



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA-CCT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS-PPGEP



ALINE CARLA DE MEDEIROS

**Cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* em frutos de
algarobeira e sua aplicação como suplemento proteico em abelhas
africanizadas**

Campina Grande-PB
Janeiro de 2020

ALINE CARLA DE MEDEIROS

Cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* em frutos de algarobeira e sua aplicação como suplemento proteico em abelhas africanizadas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos-PPGEP, do Centro de Ciência e Tecnologia-CCT da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, campus Campina Grande, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Processos.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos
Orientadora: D. Sc. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Campina Grande-PB
Janeiro de 2020

M488c Medeiros, Aline Carla de.
Cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* em frutos de algarobeira e sua aplicação como suplemento proteico em abelhas africanizadas / Aline Carla de Medeiros. – Campina Grande, 2022.
77 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia, 2020.

"Orientação: Prof.^a Dr.^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira".
Referências.

1. Processos Biotecnológicos. 2. Algaroba. 3. Suplementação Apícola. 4. Cultivomicrobiano. I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado. II. Título.

CDU 6633.875:638.1(043)

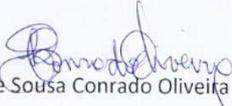
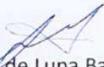
ALINE CARLA DE MEDEIROS

Cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* em frutos de algarobeira e sua aplicação como suplemento proteico em abelhas africanizadas

Aprovada em: 07 de fevereiro de 2020.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE ALINE CARLA DE MEDEIROS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE.

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA EM 07 DE FEVEREIRO DE 2020

BANCA EXAMINADORA	PARECER
 Líbia de Sousa Conrado Oliveira (UFCG - Orientadora)	<u>APROVADA</u>
 Patrício Borges Maracajá (UFCG - Examinador Externo)	<u>APROVADA</u>
Tiago Augusto Lima Cardoso (UFCG - Examinador Externo)	<u>APROVADA</u>
 Jacinto de Luna Batista (UFPB - Examinador Externo)	<u>APROVADA</u>
 Sharline Florentino de Melo Santos (UFPB - Examinadora Externa)	<u>APROVADA</u>

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA
FEVEREIRO/2020

*Dedico este trabalho ao meu orientador Patrício Borges
Maracajá, em reconhecimento pela sua dedicação à
docência e por cuidar dos seus alunos como se fossem
filhos e usar os ensinamentos do maior mestre da
humanidade, Jesus Cristo.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus pela sua incondicional capacidade criadora de todas as coisas do universo.

Aos meus pais por toda educação concedida, amor e respeito durante toda a minha vida e no meu percurso acadêmico.

Ao meu mestre, Professor Patrício Borges Maracajá, por inspirar seus alunos na pesquisa e sabiamente prepará-los para exercer a docência e a pesquisa, respeitando o ser humano nos princípios do cristianismo, do respeito e da igualdade.

A Alci de Sousa Conrado (*in memoriam*), pelos ensinamentos e incentivos e estímulo para que eu trilhasse a vida acadêmica.

A minha orientadora Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pelos ensinamentos, paciência, compromisso, sensatez e dedicação a pesquisa.

A toda minha família, a meu esposo Francisco (Chicota), Mallú, meus irmãos e sobrinhos pelo amor, apoio e compreensão da minha ausência durante todo o curso.

Ao meu querido amigo César Carlos Martins da Silva, pelo valioso apoio na execução das etapas de análises de laboratório do trabalho.

A todos os professores e técnicos da Universidade Federal de Campina Grande, *campi* Campina Grande e Pombal, pela disponibilidade e compromisso em suas atividades direcionadas ao ensino e a pesquisa.

Aos técnicos e professores do Instituto Federal da Paraíba campus Sousa, por colaborar com seus espaços para execução de procedimentos necessários da pesquisa.

A todos que fazem o Centro Vocacional Tecnológico (Pombal), por proporcionar um espaço de aprendizado e apoiar tecnologias que fortalecem o ensino, a pesquisa e a extensão.

