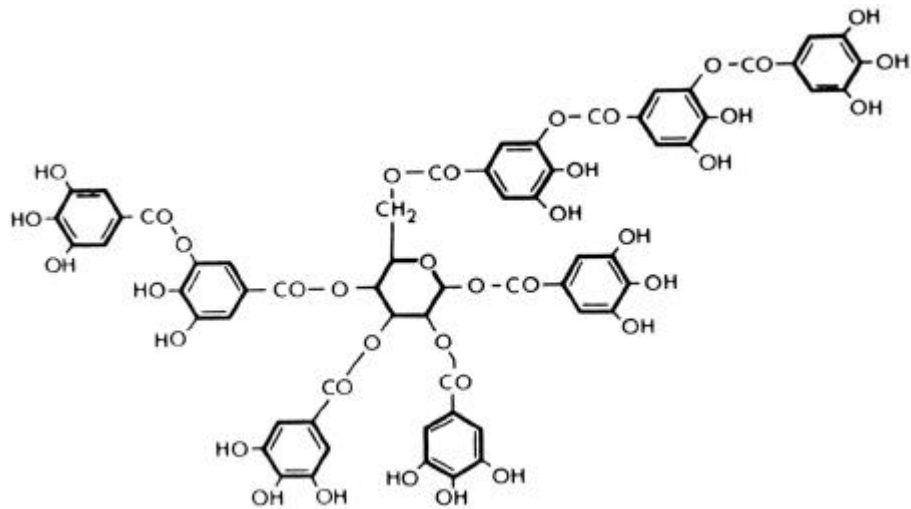


Figura 4 – Estrutura química do ácido tânico (D’MELLO et al., 1991).

### 1.2.3. Importância econômica do gênero

A madeira de *Stryphnodendron* sp. é própria para construção civil, para obras expostas e em lugares úmidos - em virtude da dureza e resistência de sua casca e de seu lenho - e também para trabalho de torno e marcenaria. Este gênero também possui importância econômica em razão da existência de espécies de interesses farmacêutico e industrial e por ser fonte de tanino (RIZZINI e MORS, 1976; GEMTCHUJNICOV, 1976).

Os taninos são usados na indústria, principalmente para o curtimento de peles e a obtenção de tintas (RESENDE, 1971). Além da importância dos taninos na indústria de curtume, verifica-se seu uso na indústria petrolífera, mais propriamente no trabalho de sondagem; na indústria de plástico ou resina; como mordentes para tintas ou corantes; preservativos; e na clarificação de vinhos. O ácido gálico extraído do tanino é utilizado nas artes gráficas, na revelação de fotografias e para fins medicinais.

Na medicina popular, em função de suas propriedades adstringentes, este gênero é usado no tratamento de doenças como: amigdalite, faringite, hemorróidas, leucorréias, erupções cutâneas, diarreias e como agentes antiinflamatórios

(PALAZZO-DE-MELLO et al., 1993 e 1996; LIMA et al., 1998). PANIZZA et al. (1988), testando a ação cicatrizante da casca de *S. barbatiman* em camundongos, verificaram resposta positiva, ou seja, nos exames histológicos dos fragmentos da pele de camundongo, observou-se cicatrização rápida, e os fenômenos inflamatórios foram mais discretos quando tratados com 1% da casca de *S. barbatiman*. Na Amazônia, o *S. microstachyum* é utilizado no tratamento de hanseníase (OCCHIONI MARTINS, 1980). Além dos interesses farmacêutico e industrial, os taninos apresentam importância toxicológica.

#### **1.2.4. Efeitos tóxicos**

O gênero *Stryphnodendron* apresenta espécies que são tóxicas a animais. A espécie *S. obovatum* causa grande mortalidade a gado que se alimenta de suas favas; tal efeito é atribuído às saponinas presentes em grandes quantidades no fruto desta planta, causando lesões hepáticas letais nos animais (RIZZINI e MORS, 1976). GUERRA et al. (1982) obtiveram diminuição do peso de hipófise e vesícula seminal de ratos tratados com sementes de *S. polyphyllum*, concluindo que essas sementes possuem efeito embriotóxico bastante marcante, manifestando desde o início da implantação até o período embrionário. TOKARNIA et al. (1991) estudaram o efeito da toxidez de favas de *S. coriaceum* em bovinos. As favas de *S. adstringens* são consideradas tóxicas para gado, causando-lhe fotossensibilização (LORENZI, 1992). O extrato aquoso de embrião-cotilédone de *S. obovatum* Benth, utilizado na dieta de *Drosophila melanogaster*, pode causar efeito inibitório no seu ciclo de vida, causando também diminuição progressiva do número total de ímagos produzidos com o aumento da concentração desse extrato na dieta (RODRIGUES, 1982).

Muitos estudos foram realizados com ácido tânico em relação ao seu efeito em animais. Segundo Suschetet, citado por CHUNG et al. (1998), ao incluir ácido tânico na dieta de ratos, observou-se diminuição dos níveis de vitamina A no fígado. MERCER (1993), ao estudar o efeito da concentração do ácido tânico no desenvolvimento de *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae), concluiu que o aumento

da concentração de ácido tânico reduz a velocidade do desenvolvimento larval, reduzindo também o número de adultos produzidos.

BOURCHIER e NEALIS (1993) relataram desenvolvimento rápido do 1<sup>o</sup> ao 3<sup>o</sup> ínstar e, a partir deste, desenvolvimento lento de mariposas da família Lymantriidae, após a utilização de ácido tânico na dieta. BARBEHENN e MARTIN (1994), incluindo ácido tânico na dieta da larva *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae), verificaram a presença de pupas malformadas.

### **1.3. Objetivos**

Pelo fato de a cria-ensacada brasileira ser causada pelo pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* e esta espécie vegetal apresentar toxidez a vários outros animais e por conter grandes quantidades de taninos, pretenderam-se neste trabalho:

- a) Fracionar os constituintes químicos do pólen e da inflorescência de *S. polyphyllum* e estudar sua ação tóxica nas larvas de abelhas.
- b) Identificar a substância tóxica do pólen de *S. polyphyllum*, causadora da cria-ensacada brasileira.
- c) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido tânico sobre o desenvolvimento de crias de *A. mellifera*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Procedimentos experimentais gerais

Para as separações cromatográficas em coluna, foi utilizado sílica-gel 60 (de 70 a 230 Mesh-ASTM, Merck). Para as análises cromatográficas de camada delgada, utilizaram-se placas de sílica-gel de Camlab-Polygram SILK/UV<sub>254</sub>, com 0,25 mm de espessura e indicador de fluorescência UV<sub>254</sub>.

Os solventes utilizados nas colunas cromatográficas de sílica-gel para o fracionamento do extrato etanólico do pólen foram: metanol (MeOH), acetato de etila (AE), éter dietílico (EtOH) e hexano (Hex).

Como reveladores, foram utilizadas radiações ultravioleta e soluções de ácidos fosfomolibdico e p-anisaldeído, preparadas de acordo com CASEY et al. (1990). Os espectros de infravermelho foram registrados, em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 1000, na região de 4.000 a 600 cm<sup>-1</sup>. Os procedimentos de extração, isolamento e identificação dos constituintes químicos foram realizados no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV e os ensaios biológicos, no Laboratório de Patologia Apícola da UFV, com larvas de *A. mellifera* (africanizadas).

## 2.2. Metodologia de criação de larvas de *Apis mellifera* em laboratório para teste de patogênese

A metodologia para criação de larvas de *A. mellifera* em laboratório foi baseada em VANDENBERG e SHIMANUKI (1987), com adaptações feitas por SILVA (1995) e, posteriormente, por CARVALHO (1998), para testar o efeito tóxico do pólen de barbatimão.

A dieta básica de operária fornecida às larvas no primeiro e segundo dias de criação no laboratório era constituída de

Extrato de levedo .....	0,2307 g
D-glucose .....	1,3846 g
D-frutose .....	1,3846 g
Água .....	7,4 mL
Geléia real .....	10,0 g

A geleia real foi produzida com a utilização de mini-recrias do Apiário Central da UFV, conforme descrito por SANTOS e MESSAGE (1984), sendo, posteriormente, armazenada em frascos estéreis e conservada em “freezer” até o momento de sua utilização. As larvas de um dia de operárias de *A. mellifera* (africanizadas), obtidas no Apiário Central da UFV, foram transferidas com o auxílio de estilete, com ponta dobrada em ângulo reto, para cúpulas de polietileno (9,8 mm de altura x 5,6 mm de largura inferior x 8,8 mm de largura superior), colocadas sobre uma gota contendo 4 µl da dieta. Essas cúpulas artificiais foram previamente montadas em placas de Petri, utilizando-se um disco de isopor perfurado. Em cada placa foram colocadas 12 cúpulas.

Durante o desenvolvimento, as placas contendo as larvas foram acondicionadas em frasco dessecador e mantidas em estufa incubadora com temperatura de 34°C e umidade relativa do ar mantida em 96%, conseguida por meio de uma solução aquosa de glicerol 15,5% colocada no fundo do frasco dessecador. Após o período de alimentação, as larvas foram mantidas nas mesmas condições e nas próprias cúpulas até a emergência dos adultos, com a finalidade de reduzir a manipulação (CARVALHO, 1998).

As larvas foram alimentadas até o quinto dia, recebendo: 4 µl, 15 µl, 25 µl, 50 µl e 70 µl da dieta de operária no primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto dias, respectivamente, com a ressalva de que nos três últimos dias eram acrescentados a essa dieta os tratamentos específicos.

### **2.3. Coleta de pólen e inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum***

Com o propósito de estudar a presença de constituintes químicos no pólen de *S. polyphyllum*, foram colocados coletores de pólen em um apiário experimental na região de Altinópolis, SP. Os grãos de pólen coletados foram armazenados em “freezer” e levados ao Laboratório de Patologia Apícola da UFV para serem separados morfológicamente, com o auxílio de microscopia óptica. Após as bolotas serem separadas, realizaram-se ensaios biológicos preliminares, de acordo com a técnica descrita anteriormente, para constatar sua toxidez.

Foram coletadas, também naquela região, inflorescências de *S. polyphyllum*, retirando-se somente as flores, as quais eram colocadas em recipientes livres de contaminação e armazenadas em “freezer”.

### **2.4. Isolamento dos constituintes químicos do pólen e da inflorescência e ensaios biológicos**

#### **2.4.1. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico**

Após serem feitas as análises preliminares do pólen de *S. polyphyllum* para comprovar sua toxidez, ele e a inflorescência foram submetidos a extrações sucessivas em aparelho Soxhlet com solvente hexano e, depois, com solvente etanol.

Os extratos obtidos a partir de 22,00 g de pólen foram concentrados, por meio da remoção de solventes a pressão reduzida em evaporador rotatório, resultando na obtenção de 5,71 g de extrato hexânico e 14,99 g de extrato etanólico do pólen (Figura 5). Da mesma forma foram obtidos 36,33 g de

inflorescência, 3,23 g de extrato hexânico e 9,87 g de extrato etanólico (Figura 6). Esses extratos foram armazenados em geladeira até o momento da realização dos ensaios biológicos e do espectro no infravermelho (IV).

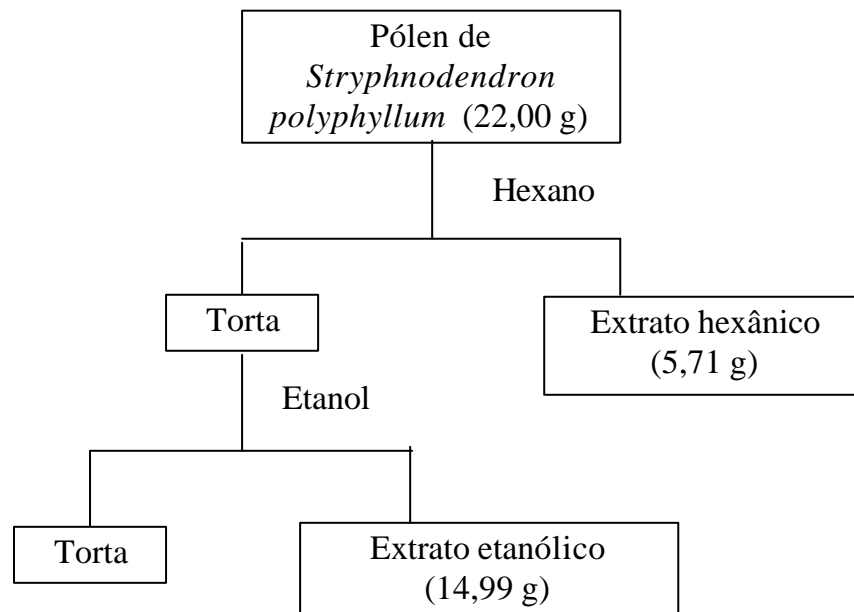


Figura 5 – Fluxograma de obtenção dos extratos hexânico e etanólico do pólen de *Stryphnodendron polyphyllum*.