A todos os meus colegas de trabalho, especialmente os professores, que torcem e valorizam minhas atividades acadêmicas.

Especialmente a banca examinadora, que minuciosamente e de forma profissional contribuíram para que este trabalho resultasse em uma pesquisa útil para os apicultores.

Enfim, a todos os amigos que colaboraram direta ou indiretamente apoiando e promovendo momentos de discussão e aprendizado.

Muitíssimo Obrigada!

“Se as abelhas desaparecerem da face da Terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais, não haverá raça humana.”

Albert Einstein.

MEDEIROS, A.C. **Cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* em frutos de algarobeira e sua aplicação como suplemento proteico em abelhas africanizadas**. 2020. 84f.UFCG. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande-PB, 2020.

RESUMO

Este trabalho objetiva produzir um suplemento nutricional proteico elaborado a partir do cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* em substrato de farinha de vagens de algaroba e aplicar como alimento suplementar em colônias de abelhas africanizadas no período de entressafra. As vagens de algaroba foram coletadas na zona rural de Pombal-Paraíba, passaram por etapas de sanitização, trituração em máquina forrageira para produção da farinha e posteriormente foram armazenadas. Foram realizadas avaliações físico-químicas e de atividade de água e na sequência se realizou o cultivo microbiano, onde se estabeleceu como variáveis de entrada a concentração de leveduras (1%, 3% e 5%) e umidade inicial do substrato (60%, 70% e 80%) e variáveis resposta (ganho proteico). As unidades experimentais foram incubadas em BOD com temperatura de 30°C. Realizou-se o acompanhamento cinético do cultivo, onde se coletou amostras em intervalos estabelecidos para mensuração de açúcares redutores, percentual proteico, pH e umidade. Dentre as unidades do experimento, a condição que proporcionou as melhores condições de ganho proteico foi o ensaio 2, com as variáveis -1/+1, tendo um ganho proteico 1,94 vezes (94,72%), em 11 horas de cultivo microbiano. Após a elaboração do suplemento nutricional proteico, o produto foi aplicado na alimentação de abelhas africanizadas em laboratório. Realizou-se um teste de atratividade com essências florais, os insetos foram postos no centro de uma arena (22 x 10 cm de diâmetro), com conexões para recipientes de plástico (6 x 5 cm) contendo 5g gramas do suplemento, produzido a partir de 80 gramas do suplemento apícola + 20 gramas de açúcar + 5 gotas de diferentes essências para cada extremidade da arena. A essência de limão se destacou sendo considerada de alta atratividade, associada ao suplemento, com um índice de preferência entre 0,0 e 1,00. Na sequência, se realizou a avaliação de toxicidade. As abelhas foram confinadas em caixas de madeira a uma temperatura de 30°C e alimentadas com o suplemento fracionado (com associação de açúcar) em 25%, 50%, 75% e a testemunha alimentada com pasta candi. A avaliação da toxicidade foi feita avaliando o tempo de sobrevivência do inseto em cada unidade experimental. Todos os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p=0,1973^{ns}$), as abelhas apresentaram um tempo médio de sobrevivência de 25 dias. Em campo, o suplemento foi aplicado e comparado com outro suplemento a base de extrato de soja e colmeias alimentadas com alimento energético, xarope de açúcar. Ambos os suplementos proteicos foram ajustados para um percentual de aproximadamente 22% de proteínas e o suplemento proteico a base de farinha de vagens de algaroba apresentou um valor médio de desenvolvimento de área de cria de 370,8 cm², seguido das colônias alimentadas com suplemento a base de soja, 307,6 cm². O grupo controle apresentou valores inferiores, 246,8 cm². O suplemento nutricional proteico a base de algaroba e proteína microbiana foi eficiente para garantir a dinâmica de funcionamento das colmeias de abelhas africanizadas no período de escassez de florada no campo, colaborando para a manutenção dos enxames no período de estiagem.

Palavras-chave: Processos biotecnológicos. Algaroba. Suplementação apícola. Cultivomicrobiano.