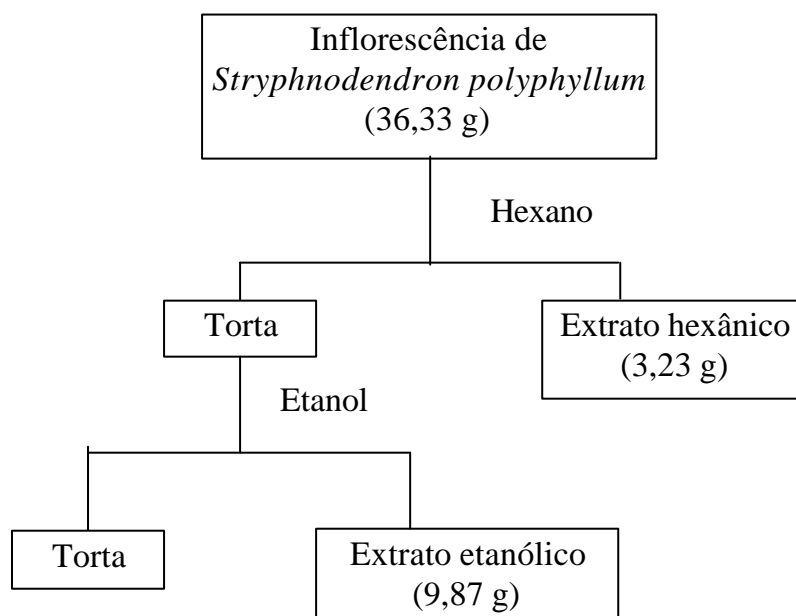


Figura 6 – Fluxograma de obtenção dos extratos hexânico e etanólico da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*.

#### 2.4.2. Análise fitoquímica para determinação de taninos

O extrato etanólico do pólen e da inflorescência de *S. polyphyllum* foi submetido a uma análise fitoquímica, para determinação de rendimento de taninos no pólen e na inflorescência. O método adotado para determinação de tanino foi o preconizado pela ASSOCIATION... – AOAC (1984), com algumas modificações. Esse método se fundamentou na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelos taninos em meio básico, produzindo uma coloração azul-forte, que é medida espectrofotometricamente no comprimento de onda em 760 nm. O procedimento adotado foi o seguinte:

##### a) Preparação da solução-padrão de ácido tânico

Na preparação da amostra-padrão para leitura de absorvância, colocou-se num erlenmeyer 1 mg de ácido tânico e, em seguida, foram adicionados 10 mL de metanol, com a obtenção de uma concentração de 0,1 mg/mL.

#### b) Curva-padrão

Na preparação da curva-padrão, foram pipetadas amostras de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0 mL da solução-padrão de ácido tânico em balões volumétricos de 10 mL com 1,6 mL do reagente de Folin-Denis e 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), completando-se o volume com água destilada. Misturou-se bem, e, após 30 minutos, os balões foram levados para determinação da absorvância a 760 nm; em seguida, traçou-se a curva-padrão de absorvância x mg de ácido tânico/100 mL.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U-2000.

#### c) Preparação das amostras

Em um erlenmeyer, colocou-se 1 mg da amostra de extrato etanólico do pólen de *S. polyphyllum*, adicionando, posteriormente, 10 mL de metanol. O mesmo foi feito com o extrato etanólico da inflorescência de *S. polyphyllum*.

#### d) Determinação do tanino no pólen

Na preparação da amostra para leitura de absorvância, foi pipetado 0,4 mL da solução etanólica do pólen, preparado no item (c), em balão volumétrico de 10 mL, com três repetições, ao qual foram adicionados 1,6 mL de reagente Folin-Denis e 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio, completando-se o volume com água destilada. Após 30 minutos, foi realizada a leitura de absorvância em 760 nm.

#### e) Determinação do tanino na inflorescência

O mesmo procedimento foi realizado com a solução etanólica da inflorescência, pipetando-se, porém, 0,2 mL da solução etanólica preparada no item (c), com três repetições.

Após as leituras de absorvância das amostras dos extratos, determinou-se, de acordo com a curva-padrão obtida anteriormente, a concentração das amostras em mg de ácido tânico/100 mL, posteriormente convertidas em percentagem. O procedimento de preparo dos reagentes encontra-se no Apêndice.

### **2.4.3. Isolamento dos constituintes químicos do pólen de *S. polyphyllum***

O extrato etanólico do pólen de *S. polyphyllum* foi submetido a uma análise preliminar por cromatografia de camada delgada (CCD), a fim de investigar a sua complexidade e selecionar o sistema de solventes a serem utilizados para o seu fracionamento por cromatografia de coluna (CC).

Após a escolha do sistema de solventes, o extrato foi submetido a sucessivos fracionamentos em coluna cromatográfica de sílica-gel, conforme ilustrado na Figura 7. Nessas separações cromatográficas, a quantidade de sílica-gel utilizada em cada caso foi de aproximadamente 50 vezes a massa do extrato (KEESE et al., 1988).

As frações coletadas no primeiro fracionamento, que apresentavam os mesmos valores  $R_f$ , por comparação em CCD, foram reunidas em grupos e nomeadas por PE(1), os quais foram, posteriormente, submetidos a novos fracionamentos em cromatografia de coluna até obter um composto isolado [PE(2) 21-123 e PE(3) 1-126]. As frações que não foram submetidas a novo fracionamento apresentaram pequena quantidade de massa, e nenhum ponto era visualizado quando submetido a CCD.

### **2.4.4. Análise de açúcares, realizada por cromatografia de camada delgada na fração PE(3) 1-126**

A análise qualitativa de açúcares na fração PE(3) 1-126, obtida após sucessivos fracionamentos do extrato etanólico do pólen *S. polyphyllum*, foi realizada através de cromatografia de camada delgada, utilizando-se a metodologia proposta por IKAN (1991) para análise de carboidratos.

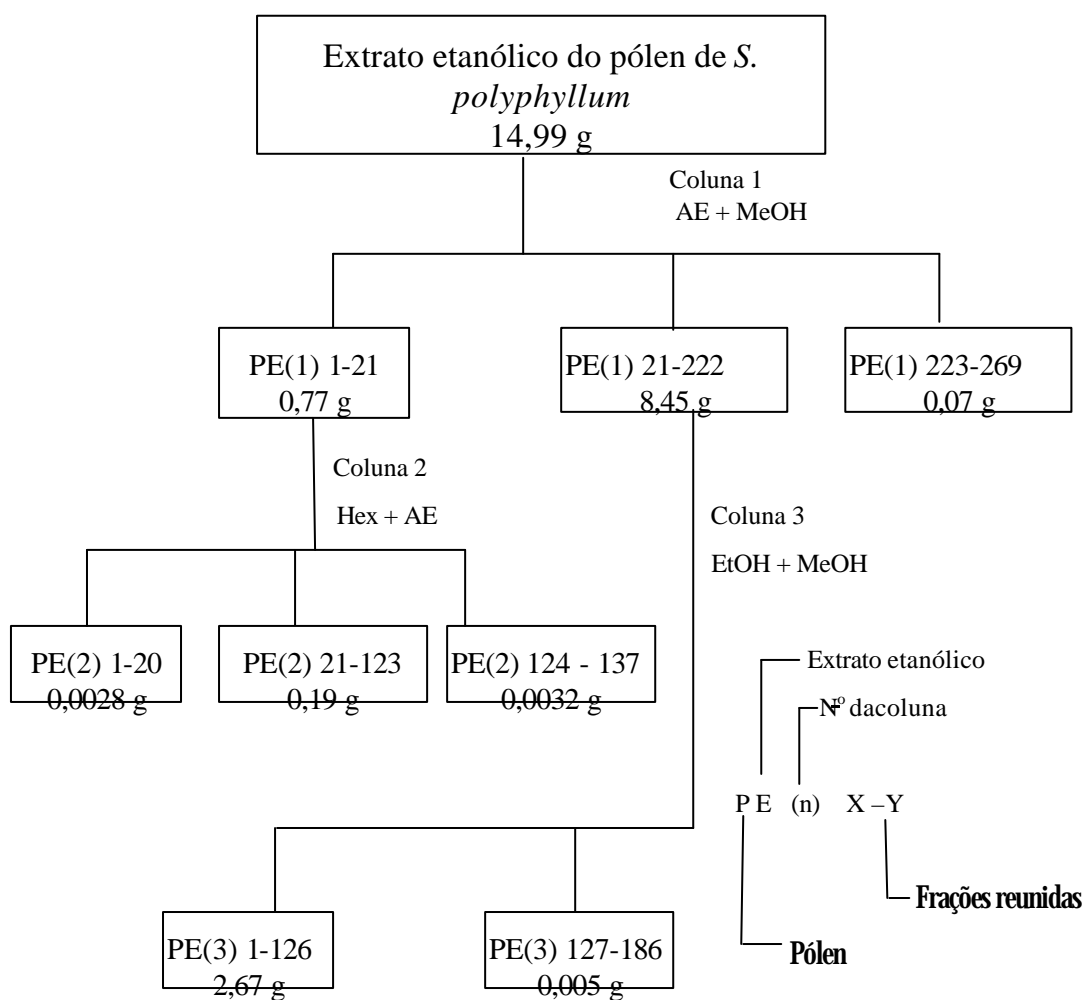


Figura 7 – Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato etanólico do pólen *S. polyphyllum* (MeOH = metanol, AE = acetato de etila, EtOH = éter dietílico e Hex = hexano).

Foi utilizada uma placa cromatográfica (20 x 20 cm), onde foram colocados padrões de açúcares para comparação com a fração PE(3) 1-126. Os padrões utilizados foram: arabinose, frutose, galactose, glicose, maltose, sacarose e xilose. Esta, por sua vez, foi acondicionada em recipiente fechado contendo a mistura de solventes: butan-1-ol, ácido acético, éter dietílico e água na concentração de 9:6:3:1, respectivamente. O tempo de corrida cromatográfica foi de três horas e 30 minutos, sendo em seguida revelada com p-anisaldeído.

#### **2.4.5. Ensaios biológicos**

Com o propósito de averiguar a atividade tóxica contra larvas de *A. mellifera*, foram realizados ensaios biológicos com o extrato hexânico e extrato etanólico do pólen e da inflorescência, assim como as frações obtidas do extrato etanólico do pólen. A metodologia para criação das larvas foi aquela descrita no item 2.2.

Tanto os extratos do pólen quanto os extratos da inflorescência de *S. polyphyllum* foram tratados da seguinte forma:

- T<sub>1</sub> – somente dieta de operária;
- T<sub>2</sub> – dieta de operária + 0,07% de extrato hexânico;
- T<sub>3</sub> – dieta de operária + 0,04% de extrato etanólico; e
- T<sub>4</sub> – dieta de operária + 0,07% de extrato etanólico.

Foram realizados também ensaios biológicos com as frações PE(1) 223-269, PE(2) 21-123 e PE(3) 1-126, obtidas do fracionamento do extrato etanólico do pólen, conforme os seguintes tratamentos:

- T<sub>1</sub> – somente dieta de operária;
- T<sub>2</sub> – dieta de operária + 0,07% da fração PE(1) 223-269;
- T<sub>3</sub> – dieta de operária + 0,07% da fração PE(2) 21-123; e
- T<sub>4</sub> – dieta de operária + 0,07% da fração PE(3) 1-126.

Cada tratamento foi constituído de quatro repetições contendo 12 larvas cada, num total de 48 por tratamento. As percentagens utilizadas nos ensaios

biológicos foram feitas a partir das concentrações encontradas por CARVALHO (1998), que obteve 50% de mortalidade quando acrescentava na dieta de operária 0,04% de pólen; quando utilizava 0,07% de pólen na dieta, obtinha 90% de mortalidade de larvas de abelhas.

Durante o período de alimentação foi avaliada, diariamente, a mortalidade de larvas; após esse período, verificou-se pré-pupa apresentando sintoma da criasacada brasileira e da pupa malformada.

Com relação a outras frações [PE(2) 1-20, PE(2) 124-137 e PE(3) 127-186], não se realizaram ensaios biológicos, em razão de essas frações se apresentarem em pequena quantidade, bem como consistirem em um material bastante impuro, do qual não foi possível isolar nenhuma substância.

#### **2.4.6. Análise estatística**

Para os ensaios biológicos em laboratório, realizados com extratos do pólen e da inflorescência, foi empregado o delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação aos resultados obtidos nos ensaios biológicos realizados com as frações [PE(2) 1-20, PE(2) 124-137 e PE(3) 127-186], estas foram apenas submetidas à análise de variância a 5% de probabilidade.

As análises estatísticas foram processadas por meio do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), da Universidade Federal de Viçosa.

#### **2.5. Efeito do ácido tânico no desenvolvimento de crias de *Apis mellifera* (africanizadas)**

Para testar o efeito tóxico do ácido tânico no desenvolvimento de crias de abelhas, foi realizado ensaio biológico, quando todas as larvas de *A. mellifera* foram alimentadas somente com dieta de operária, nos primeiros dois dias; ao

terceiro dia, passou-se a administrar o alimento de acordo com os tratamentos abaixo:

- Tratamento 1: somente dieta de operária;
- Tratamento 2: dieta de operária + 0,001% de ácido tânico;
- Tratamento 3: dieta de operária + 0,005% de ácido tânico;
- Tratamento 4: dieta de operária + 0,01% de ácido tânico;
- Tratamento 5: dieta de operária + 0,1% de ácido tânico;
- Tratamento 6: dieta de operária + 0,5% de ácido tânico; e
- Tratamento 7: dieta de operária + 1% de ácido tânico.

Cada tratamento foi constituído de quatro repetições, com 12 larvas cada, num total de 48 larvas por tratamento, sendo o Tratamento 1 considerado testemunha (controle). No período de alimentação e após, as larvas foram avaliadas diariamente, para verificar a mortalidade ou alteração em seu desenvolvimento.

### **2.5.1. Análise estatística**

Os dados avaliados foram mortalidade de larvas e pré-pupas apresentando sintoma da doença cria-ensacada brasileira, analisados por meio de regressão linear a 5% de probabilidade. Os modelos foram escolhidos com base na significância e nos coeficientes de regressão. A análise estatística foi feita, utilizando-se o programa SAS.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização dos extratos hexânico e etanólico do pólen e da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*

Após obtidos resultados positivos das análises preliminares do pólen de barbatimão, este e a inflorescência foram submetidos a extrações sucessivas com hexano e, posteriormente, com etanol. Após serem concentrados em evaporador rotatório, obtiveram-se rendimentos de 25,95% de extrato hexânico e 68,13% de extrato etanólico a partir do pólen e 8,89% de extrato hexânico e 27,17% de extrato etanólico a partir da inflorescência. Em seguida, foram obtidos os espectros no infravermelho de cada extrato, a fim de serem caracterizados.

O espectro no infravermelho do extrato hexânico do pólen (Figura 8) apresentou uma banda de absorção em  $2.962\text{ cm}^{-1}$  e  $2.849\text{ cm}^{-1}$ , devido à deformação axial de C-H. Observaram-se também duas bandas bem evidenciadas em  $1.092\text{ cm}^{-1}$  e  $1.022\text{ cm}^{-1}$ , o que foi devido ao estiramento de C-O. Por esse espectro, ficou clara a natureza alifática dessa amostra, assim como bem evidente ela também ficou na mesma ausência de compostos carboxílicos, como ésteres e ácidos graxos, uma vez que não se observou nenhuma absorção entre  $1.710\text{ cm}^{-1}$  e  $1.740\text{ cm}^{-1}$ .

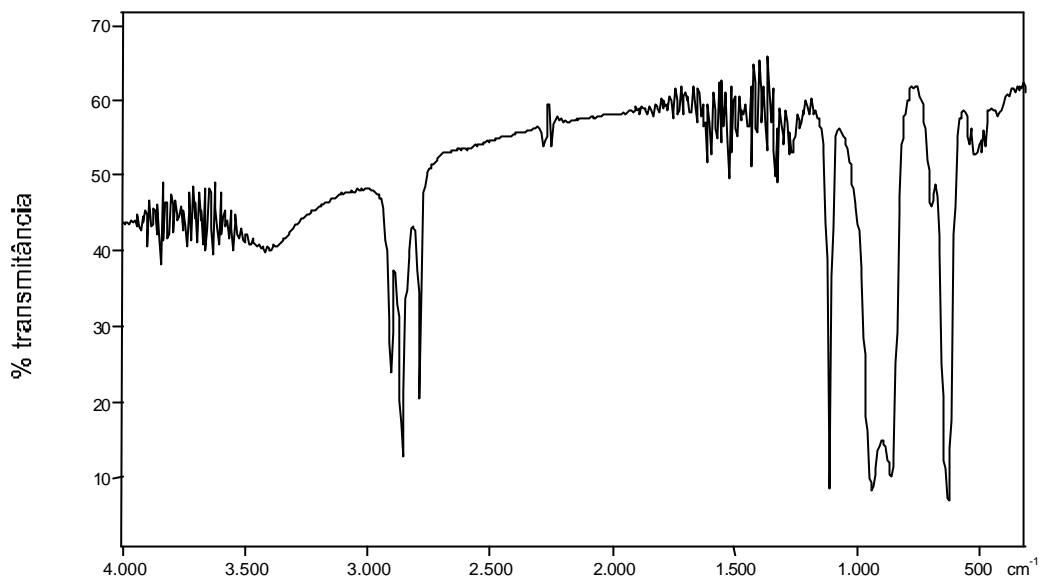


Figura 8 – Espectro no infravermelho (KBr) do extrato hexânico do pólen de *S. polyphyllum*.

O espectro no infravermelho (Figura 9) do extrato hexânico da inflorescência apresentou banda de absorção em  $2.962\text{ cm}^{-1}$  e  $2.849\text{ cm}^{-1}$ , devido à deformação axial de C-H. Observaram-se também bandas pequenas na região de  $1.262\text{ cm}^{-1}$  e de  $1.092\text{ cm}^{-1}$  e  $1.022\text{ cm}^{-1}$ , o que foi devido ao estiramento de C-O. Pela análise desse espectro, pôde-se verificar a natureza alifática dessa amostra. Uma banda de intensidade média na região de  $1.735\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C=O}$ ) indicou a presença de ésteres nessa fração.

O espectro no infravermelho do extrato etanólico do pólen (Figura 10) apresentou uma banda larga com o máximo de absorção em  $3.400\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento de OH de álcoois ou fenóis; observou-se ainda uma banda em  $3.050\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-H}$ ),  $2.924\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C-H}$ ) e  $1.080\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C-O}$ ). Essas absorções foram indícios da presença de compostos poli-hidroxilados. Uma banda larga em torno de  $1.650\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular OH) indicou a presença de água nessa amostra, o que poderia, em parte, estar mascarando a visualização de absorção de outros grupos de compostos presentes na amostra que absorviam nessa região.

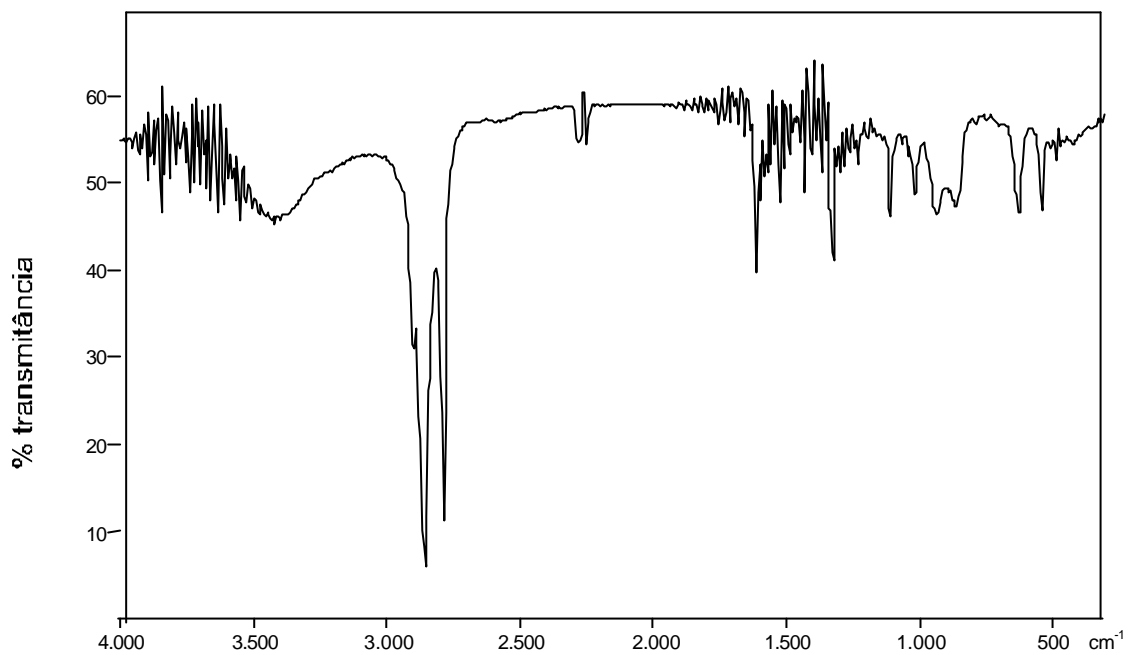


Figura 9 – Espectro no infravermelho (KBr) do extrato hexânico da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*.

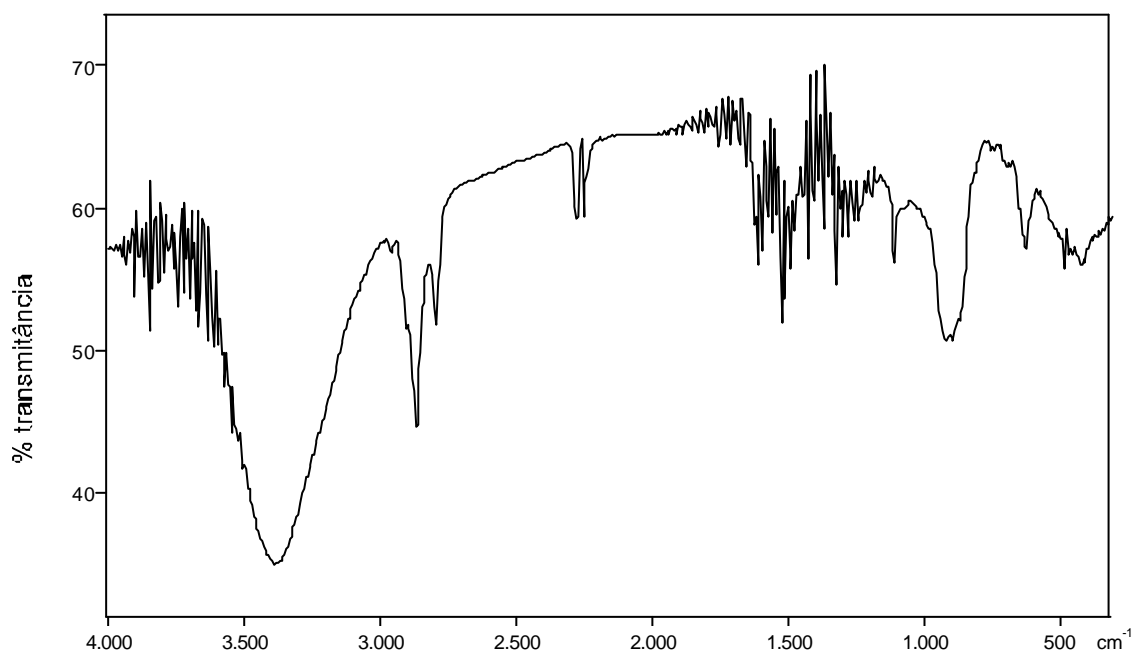


Figura 10 – Espectro no infravermelho (KBr) do extrato etanólico do pólen de *S. polyphyllum*.

Com relação ao espectro no infravermelho do extrato etanólico da inflorescência (Figura 11), ele apresentou absorção forte na região de  $3.384\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento de OH (álcoois ou fenóis), e de  $1.080\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-O). Por esse espectro, ficou evidente a presença de compostos poliidroxilados nessa fração.

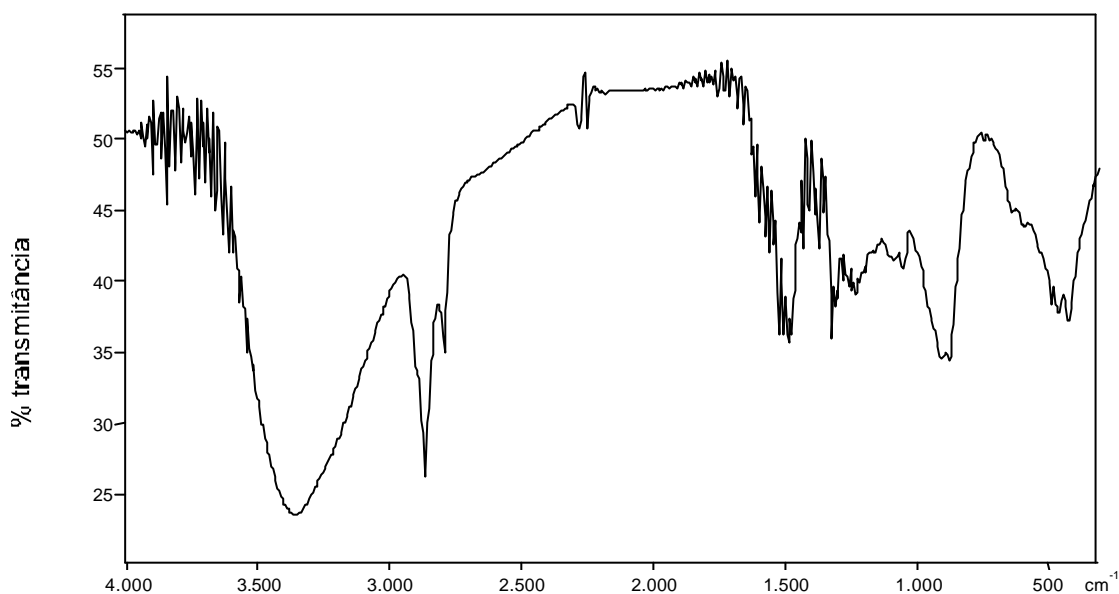


Figura 11 – Espectro no infravermelho (KBr) do extrato etanólico da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*.

### **3.2. Análise dos ensaios biológicos com extratos hexânicos e etanólicos do pólen e da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum***

Inicialmente, foi realizado um ensaio biológico com os extratos hexânico e etanólico do pólen, tendo-se em vista que CARVALHO (1998) mostrou que o pólen de *S. polyphyllum* (barbatimão) causava a morte de crias de abelhas em laboratório quando lhes eram administradas pequenas quantidades desse pólen na dieta a partir do terceiro dia de alimentação.

Os resultados desses ensaios biológicos são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Média de mortalidade na fase larval e na fase de pré-pupa e sobrevivência de operárias de *A. mellifera* (africanizadas) alimentadas com dieta de operária e extratos do pólen. T<sub>1</sub> - somente “dieta de operária”; T<sub>2</sub> - “dieta de operária” + 0,07% de extrato hexânico; T<sub>3</sub> - “dieta de operária” + 0,04% de extrato etanólico; e T<sub>4</sub> - “dieta de operária” + 0,07% de extrato etanólico. Ensaio realizado em condições de laboratório sob temperatura e umidade relativa de 34°C e 96%, respectivamente

Tratamento	Mortalidade (%)			Sobrevivência* (%)
	Larva *	Pré-Pupa* Com Sintoma	Pupa Malformada	
1	1,04 c	0 c	0	23,96 a
2	2,60 bc	0 c	0	22,40 a
3	4,17 ab	9,38 b	2,60	8,85 b
4	6,25 a	17,71 a	0	1,04 c

\* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey .

No Tratamento 2, as larvas receberam dieta de operária até a segunda alimentação, e a partir da terceira até a quinta alimentação foi acrescentado a essa dieta 0,07% de extrato hexânico de pólen de *S. polyphyllum* (barbatimão). Ao comparar esse tratamento com o controle (T<sub>1</sub>), não se observaram diferenças estatísticas na mortalidade (Quadro 1), sendo verificada pequena mortalidade das larvas no período de alimentação. SILVA (1995) e CARVALHO (1998) também encontraram pequena quantidade de larvas mortas, o que era de se esperar em função do sistema artificial de criação dessas larvas. Verificou-se também nesse tratamento que nenhuma pré-pupa (Quadro 1) apresentou qualquer sintoma da cria-ensacada brasileira.

Nos Tratamentos 3 e 4, as larvas receberam a dieta de operária até a segunda alimentação e ao terceiro dia, a dieta de operária acrescida de 0,07 e 0,04% de extrato etanólico do pólen (Tratamentos 3 e 4, respectivamente).

Ao contrário do tratamento ao qual se acrescentou extrato hexânico na dieta de operária, em ambos os tratamentos (3 e 4) se observou o aparecimento de crias com sintomas típicos da doença cria-ensacada brasileira, ou seja, as larvas

(pré-pupas) não conseguiram fazer a muda para a pupa e, então, acumulavam líquido ecdisial entre a cutícula da larva e a da pupa em formação. Nota-se, no Quadro 1, que as médias de pré-pupas com sintoma foram diferentes, estatisticamente, nos Tratamentos 3 e 4. A média de sobrevivência dos Tratamentos 3 e 4 também foi significativamente diferente da observada no controle (Quadro 1), em que se verificou uma média menor no Tratamento 4 (1,04%). Essa diferença de sobrevivência entre esses tratamentos (3 e 4) pode ter ocorrido pelo fato de que, no Tratamento 4, acrescentou-se maior porcentagem de extrato etanólico (0,07%).

O aparecimento de pré-pupas malformadas no Tratamento 3 e o aumento de larvas mortas talvez possam indicar o efeito sobre o nível da digestão ou absorção de proteínas ainda na fase de alimentação. Segundo CAMARGO (1972), deficiências nutricionais podem levar ao aparecimento de crias malformadas. Aquele efeito sobre o nível de digestão poderia ser explicado pelo efeito de possíveis taninos presentes no extrato etanólico do pólen, os quais podem afetar as proteínas ou enzimas, conforme descrito em outros animais (MARTIN et al., 1985; STEINLY e BERENBAUM, 1985; HAGERMAN et al., 1992; BOURCHIER e NEALIS, 1993; BARBEHENN e MARTIN, 1994).

Comparando os Tratamentos 3 e 4 quanto à mortalidade de larvas, pôde-se observar (Quadro 1) que, na concentração maior (0,07%), a média de mortalidade de larvas foi maior do que na menor concentração (0,04%), dando forte evidência do efeito das substâncias tóxicas já nos períodos de digestão e absorção dos nutrientes.

Com esses resultados, pode-se propor que o extrato hexânico do pólen não apresenta substâncias que possam ser tóxicas às crias de *A. mellifera* ou capazes de levar ao aparecimento dos sintomas da cria-ensacada brasileira. Com isso, fica evidente que os componentes químicos do pólen de barbatimão que possam causar a mortalidade das crias estão presentes no extrato etanólico.

No Quadro 2, pode-se observar resultado semelhante àqueles apresentados no Quadro 1. Nesse caso, foram realizados ensaios biológicos, utilizando-se extratos hexânico e etanólico da inflorescência em vez do pólen de barbatimão.

Quadro 2 – Média de mortalidade na fase larval e na fase de pré-pupa e sobrevivência de operárias de *A. mellifera* (africanizadas) alimentadas com dieta de operária e extrato de inflorescência: T<sub>1</sub> - somente “dieta de operária”; T<sub>2</sub> - “dieta de operária” + 0,07% de extrato hexânico; T<sub>3</sub> - “dieta de operária” + 0,04% de extrato etanólico; e T<sub>4</sub> - “dieta de operária” + 0,07% de extrato etanólico. Ensaios realizados em condições de laboratório sob temperatura e umidade relativa de 34°C e 96%, respectivamente

Tratamento	Mortalidade (%)			Sobrevivência* (%)
	Larva *	Pré-Pupa* Com Sintoma	Pupa Malformada	
1	2,60 c	0 c	0 b	22,40 a
2	1,56 bc	0 c	0 b	23,44 a
3	4,69 ab	10,94 b	0,52 b	6,25 b
4	7,29 a	17,19 a	3,13 a	0 c

\* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A média de mortalidade de larvas verificada no tratamento em que foi oferecida a dieta de operária mais 0,07% de extrato hexânico não apresentou diferença estatística comparada ao controle. No entanto, houve diferença significativa entre o controle e os Tratamentos 3 e 4 (Quadro 2).

Verificaram-se também pré-pupas com sintoma da cria-ensacada brasileira nos Tratamentos 3 e 4, em que a média de pré-pupas com sintomas obtida no Tratamento 4 foi maior e estatisticamente diferente da conseguida no Tratamento 3. No Tratamento 4, observou-se presença de pupas malformadas, sendo este resultado significativo. Segundo ROSENTHAL (1988), a L-canavanina, aminoácido não-protéico, que está presente na alfafa e no trevo, dentre outros, quando introduzida na dieta de *Manduca sexta* provoca malformação em pupas e adultos.

Diante dos resultados obtidos com os extratos etanólico e hexânico do pólen e da inflorescência, ficou evidente que os compostos presentes no extrato hexânico não causam toxidez às larvas de *A. mellifera* ou estão presentes em pequenas quantidades (massa). No entanto, ensaios realizados com extrato etanólico resultaram na presença dos sintomas da doença, além de ser observado

diminuição da sobrevivência (Quadros 1 e 2), indicando que o composto e, ou, compostos procurados se encontram predominantemente nesse extrato.

Comparando os resultados dos Quadros 1 e 2, observou-se que o extrato etanólico da inflorescência apresenta o mesmo efeito tóxico que o extrato etanólico do pólen, indicando que a inflorescência possa apresentar o mesmo composto tóxico.

### **3.3. Determinação do teor de taninos nos extratos etanólicos do pólen e da inflorescência**

Tanto o extrato etanólico do pólen quanto o extrato etanólico da inflorescência, quando foram submetidos a uma análise preliminar por cromatografia de camada delgada, a fim de investigar a sua complexidade e escolher o sistema de solventes a ser utilizado para seu fracionamento por cromatografia de coluna, mostraram pontuações contíguas formando um rastro característico da presença de compostos poliméricos. Com isso e pelo fato de o gênero *Stryphnodendron* ser bastante rico em tanino, foi realizada uma análise para confirmação e determinação do teor de tanino no pólen e na inflorescência através dos extratos etanólicos desses compostos.

Para verificar inicialmente a presença de tanino nesses extratos, utilizou-se o método para determinação de tanino preconizado pela ASSOCIATION... – AOAC (1984), quando foi observada uma coloração azul-forte, devido à redução dos ácidos fosfomolibdico-fosfotúngsticos, confirmando, com isso, a presença de tanino tanto no extrato etanólico do pólen quanto no da inflorescência de *S. polyphyllum*. Em seguida, foi determinado o teor de tanino no pólen e na inflorescência. Os resultados da percentagem de teor de tanino no pólen e na inflorescência são expressos no Quadro 3.

A principal importância econômica do barbatimão está relacionada com a produção de taninos, em cuja casca se observa o maior teor destes, chegando a apresentar até 50% de peso quando seco, porém variando de acordo com o local

Quadro 3 – Percentagem de taninos encontrados no pólen e na inflorescência de *S. polyphyllum*

Amostra	Teor de Tanino %
Pólen	7,91
Inflorescência	21,43

de origem da planta (ARRUDA, 1950; RESENDE, 1971; PANIZZA et al., 1988; TEIXEIRA et al., 1990). No entanto, nenhum trabalho até o momento foi realizado, medindo-se o teor de tanino no pólen e na inflorescência de *Stryphnodendron*.

Os taninos são inibidores da atividade enzimática de celulase, pectinase, amilase, lipase, enzimas proteolíticas,  $\beta$ -galactosidase e outras enzimas microbianas envolvidas na fermentação de grãos (BOUGHADAD et al., 1986; KAROWE, 1989; CASTRO, 1998; CHUNG et al., 1998), não se descartando, com isso, uma possível ação desses compostos no nível da digestão da cutícula da larva durante a ecdise.

A redução do valor nutritivo, a desidratação e edemas observados em gados tratados com sementes de *S. barbatiman* são atribuídos à presença de taninos, sendo estes o principal componente tóxico da planta (PERREIRA et al., 1989 a, b, c).

As folhas do carvalho *Quercus robur*, à medida que amadurecem, provocam o desenvolvimento precoce de larvas da mariposa *Operophtera brumata*, causando alta mortalidade. Isso ocorre devido à influência do aumento do conteúdo total dos taninos contidos nas folhas de carvalho. Esses taninos formam complexos com as proteínas e reduzem grandemente a sua digestibilidade por enzimas proteolíticas como a tripsina (FEENY, 1970). Esse mesmo autor, alimentando larvas de mariposa com dieta artificial contendo 1% de peso de taninos frescos da folha de carvalho, observou redução significativa no crescimento larval e no peso pupal.

Os taninos presentes no pólen de *S. polyphyllum* podem estar relacionados com a mortalidade de crias de *A. mellifera*, já que possuem efeitos tóxicos a vários animais, afetando, às vezes, seu desenvolvimento (MERCER, 1993; BOURCHIER e NEALIS, 1993; BARBEHENN e MARTIN, 1994).

A presença de taninos tanto no pólen (7,91%) quanto na inflorescência (21,43%) e os resultados positivos encontrados nos ensaios biológicos com extratos etanólicos indicam que existe possibilidade de serem taninos os responsáveis pela doença cria-ensacada brasileira.

### **3.4. Isolamento dos constituintes químicos do pólen de *S. polyphyllum* e resultados de ensaios biológicos**

Pelos resultados obtidos até o momento, parte da atividade tóxica da inflorescência e do pólen pode ser devida à presença de taninos neles. Porém, isso não descarta a possibilidade da presença de outros compostos tóxicos nos extratos obtidos. Em vista disso, passou-se a fracionar o extrato etanólico do pólen de *S. polyphyllum*, que resultou em vários grupos de frações, nomeadas PE(1). As frações PE(1) 1-21, PE(1) 22-222 e PE(1) 223-269 foram obtidas após a evaporação do solvente, respectivamente, nas seguintes quantidades de massa: 0,77 g; 8,45 g; e 0,07 g. Em razão de o extrato hexânico do pólen e de a inflorescência não apresentarem toxidez às crias de *A. mellifera* e de o extrato etanólico da inflorescência não ter exibido pontos diferentes na CCD, estes não foram submetidos ao fracionamento.

A fração PE(1) 1-21 apresentou, no espectro do infravermelho (Figura 12), absorções em  $3.050\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu = \text{C-H}$ ),  $2.924\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu \text{ CH}_3$ ),  $2.853\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu \text{ CH}_2$ ),  $1.709\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu \text{ C=O}$ ) e  $721\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta_s(\text{CH}_2)_n$ ]. A absorção em  $3.050\text{ cm}^{-1}$  indicou a presença de insaturações nas moléculas presentes nessa fração. As bandas de  $1.730\text{ cm}^{-1}$  e  $1.720\text{ cm}^{-1}$  corresponderam, respectivamente, a estiramento de  $\text{C=O}$  de éster e ácidos; também, pôde-se observar uma banda fraca, porém evidente entre  $2.500\text{ cm}^{-1}$  e  $3.500\text{ cm}^{-1}$ , confirmando a presença de ácidos carboxílicos naquela fração. Através da análise do espectro no infravermelho dessa fração,

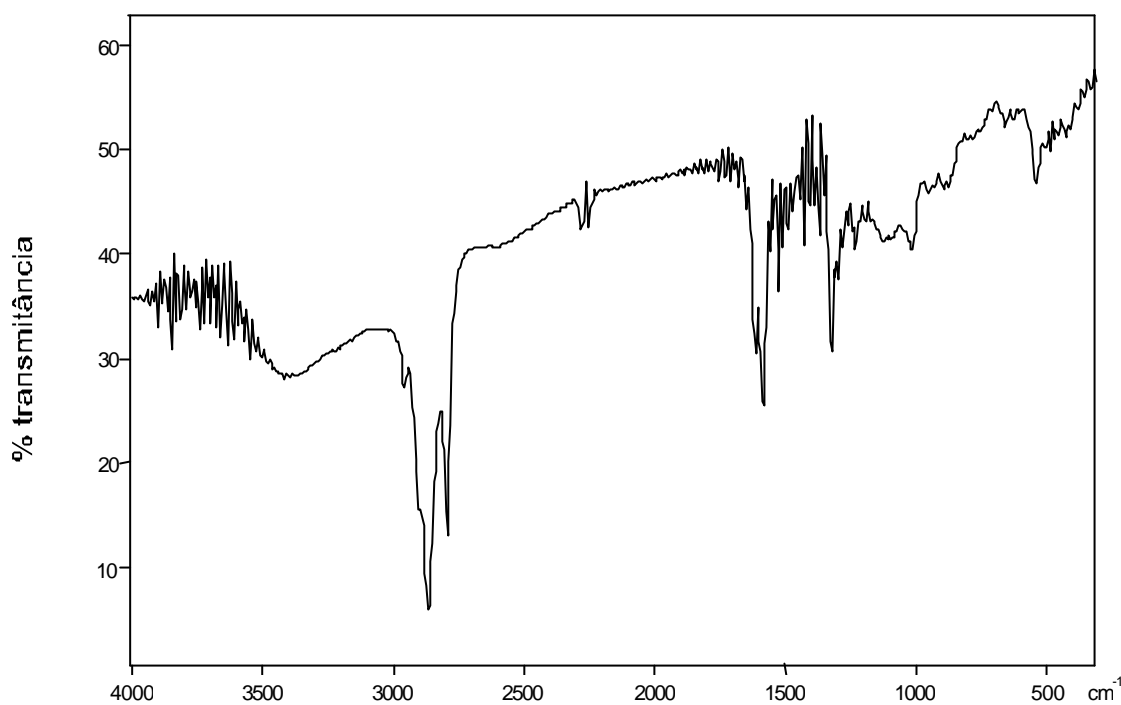


Figura 12 – Espectro no infravermelho (KBr) da fração PE(1) 1-21.

concluiu-se que ela é constituída principalmente de ésteres graxos e ácidos graxos. Apesar de a análise dessa fração por CCD revelar a presença de apenas um ponto, a coloração amarelada e o espectro no infravermelho indicam que essa fração não se apresenta completamente pura, tendo sido fracionada novamente em coluna de sílica-gel.

Com o fracionamento de PE(1) 1-21, obtiveram-se outras frações que foram denominadas PE(2). As frações PE(2) 1-20 e PE(2) 124-137, após a evaporação do solvente, resultaram em quantidades de massas muito pequenas; com isso, não foi possível submetê-las a espectro no infravermelho. Em relação à fração PE(2) 21-123, observaram-se, no espectro do infravermelho (Figura 13), absorções em  $3.010\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu =\text{C-H}$ ),  $2.924\text{ cm}^{-1}$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C-H}$ ),  $1.710\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C=O}$ ),  $1.467\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_s\text{ C-H}$ ) e  $718\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_s(\text{CH}_2)_n$ ). O espectro no infravermelho indicou que essa amostra era constituída de ácido graxo. Como normalmente é difícil isolar os ácidos graxos por CC de sílica, obtêm-se sempre misturas; nesse caso, esta fração deve ser constituída de uma mistura de ácidos, sendo a absorção na região de  $3.010\text{ cm}^{-1}$  indicativo de insaturação.

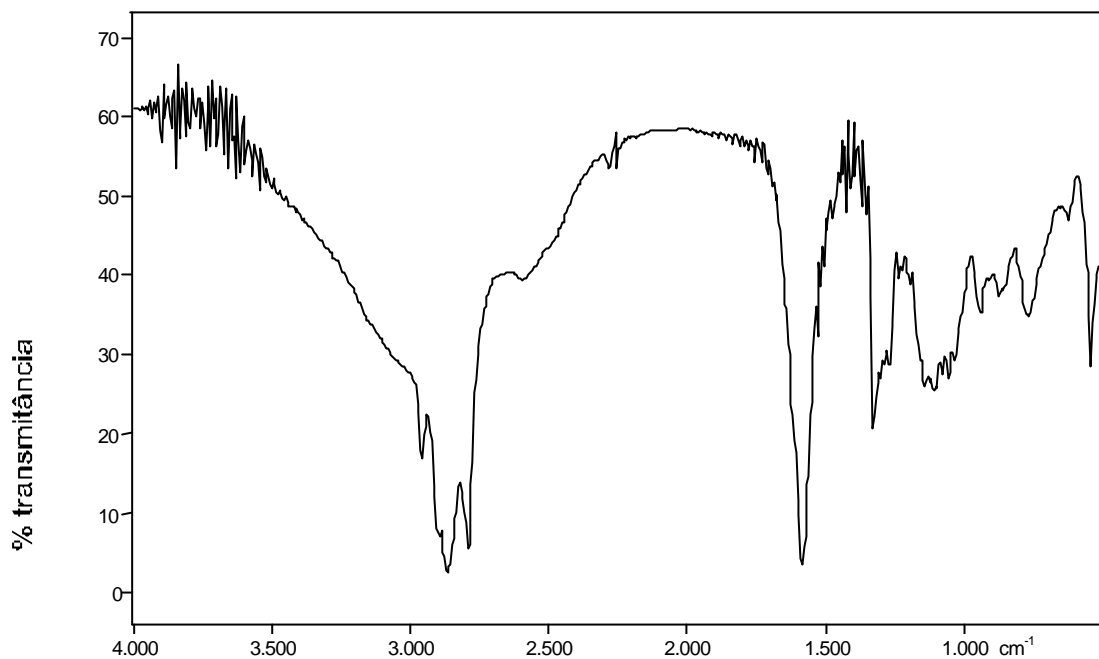


Figura 13 – Espectro no infravermelho (KBr) da fração PE(2) 21-123.

Com o propósito de averiguar a existência de atividade tóxica da fração PE(2) 21-123 (ácidos graxos) em crias de *A. mellifera*, foram realizados ensaios biológicos.

No Quadro 4 são mostradas as médias de percentagens de mortalidade de larvas, pupas malformadas, pupas sem sintoma e sobrevivência de crias de *A. mellifera*.

No Tratamento 2, as larvas de *A. mellifera* foram alimentadas com dieta de operária até o segundo dia; a partir do terceiro dia, foi oferecida às larvas dieta de operária acrescentada de 0,07% de PE(2) 21-123. No Quadro 4, observa-se que nenhum fator avaliado foi significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F, em comparação com o controle. Em relação à presença de pupa malformada encontrada tanto no controle quanto no Tratamento 2, ela se mostrou de acordo com os resultados obtidos por CARVALHO (1998), que obteve um número pequeno, não-significativo, de pupas malformadas na testemunha.

Quadro 4 – Médias de percentagens e análise de variância da mortalidade na fase larval e na fase de pré-pupa de operárias de *A. mellifera* (africanizadas) e sobrevivência alimentadas com dieta de operária e fração: T<sub>1</sub> - somente “dieta de operária” e T<sub>2</sub> - “dieta de operária” + 0,07% da fração PE(2) 21-123. Ensaios realizados em condições de laboratório sob temperatura e umidade relativa de 34°C e 96%, respectivamente

Tratamento	Mortalidade (%)						Sobrevivência (%)	F
	Larva	F	Pupa Sem Sintoma	F	Pupa Malformada	F		
1	1,56		0,52		0,52		22,40	
2	2,60	2,00 <sup>ns</sup>	1,04	0,43 <sup>ns</sup>	0,52	0,00 <sup>ns</sup>	20,83	1,42 <sup>ns</sup>

ns Não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Os resultados obtidos eram esperados, pois o pólen é o fornecedor natural de ácidos graxos, e estes, por sua vez, são indispensáveis para a nutrição e, conseqüentemente, para o desenvolvimento das abelhas (CAMARGO, 1972; SANFORD, 1996; BASTOS, 1996, 1998).

Em relação à fração PE(1) 21-222, obtida no fracionamento do extrato etanólico do pólen, observaram-se, na análise do espectro no infravermelho, uma banda forte de absorção entre 3.100 cm<sup>-1</sup> e 3.600 cm<sup>-1</sup> (ν O-H) e uma banda em torno de 1.050 cm<sup>-1</sup> (CO), indicando a presença de constituintes poli-hidroxilados naquela fração. A absorção em torno de 1.650 cm<sup>-1</sup> (δOH de H<sub>2</sub>O) indicou a presença de água na referida fração.

Apesar de a cromatografia de camada delgada daquela fração ter evidenciado apenas um ponto com R<sub>f</sub> em 0,23 (éter dietílico:metanol), a coloração amarelada ou amarronzada indicou que esta amostra não estava completamente pura, sendo novamente fracionada em coluna de sílica-gel.

As frações obtidas do fracionamento de PE(1) 21-222 foram denominadas PE(3). A fração PE(3) 1-126 apresentou espectro no infravermelho, com banda larga e intensa, em 3.600 cm<sup>-1</sup> e 3.200 cm<sup>-1</sup> (ν O-H) e absorção em 2.936 cm<sup>-1</sup> (ν C-H) e 1.060 cm<sup>-1</sup> (ν C-O). A presença da banda larga na região de 3.200-3.600 cm<sup>-1</sup> foi uma evidência de compostos poli-hidroxilados com pequenas quantidades de

C-H, visualizado por uma banda curta em  $2.936\text{ cm}^{-1}$ . Observou-se, durante o manuseio dessa fração, que ela era bastante higroscópica, o que dificultava a sua secagem. Com isso, a referida fração foi levada ao Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Silvicultura da UFV, para ser liofilizada.

Por apresentar indicativos de que a fração PE(3) 1-126 poderia ser constituída de carboidratos, após ser liofilizada, ela foi submetida a uma análise de açúcares, por cromatografia de camada delgada.

A adição de arabinose e galactose na análise foi feita com a finalidade de verificar a presença desses açúcares na fração PE(3) 1-126, uma vez que estes são tóxicos para abelhas (BARKER, 1977).

O resultado da análise qualitativa (Figura 14), através de comparação dos valores de  $R_f$  dos padrões utilizados (Quadro 5), revelou que a amostra poderia ser frutose ou galactose.

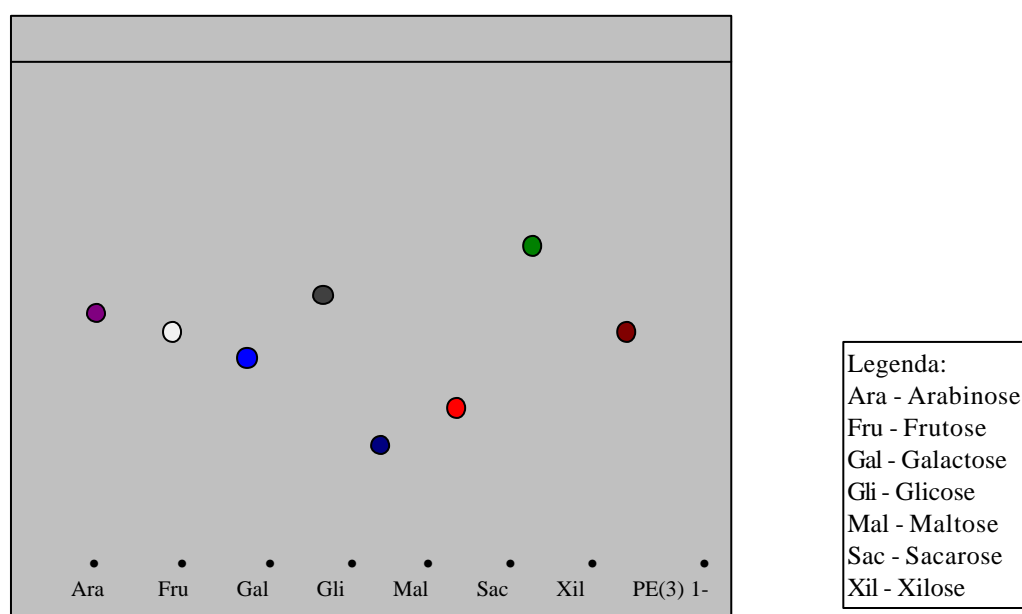


Figura 14 – Resultado da corrida cromatográfica para determinação do carboidrato presente no extrato etanólico.

Quadro 5 – Resultado dos valores de  $R_f$  dos padrões utilizados e da fração PE(3) 1-126 testada, analisados por CCD eluída com metanol

AÇÚCARES	$R_f$
Arabinose	0,54
Frutose	0,51
Galactose	0,50
Glicose	0,55
Maltose	0,39
Sacarose	0,43
Xilose	0,64
PE(3) 1-126	0,51

Para confirmação da composição química dessa fração, realizou-se espectro no infravermelho dos padrões: arabinose, frutose, galactose, glicose, maltose, sacarose e xilose, quando foi observado que o espectro no infravermelho obtido no padrão frutose (Figura 15) apresentava as mesmas absorções verificadas no espectro do infravermelho da fração PE(3) 1-126 (Figura 16), concluindo-se que o composto contido nessa fração se tratava de frutose.

Mesmo com a confirmação de a fração PE(3) 1-126 tratar-se de frutose, foi realizado ensaio biológico para certificar-se da sua não-toxidez. No Quadro 6 estão apresentadas as médias de percentagens de mortalidade e sobrevivência de crias de abelhas.

As larvas do Tratamento 2 foram alimentadas até o segundo dia com dieta de operária; ao terceiro dia, passou-se a administrar-lhes dieta de operária mais 0,07% de PE(3) 1-126, sendo alimentadas até o quinto dia.

Com os resultados obtidos, verificou-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si. Nenhuma pré-pupa foi detectada apresentando sintoma da doença cria-ensacada brasileira no Tratamento 2.

Segundo BARKER (1977), BARKER e LEHNER (1976) e HARBORNE (1988), muitos carboidratos são nutritivos ou tóxicos para as abelhas. Alguns carboidratos encontrados no pólen, como lactose, galactose, arabinose e manose, dentre outros, são tóxicos para as abelhas. Entretanto, a frutose, fração PE(3) 1-126, foi o único açúcar encontrado no pólen de *S. polyphyllum*.

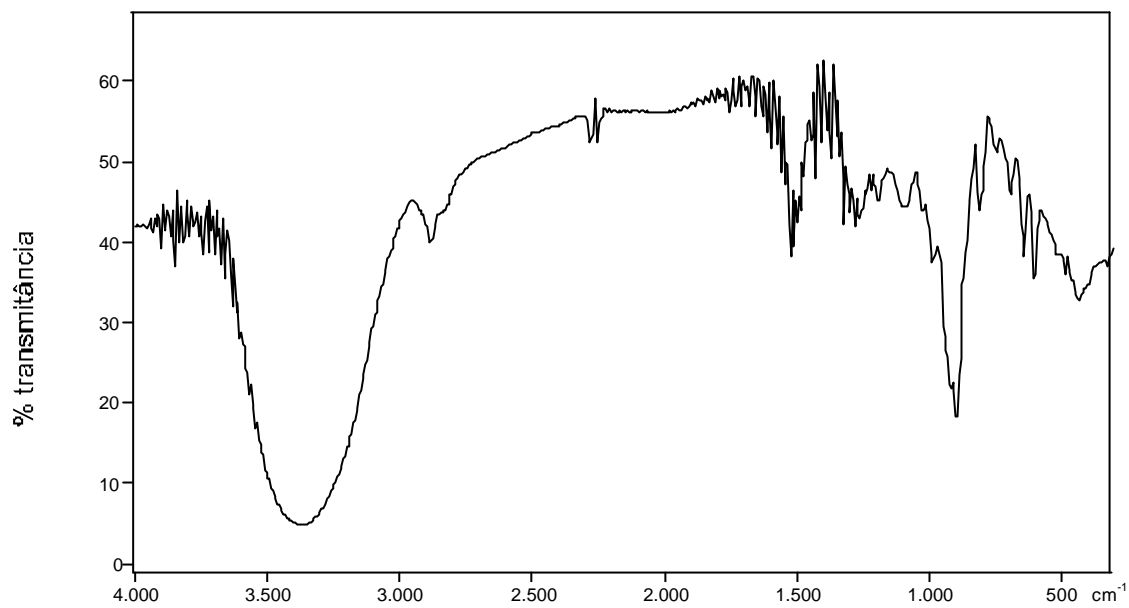


Figura 15 – Espectro no infravermelho (KBr) do padrão frutose.

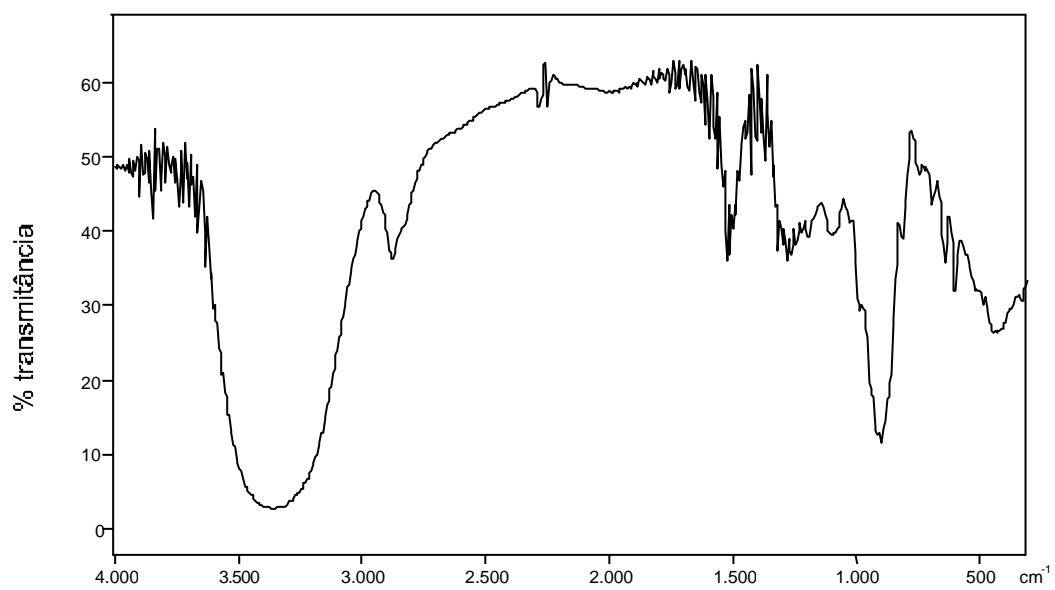


Figura 16 – Espectro no infravermelho (KBr) da fração PE(3) 1-126.

Quadro 6 – Médias de percentagem e resultado do teste F para mortalidade na fase larval e na fase de pré-pupa de operárias de *A. mellifera* (africanizadas) e sobrevivência alimentadas com dieta de operária e fração: T<sub>1</sub> - somente “dieta de operária” e T<sub>2</sub> - “dieta de operária” + 0,07% da fração PE(3) 1-126. Ensaios realizados em condições de laboratório sob temperatura e umidade relativa de 34°C e 96%, respectivamente

Tratamento	Mortalidade (%)						Sobrevivência (%)	F
	Larva	F	Pupa Sem Sintoma	F	Pupa Malformada	F		
1	1,56		0,52		0,52		22,40	
2	1,56	0,00 <sup>ns</sup>	1,04	0,43 <sup>ns</sup>	0,52	0,00 <sup>ns</sup>	22,92	0,16 <sup>ns</sup>

ns Não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Em relação à fração PE(1) 223-269, observou-se, no espectro do infravermelho (Figura 17), uma banda com máximo de absorção em 3.420 cm<sup>-1</sup>, devido à presença de OH de álcoois ou fenóis. Como essa amostra se apresentava em quantidade bem pequena e também não foi possível achar um sistema de solvente para fracioná-la, foi apenas realizado ensaio biológico nessa amostra.

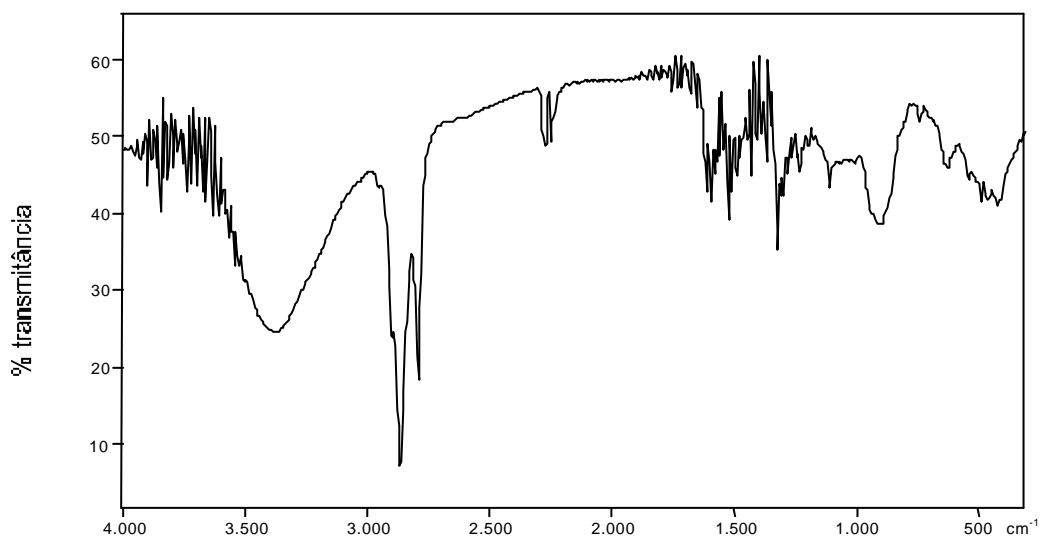


Figura 17 – Espectro no infravermelho (KBr) da fração PE(1) 223-269.

Os resultados obtidos do ensaio biológico realizado com as frações PE(1) 223-269 estão no Quadro 7.

Quadro 7 – Média de percentagem de mortalidade e teste F, na fase larval e na fase de pré-pupa de operárias de *A. mellifera* (africanizadas) e sobrevivência alimentadas com dieta de operária e frações: T<sub>1</sub> - somente “dieta de operária” e T<sub>2</sub> - “dieta de operária” + 0,07% da fração PE(1) 223-269. Ensaio realizado em condições de laboratório sob temperatura e umidade relativa de 34°C e 96%, respectivamente

Tratamento	Mortalidade (%)								Sobrevivência (%)	F
	Larva	F	Pre-Pupa Com Sintoma	F	Pupa Sem Sintoma	F	Pupa Malformada	F		
1	1,56		0		0,52		0,52		22,40	
2	4,17	6,83*	2,0	13,33*	1,04	0,43 <sup>ns</sup>	2,61	3,43 <sup>ns</sup>	13,54	27,94*

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

No Tratamento 2, em que as larvas foram alimentadas a partir do terceiro dia com dieta de operária mais 0,07% de PE(1) 223-269, foi verificada uma média de mortalidade significativa em relação ao controle (Quadro 7). Detectou-se também, nesse tratamento, a presença de pré-pupas com sintomas da cria-ensacada brasileira. A média de sobrevivência do Tratamento 2 foi menor, sendo significativamente diferente, pelo teste F a 5% de probabilidade, daquela do Tratamento 1 (controle).

Com relação às médias de mortalidade de larvas no Tratamento 2, puderam-se verificar semelhanças com o tratamento, em que as larvas foram alimentadas com dieta de operária mais 0,04% de extrato etanólico, tanto do pólen quanto da inflorescência, conforme mostrado nos Quadros 1 e 2. No entanto, a ocorrência de pré-pupas apresentando sintomas da doença foi menor, comparada com a dos tratamentos com 0,04 e 0,07% de extrato etanólico do pólen e da

inflorescência (Quadros 1 e 2). O fato de essa fração referir-se ao restante coletado da coluna cromatográfica do fracionamento do extrato etanólico do pólen pode explicar a ocorrência de pré-pupas com cria-ensacada brasileira, ficando evidente que o composto tóxico para larvas está nessa fração em menor concentração, portanto em maior concentração no extrato etanólico, já que nenhum composto isolado apresentou toxidez às crias de *A. mellifera*.

### **3.5. Ensaios biológicos para avaliar a toxidez de ácido tânico**

Após verificar a presença de taninos no extrato etanólico tanto do pólen quanto da inflorescência do barbatimão e o fato de nenhum composto isolado do pólen ser tóxico para crias de abelhas, realizaram-se ensaios biológicos com ácido tânico, a fim de verificar sua ação no desenvolvimento de crias de *A. mellifera* (africanizadas), por ser esse composto considerado exemplo típico dos taninos (CHUNG et al., 1998).

Os resultados obtidos (Quadro 8) indicaram que em todos os tratamentos em que foi administrado ácido tânico na dieta das crias de abelhas ocorria o aparecimento de pré-pupas com sintomas característicos da doença cria-ensacada brasileira, ou seja, as crias não conseguiam fazer muda para a pupa, acumulando líquido ecdisial entre a cutícula da larva e a da pupa, cujos sintomas foram semelhantes aos da doença cria-ensacada causada pelo vírus SBV (BAILEY, 1968).

No Quadro 8 também pode ser observado que existe diferença significativa na sobrevivência de crias que não receberam ácido tânico em relação ao controle, que recebeu somente a dieta normal de operária durante todo o período de alimentação. Observaram-se também pupas malformadas nos Tratamentos 2, 4, 5 e 6. Esse resultado está de acordo com os de BARBEHENN e MARTIN (1994), que verificaram a presença de pupas com deformidades, ao incluírem ácido tânico na dieta de *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae).

Quadro 8 – Percentagem de mortalidade na fase larval, na fase de pré-pupa e de pupas malformadas e sobrevivência de operárias de *A. mellifera* (africanizadas) alimentadas com dieta de operária nos dois primeiros dias e a partir do terceiro dia acrescentada de diferentes concentrações de ácido tânico, cujas crias foram desenvolvidas em condições de laboratório sob temperatura e umidade relativa de 34°C e 96%, respectivamente. Obs.: o controle recebeu somente dieta de operária durante os cinco dias de alimentação das crias

Concentração de Ácido Tânico na Dieta (%)	Mortalidade (%)			Sobrevivência (%)
	Larva	Pré-Pupa Com Sintoma	Pupa Malformada	
Controle	8,33	0	0	91,67
0,001	10,41	12,50	4,17	72,92
0,005	12,50	20,83	0	66,67
0,01	16,67	35,41	6,25	41,67
0,1	14,58	56,25	4,17	25,00
0,5	22,92	70,83	2,08	4,17
1	31,25	068,75	0	0

A ausência de pupas malformadas no Tratamento 7 pode ser explicada pelo fato de todas as crias não conseguirem chegar a essa fase, ou seja, morriam na fase larval ou na fase de pré-pupa. Resultados semelhantes foram obtidos por CARVALHO (1998), que observaram que, em concentrações mais altas de pólen de barbatimão na dieta, a mortalidade ocorria somente na fase larval ou de pré-pupa. RODRIGUES (1982) também verificou que, em baixas concentrações de extrato aquoso de embrião-cotilédone de *S. obovatum* fornecido na dieta de *D. melanogaster*, havia efeito no tempo de desenvolvimento e diminuição no número de ímagos, mas, em dosagens mais altas, o desenvolvimento era interrompido na fase de pupa.

Usando a análise de próbite para a mortalidade de larvas (Figura 18) e a presença de pré-pupas com sintomas da doença (Figura 19), observou-se a elevação destas com o aumento da concentração de ácido tânico na dieta de operária oferecida às larvas, em que CL<sub>50</sub> para mortalidade de larvas e pré-pupas com sintomas foi de 0,012 e 0,07% de ácido tânico incluído na dieta de operária, respectivamente.

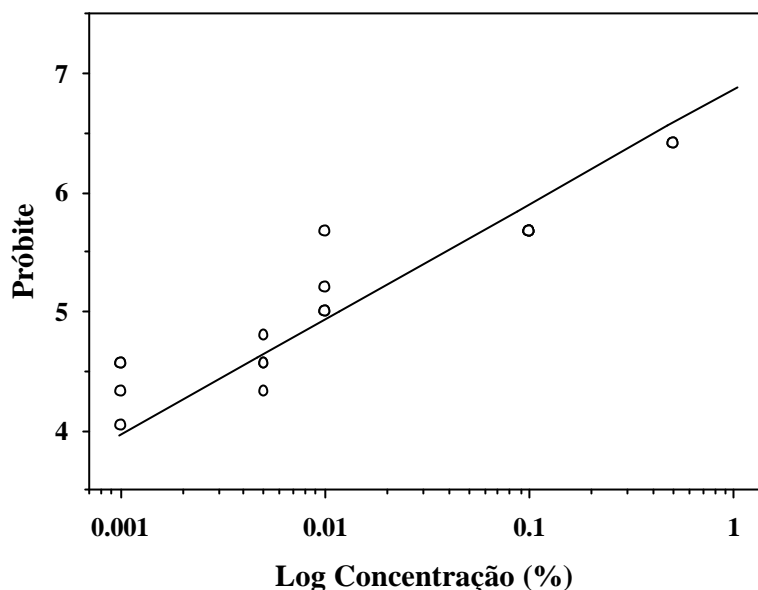


Figura 18 – Mortalidade de crias de *A. mellifera* em diferentes concentrações de ácido tânico. Os símbolos representam a média de quatro repetições. Análise de probite: inclinação ( $\pm$  EP) =  $6,61 \pm 0,16$ ;  $CL_{50}(IC\ 95\%) = 0,012$  (0,007 a 0,019);  $\alpha^2 = 1,01 \pm 0,03$ ;  $P = 0,0001$ ; e  $R^2 = 0,92$ .

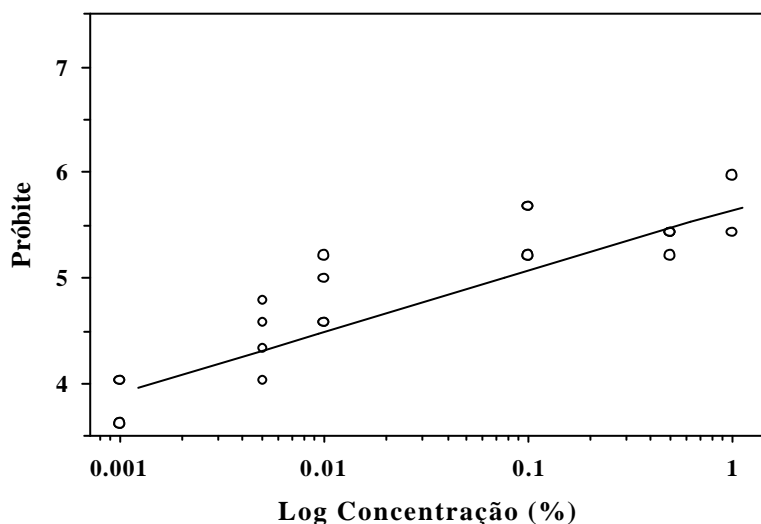


Figura 19 – Pré-pupas com sintomas de cria-ensacada brasileira em diferentes concentrações de ácido tânico. Os símbolos representam a média de quatro repetições. Análise de probite: inclinação ( $\pm$  EP) =  $2,11 \pm 0,71$ ;  $CL_{50}(IC\ 95\%) = 0,07$  (0,04 a 0,15);  $\alpha^2 = 0,74 \pm 0,02$ ;  $P = 0,0001$ ; e  $R^2 = 0,92$ .

Muitos estudos são realizados com ácido tânico em relação ao seu efeito tóxico em animais. Segundo SUSCHETET (1975), ao incluir ácido tânico na dieta de ratos, observou-se a redução na quantidade de vitamina A contida no fígado.

MERCER (1993), ao estudar o efeito da concentração do ácido tânico no desenvolvimento de *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae), concluiu que o aumento da concentração de ácido tânico reduz a velocidade do desenvolvimento larval, reduzindo também o número de adultos produzidos. Segundo YAN e BENNICK (1995), os taninos, quando estão presentes no alimento de vários animais, têm vários efeitos biológicos prejudiciais, incluindo-se a interferência no crescimento normal e no metabolismo.

GIBSON et al. (1995) observaram a eficácia de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* em combinação com ácido tânico retardando o desenvolvimento da larva de *Heliothis virescens*; em alguns casos, as larvas desenvolveram-se até o 2<sup>o</sup> ínstar.

BOURCHIER e NEALIS (1993) relataram o desenvolvimento rápido do 1<sup>o</sup> ao 3<sup>o</sup> ínstar e, a partir deste, um desenvolvimento lento de mariposas da família Lymantriidae, após a utilização de ácido tânico na dieta.

Segundo BERNAYS (1978) e HAGERMAN et al. (1992), a presença de tanino na dieta de herbívoros geralmente é considerada desvantajosa, pois possui a propriedade de precipitar proteínas, reduzindo, conseqüentemente, o valor nutritivo do alimento. BARBEHENN e MARTIN (1994) relataram que dois fatores podem ser importantes para determinar se um inseto será afetado quando ingerir taninos: (1) quando há permeabilidade das membranas do peritrófico para taninos ou transformação citotóxica de taninos e (2) as condições químicas no intestino médio que determinam o destino químico dos taninos ingeridos. Quando há penetração de taninos pela membrana peritrófica, estes causam danos no epitélio do intestino médio e eventual desenvolvimento de lesões (BERNAYS et al., 1980; BERNAYS, 1981).

A membrana peritrófica, porém, confere alguma proteção contra compostos químicos prejudiciais presentes no alimento dos insetos fitófagos, além de existirem diferenças de permeabilidade da membrana entre os insetos

(BARBEHENN e MARTIN, 1992, 1995). Por exemplo, a membrana de *Locusta* é permeável ao ácido tânico, causando-lhe lesões no epitélio do intestino e conduzindo, eventualmente, o inseto à morte. No entanto, a membrana de *Schistocerca* é impermeável a ácido tânico presente em plantas de que este inseto freqüentemente se alimenta (BERNAYS, 1981).

Com isso, os resultados obtidos com o uso de ácido tânico no desenvolvimento de crias de *A. mellifera* (africanizadas), indicando a presença de sintomas típicos da doença cria-ensacada brasileira, evidenciaram que o pólen de *S. polyphyllum* contém taninos, e estas moléculas devem ser responsáveis pelo surgimento da doença. Apesar de não existir nenhum estudo relacionado com o mecanismo de ação dos taninos em crias de *Apis mellifera*, os resultados obtidos sobre a ação desses tipos de compostos sobre as proteínas indicaram que dois mecanismos de ação em abelhas poderiam ser investigados. Um deles poderia estar relacionado com o efeito sobre as enzimas digestivas, verificado por GOLDSTEIN e SWAIN (1965) e BERENBAUM (1983), ou mesmo sobre a absorção das proteínas digeridas no intestino, pois BERNAYS et al. (1980) relataram que os taninos produzem efeitos, principalmente, na digestibilidade de alimento por precipitação de proteína e enzimas digestivas. Segundo CHAPMAN (1998), desbalanço de nutrientes no alimento pode afetar o crescimento, a muda e a forma do corpo dos insetos, e, de acordo com CAMARGO (1972) e SANFORD (1996), as proteínas são nutrientes essenciais para o desenvolvimento das larvas de abelhas, sem as quais estas não se desenvolvem suficientemente para atingir a fase adulta. O segundo mecanismo estaria relacionado com a ação dos taninos sobre as proteases responsáveis pela muda, inibindo-as.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Dentre as doenças de crias de *Apis mellifera* que ocorrem no Brasil, a cria-ensacada causa maiores prejuízos aos apicultores. Normalmente, essa doença é causada por vírus, no entanto, no Brasil, descobriu-se que o agente causador é o pólen de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*), e a doença passou a ser denominada cria-ensacada brasileira (CEB).

Foram feitas coletas de pólen e inflorescência de barbatimão, os quais foram submetidos a extrações sucessivas com solvente hexano e, posteriormente, com etanol em aparelho Soxhlet, sendo, em seguida, o extrato concentrado pressão reduzida em evaporador rotatório.

Foram realizados ensaios biológicos com os quatro extratos obtidos, tendo sido verificado que os tratamentos com os extratos etanólicos na dieta de operária promoviam o aparecimento de sintoma característico da doença cria-ensacada brasileira mesmo em baixas concentrações, não ocorrendo o mesmo nos tratamentos em que era oferecida a dieta de operária mais o extrato hexânico.

Por apresentar efeito tóxico às larvas de abelhas, os extratos etanólicos do pólen e da inflorescência foram submetidos a uma análise preliminar por cromatografia de camada delgada (CCD), a fim de investigar a sua complexidade e selecionar o sistema de solventes a serem utilizados para o seu fracionamento por cromatografia de coluna (CC). Contudo, não foi possível fracionar o extrato etanólico da inflorescência, pois nenhum ponto foi visualizado na cromatografia de

camada delgada, não ocorrendo o mesmo com o extrato etanólico do pólen, no qual se observaram, além de alguns pontos bem evidentes, pontuações contíguas formando um rastro característico de compostos poliméricos. Com isso e pelo fato de o gênero *Stryphnodendron* ser bastante rico em tanino, foi realizada uma análise para confirmação e determinação do teor de tanino no pólen e na inflorescência através dos extratos etanólicos desse gênero.

Através do método para determinação de tanino, foi possível verificar a presença deste composto tanto no extrato etanólico do pólen quanto da inflorescência de *S. polyphyllum*, pela visualização da coloração azul-escura, obtendo-se um teor de tanino de 7,91% no pólen e 21,43% na inflorescência.

Após a determinação de taninos, passou-se a fracionar o extrato etanólico do pólen, do qual foram obtidas três frações: PE(1) 1-21, PE(1) 22-222 e PE(1) 223-269, cada uma com 0,77 g; 8,45 g; e 0,07 g, respectivamente.

Após análise em CCD, a fração PE(1) 1-21 foi fracionada novamente, e na fração PE(2) 21-123, obtida através de análise de espectro no infravermelho, pôde-se concluir que essa fração era formada por ácidos graxos. Ensaio biológico dessa fração mostrou-se negativo, ou seja, os seus constituintes químicos não levavam ao aparecimento dos sintomas da doença nas crias de *Apis mellifera* (africanizadas) quando adicionados à dieta fornecida a partir do terceiro dia de alimentação da larva em condições de laboratório.

A partir da fração PE(1) 22-222, obteve-se a fração PE(3) 1-126, a qual, por análise em CCD, mostrou ser pelo  $R_f$ , possivelmente frutose ou galactose. Analisando o espectro no infravermelho de padrões de diferentes tipos de monossacarídeos, tornou-se bem evidente tratar-se de frutose. Ensaio biológico realizado com essa fração também foram negativos.

Em relação à fração PE(1) 223-269, não foi possível achar um sistema de solvente para fracioná-la, sendo apenas realizado ensaio biológico nela. Verificou-se a presença de pré-pupas com sintomas da doença no tratamento em que era oferecido às crias dieta de operária mais 0,07% da fração PE(1) 223-269, porém a média foi bem menor do que a encontrada nos tratamentos em que se acrescentava a essa dieta a mesma percentagem de extrato etanólico.

Como o gênero *Stryphnodendron* apresenta espécies produtoras de grandes quantidades de taninos, realizaram-se ensaios biológicos com ácido tânico, com o objetivo de verificar se este tanino levaria ao aparecimento de sintomas da cria-ensacada brasileira. Os resultados obtidos indicaram que, conforme aumentava a concentração de ácido tânico na dieta oferecida às larvas, conseqüentemente também aumentava a mortalidade destas e ficava evidente a presença de pré-pupas com sintoma da doença. No tratamento em que as larvas foram alimentadas com 1% de ácido tânico, nenhuma cria chegou à pupa.

Com os resultados obtidos, pôde-se concluir que o constituinte químico responsável pelos sintomas da cria-ensacada brasileira estava presente, predominantemente, na fração etanólica do pólen e da inflorescência, e, pela confirmação de taninos nessa fração, supôs-se que estes pudessem estar envolvidos no aparecimento da doença, sendo tal hipótese fortalecida pelos resultados positivos obtidos nos ensaios biológicos com ácido tânico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, E.R. O barbatimão. **Arquivo do Serviço Florestal**, v. 4, p. 101-117, 1950.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. Arlington: 1984. p. 187-188.
- BAILEY, L., GIBBS, A.J., WOODS, D. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). **Virology**, v. 23, p. 425-429, 1964.
- BAILEY, L. Honey bee pathology. **Annual Review of Entomology**, v. 13, p. 191-212, 1968.
- BAILEY, L. Strain of sacbrood virus from *Apis cerana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 264-265, 1982.
- BAILEY, L., BALL, B.V. **Honey bee pathology**. New York: Academic Press, 1991. 193p.
- BARBEHENN, R.V., MARTIN, M.M. The protective role of the peritrophic membrane in the tannin-tolerant larvae of *Orgyia leucostigma* (Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 38, p. 973-980, 1992.
- BARBEHENN, R.V., MARTIN, M.M. Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera) roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 8, p. 1985-2001, 1994.

- BARBEHENN, R.V., MARTIN, M.M. Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 303-311, 1995.
- BARKER, R.J., LEHNER, Y. Galactose, a sugar toxic to honey bees, found in exudate of tulip flowers. **Apidologie**, v. 7, p. 109-111, 1976.
- BARKER, R.J. Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. **Journal of Nutrition**, v. 107, n. 10, p. 1859-1862, 1977.
- BARRADAS, M.M., HANDRO, W. Algumas observações sobre a germinação da semente do barbatimão, *Stryphnodendron barbadetimam* (Vell.) Mart. (Leguminosae-Mimosoideade). **Boletim de Botânica**, v. 2, p. 139-150, 1974.
- BASTOS, E. M. A. F. Importância da caracterização dos grãos de pólen em produtos de origem apícola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11, 1996. Teresina, **Anais...** Teresina: 1996. p. 225-228.
- BASTOS, E. M. A. F. Grãos de pólen e estruturas secretoras de plantas como indicadores da origem botânica do mel e da própolis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12, 1998, Salvador. **Anais...** Salvador: 1998. p. 71-72.
- BATE-SMITH, E.C., METCALFE, C.R. The nature and distribution of tannins in dicotyledonous plants. **Journal of the Linnaean Society**, v. 55, p. 669-705, 1957.
- BERENBAUM, M. Effect of tannins on growth and digestion in two species of papilionids. **Entomologia Experimentales et Applicata**, v. 34, p. 245-250, 1983.
- BERNAYS, E.A. Tannins: an alternative viewpoint. **Entomologia Experimentales et Applicata**, v. 24, p. 44-53, 1978.
- BERNAYS, E.A., CHAMBERLAIN, D., McCARTHY, P. The differential effects of ingested tannic acid on different species of Acridoidea. **Entomologia Experimentales et Applicata**, v. 28, p. 158-166, 1980.
- BERNAYS, E.A. Plant tannins and insect herbivores: an appraisal. **Ecological Entomology**, v. 6, p. 353-360, 1981.
- BERNAYS, E.A. A specialized region of the gastric caeca in the locust, *Schistocerca gregaria*. **Physiological Entomology**, v. 6, p. 1-6, 1981.

- BOUGHDAD, A., GILLON, Y., GAGNEPAIN, C. Influence des tanins condensés du tégument de fèves (*Vicia faba*) sur le développement larvaire de *Callosobruchus maculatus*. **Entomologia Experimentales et Applicata**, v.42, p. 125-132, 1986.
- BOURCHIER, R.S., NEALIS, V.G.N. Development and growth of early- and late-instar gyp moth (Lepidoptera: Lymantriidae) feeding on tannin-supplemented diets. **Environmental Entomology**, v. 22, n. 3, p. 642-646, 1993.
- CAMARGO, J.M.F. **Manual de apicultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1972. 252p.
- CARVALHO, A. C. P. **Efeito do pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* na doença Cria ensacada Brasileira em *Apis mellifera* L. 1758 (Africanizadas) (Hymenoptera: Apidae)**. Viçosa: UFV, 1998. 48p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CARVALHO, A. C. P., MESSAGE, D. Teste da infectividade de extrato de abelhas doentes com sintomas da Cria ensacada originados do Brasil e da Inglaterra. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16, 1997, Salvador. **Anais...** Salvador: 1997. p. 360.
- CASEY, M., LEONARD, J., LYGO, B., PROCTER, G. **Advanced practical organic chemistry**. New York: Chapman & Hall, 1990. 264p
- CASTRO, H.G. **Caracterização isozimática, crescimento e rendimento de tanino em seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.)**. Viçosa: UFV, 1998. 114p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CHAPMAN, R.F. **The insects, structure and function**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770p.
- CHUNG, K.-T., WONG, T.Y., WEI, C.-I, HUANG, Y.-W. Tannins and human health: a review. **Critical Review in Food Science Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. v. 1. 747 p.
- D'MELLO, J.P.F., DUFFUS, C.M., DUFFUS, J.H. **Toxic substances in crop plants**. Royal Society of Chemistry, 1991. 339p.
- FEENY, P. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. **Ecology**, v. 51, n.4, p. 565-581, 1970.

- FREE, J.B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo: EDUSP, 1980. 78p.
- GEMTCHUJNICOV, I.V. **Manual de taxonomia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 368p.
- GIBSON, D.M., GRENSPAN-GALLO, L., KRASNOFF, S.B., KETCHUM, R.E.B. Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 2, p. 270-277, 1995.
- GOLDSTEIN, J.L., SWAIN, T. The inhibition of enzymes by tannins. **Phytochemistry**, v. 4, p. 185-192, 1965.
- GRANT, V. The flower constancy of bees. **Botanical Review**, v. 16, n. 17, p. 379-398, 1950.
- GRIFFITHS, D.W. Condensed tannins. In: D'MELLO, J.P.F., DUFFUS, C.M., DUFFUS, J.H. **Toxic substances in crop plants**. Royal Society of Chemistry, 1991, p. 180-201.
- GUERRA, M. O., ARAÚJO, F. C., CERQUEIRA, E., GONÇALVES, M. A. & PETERS, V. M. Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.): perspectiva de um biocida para ratos. **Ciência e Cultura**, v. 34, n. 4, p. 510-512, 1982.
- HAGERMAN, A.E., ROBBINS, C.T., WEERASURIYA, Y., WILSON, T.C., MCARTHUR, C. Tannin chemistry in relation to digestion. **Journal of Range Management**, v. 45, n. 1, p. 57-62, 1992.
- HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. New York: Academic Press, 1988. 356p.
- HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins**. London: Academic Press, 1966.
- IKAN, R. **Natural products a laboratoty guide**. London, 1991. 360p.
- KAROWE, D.N. Differential effect of tannic acid on two tree-feeding Lepidoptera: implications for theories of plant anti-herbivore chemistry. **Oecologia**, v. 80, p. 507-512, 1989.
- KEESE, R., MILLER, R.K., TOUBE, T.P. **Fundamentals of preparative organic chemistry**. London: John Willey & Sons, 1988. 149p.

- LIMA, J.C.S., MARTINS, D.T.O., SOUZA JUNIOR, P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 218-220, 1998.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- MARTIN, M.M., ROCKHOLM, D.C., MARTIN, J.S. Effects of surfactants, pH, and certain cations on precipitation of proteins by tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 11, n. 4, p. 485-493, 1985.
- MESSAGE, D. Como detectar doenças de abelhas na colônia e enviar amostras para o diagnóstico em laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1992, Candelária. **Anais...** Candelária, 1992. p. 91-96.
- MESSAGE, D., BALL, B.V., SILVA, I.C. A Serious brood disease affecting africanized honeybees (*Apis mellifera*). In: APIMONDIA CONGRESS, 34, 1995, Lausanne. **Proceedings...** Lausanne: Apimondia, 1995. 203p.
- MESSAGE, D., SILVA, I.C., BALL, B.V. Estudo epidemiológico de uma doença semelhante a Cria ensacada na região de Altinópolis/SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1996, Teresina. **Anais...** Teresina: 1996.
- MESSAGE, D. **Management and disease problems of africanised bees in Brazil**. Parkstone: The Central Association of Bee-Keepers, 1997. 15p.
- MERCER, D.R. Effect of tannic acid concentration on development of the western treehole mosquito, *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 6, p. 1119-1127, 1993.
- MORI, F.A. **Uso de taninos da casca de *Eucalyptus grandis* para produção de adesivos**. Viçosa: UFV, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MORS, W.B., RIZZINI, C.T. **Useful plants of Brasil**. São Francisco: Holden-Day, 1966. 166p.
- OCCHIONI MARTINS, E. M. Distribuição geográfica do gênero *Stryphnodendron* com descrição de nova espécie (Leg., Mim.). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, n. 4, p. 729-732, 1980.
- OCCHIONI MARTINS, E. M. ***Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae Mimosoideae) com especial referência aos taxa Amazônicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1981. 143p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1981.

- PALAZZO-DE-MELLO, J.C., PETEREIT, F., NAHRSTEDT, A. Monomeric flavan-3-ols from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*. **Planta Medica**, v. 59, p. A607, 1993.
- PALAZZO-DE-MELLO, J.C., PETEREIT, F., NAHRSTEDT, A. Havan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996.
- PANIZZA, S., ROCHA, A.B., GECCHI, R., SOUZA-SILVA, R.A.P. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 10, p. 101-106, 1988.
- PEREIRA, C.A., PESSOA, J.M., SANTOS, H.L. Experimental intoxication by *Stryphnodendron barbatiman* Mart. in cattle. I. Clinical signs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 41, p. 389-403, 1989a.
- PEREIRA, C.A., SANTOS, H.L., PESSOA, J.M. Experimental intoxication by *Stryphnodendron barbatiman* Mart. in cattle. II. Anatomico-histopathologic aspects. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 41, p. 405-413, 1989b.
- PEREIRA, C.A., SANTOS, H.L., PESSOA, J.M. Experimental intoxication by *Stryphnodendron barbatiman* Mart. in cattle. III. Laboratorial data. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 41, p. 415-432, 1989c.
- PIZZI, A. **Wood adhesives: chemistry and technology**. New York: Marcell Dekker, 1983. 364p.
- POTT, A., POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 320p.
- POZO, L.A. **Estudo “in vitro” do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais sobre *Clostridium difficile***. Viçosa: UFV, 1997. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- RESENDE, S. J. Nutrição mineral do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (Mart) Coville. **Seiva**, v. 76, p. 23-33, 1971.
- RIZZINI, C.T., MORS, W.B. 1976. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EDUSP, 1976. 229p.
- RODRIGUES, F. R. Efeito do extrato aquoso de embrião-cotilédone de *Stryphnodendron obovatum* Benth no ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. **Ciência e Cultura**, v. 34, n. 7, p. 906-908, 1982.

- ROSENTHAL, G.A. The protective action of a higher plant toxic product. **BioScience**. v. 38, n. 2, p. 104-109, 1988.
- SANFORD, M.T. Protein Management: The other side of the nutritional coin in apiculture. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11, 1996. Teresina. **Anais...** Teresina: 1996. p. 51-57.
- SANTOS, J. J., MESSAGE, D. Utilização de mini-recrias para produção de geleia real. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1984, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 1984. p. 307-311.
- SHIMADA, A.N. **Avaliação dos taninos da casca de *Eucalyptus grandis* como preservativo de madeira.** Viçosa: UFV, 1998. 114p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- SHIMANUKI, H., KNOX, D. **Diagnosis of honey bee diseases.** Washington: Department of Agriculture, 1991. 53p. (Handbook, AH-690).
- SILVA, I. C. **Avaliação de dietas para criação de operárias e zangões de *Apis mellifera* L. (Africanizadas) (Hymenoptera: Apidae) em condições de laboratório.** Viçosa: UFV, 1995. 85p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- STEINLY, B.A., BERENBAUM, M. Histopathological effects of tannins on the midgut epithelium of *Papilio polyxenes* and *Papilio glaucus*. **Entomologia Experimentales et Applicata**, v. 39, p. 3-9, 1985.
- SUSCHETET, M. Influence de l'acide tannique sur la teneur du foie en vitamine A chez le Rat soumis à un régime alimentaire équilibré ou privé de cette vitamine. **Comptes Rendus des Séances de la Societe de Biologie et de ses filiales**, v. 169, n. 4, p. 970-973, 1975.
- SWAIN, T. Tannins and lignins. In: ROSENTHAL, G.A., JANSEN, D.H. **Herbivores their interaction with secondary plant metabolites.** New York: Academic Press, 1979. p. 657-682.
- TEIXEIRA, M.L., SOARES, A.R., SCOLFORO, J.R.S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) em 10 locais de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, v. 14, n. 2, p. 229-232, 1990.
- TOKARNIA, C.H., PEIXOTO, P.V., GAVA, A., DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Stryphnodendron coriaceum* (leg. Mimosoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n. 1/2, p. 25-29, 1991.

- VANDENBERG, J.D., SHIMANUKI, H. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. **Journal of Apicultural Research**, v. 26, n. 2, p. 90-97, 1987.
- YAN, Q.Y., BENNICK, A. Identification of histatins as tannin-binding protein in human saliva. **Biochemical Journal**, v. 311, p. 341-347, 1995.
- ZUCKER, W.V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, v. 121, n. 3, p. 335-365, 1983.

## APÊNDICE

## APÊNDICE

1- Modo de preparo dos reagentes utilizados na análise do rendimento de tanino:

- a) Follin-Denis: foram adicionados, em 75 mL de água, 10 g de tungstato de sódio, 2 g de ácido fosfomolibdico e 5 mL de ácido fosfórico. A mistura foi refluxada por duas horas, e, após o resfriamento à temperatura ambiente, completou-se o volume para 100 mL.
- b) Solução saturada de carbonato de sódio: adicionaram-se 35 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro em 100 mL de água, dissolvidos a 70-80°C; deixou-se resfriar por toda a noite, sendo, então, a solução saturada com cristais de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.10 H<sub>2</sub>O filtrada.

2 - Equação de regressão da curva-padrão na determinação do teor de tanino:

$$\bar{y} = 0,00665 + 62,80233X$$
$$R^2 = 0,99$$

Quadro 1A – Quadro da análise de variância da mortalidade de larvas (ML), presença de pré-pupas com sintomas (PS) e sobrevivência (SB) de *Apis mellifera* (africanizadas) tratadas com dieta de operária e extratos de pólen

	F.V.	G.L.	SQ	QMR	F
ML	T	3	59,4571	19,8190	9,53*
	R	12	24,9497	2,0791	
PS	T	3	872,3229	290,7743	80,38*
	R	12	43,4098	3,6175	
SB	T	3	1.456,4820	485,4941	248,87*
	R	12	23,8890	1,9508	

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 2A – Quadro da análise de variância da mortalidade de larvas (ML), presença de pré-pupas com sintomas (PS), pupas malformadas (PMAL) e sobrevivência (SB) de *Apis mellifera* (africanizadas), tratadas com dieta de operária e extratos da inflorescência

	F.V.	G.L.	SQ	QMR	F
ML	T	3	76,7939	25,5980	13,47*
	R	12	22,7969	1,8997	
PS	T	3	868,8595	289,6198	84,22*
	R	12	41,2675	3,4390	
PMAL	T	3	26,8581	8,9527	14,11*
	R	12	7,6129	0,6344	
SB	T	3	1647,0730	549,0242	132,00*
	R	12	49,9099	4,1592	

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.