MEDEIROS, A.C. **Microbial cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in algarobeira fruits and its application as a protein supplement in Africanized bees.** 2020. 84f.UFCG. Doctoral thesis (Doctoral in Process Engineering). Federal University of Campina Grande (UFCG), Campina Grande-PB, 2020.

ABSTRACT

This work aims to produce a nutritional protein supplement made from the microbial culture of *Saccharomyces cerevisiae* in typical tree fruits entitled mesquite, for that we regard pod flour substrate and apply as a supplementary food in colonies of Africanized bees in the between harvests. The mesquite pods were collected at the rural area from Pombal-Paraíba, which had been through some stages of sanitization, grinding in a forage machine for flour production and were later stored. Physicochemical and water activity evaluations were carried out and then the microbial culture was proceeded, where the yeast concentration (1%, 3% and 5%) and initial substrate moisture (60%, 70% and 80%) and response variables (protein enhancement). The experimental units were incubated in BOD at 30°C. The kinetic monitoring of the cultivation was carried out, where the samples were collected at established time intervals to measure reducing sugars, protein percentage, pH and moisture. Among the experimental units, the condition that provided the best protein gain conditions was with the assay 2, regarding the variables -1/+1, obtaining a protein gain 1.94 times (94.72%) in 11 hours of cultivation. After the elaboration of the protein nutritional supplement, the product was applied in the feeding of Africanized bees in the laboratory. An attractiveness test was carried out with flower essences, the insects were placed in the center of an arena (22 x 10 cm in diameter), with connections for plastic containers (6 x 5 cm) containing 5g grams of the supplement, produced from of 80 grams of the beekeeping supplement + 20 grams of sugar + 5 drops of different essences for each corner of the arena. The lemon essence stood out being considered the most attractive, associated with the supplement, with a higher preference between 0.0 and 1.00. Subsequently, the toxicity assessment was performed. The bees were confined in wooden boxes at a temperature of 30°C and fed with the fractionated supplement (with sugar association) in 25%, 50%, 75% and the control fed with Candi paste. The Toxicity assessment was performed by evaluating the insect survival time in each experimental unit. All treatments showed no significant difference ($p=0.1973$ ns), the bees had an approximately survival time of 25 days. At the field, the supplement was applied and compared with another supplement based on soy extract and beehive fed with energy food, sugar syrup. Both protein supplements were adjusted to a percentage of approximately 22% of protein and the protein supplement based on mesquite pod meal presented an average value of brood area development of 370.8 cm², followed by colonies fed with a supplement to soy base, 307.6 cm². The control group showed lower values, 246.8 cm². The nutritional protein supplement based on mesquite and microbial protein was efficient to guarantee the dynamics of functioning of the beehive africanized bees in the period of non flowering in the field, collaborating for the maintenance of the swarms in the not raining season.

Keywords: Biotechnological processes. Algaroba. Beekeeping Supplementation. Microbial Cultivation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapas do desenvolvimento de abelhas <i>Apis mellifera</i>	19
Figura 2: <i>Morfologia da levedura Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 3: Aspectos da frutificação da algaroba (a)/ (b) e inflorescência (c)/(d); Pombal, PB, 2018.....	28
Figura 4- Seleção das vargens de algaroba para a produção da farinha.	30
Figura 5 -Etapa de peneiramento da farinha de algaroba para o cultivo microbiano.....	31
Figura 6: Preparo das amostras para determinação de açúcares redutores-AR em farinha de algaroba.	33
Figura 7: Cápsulas de alumínio utilizadas para acondicionamento da farinha de algaroba e para realização das leituras de A_w	36
Figura 8: Sistema utilizado para execução da análise de adsorção da farinha de algaroba	36
Figura 9: Levedura seca instantânea Saf-instant- Lesaffre.....	37
Figura 10: Bandeja utilizada para o cultivo microbiano (a) e disposição das unidades experimentais em estufa (b).	38
Figura 11- Modelo de arena utilizada para realização dos testes de atratividade com essências na alimentação de abelhas operárias.	40
Figura 12: Suplemento proteico apícola produzido a partir do cultivo microbiano de leveduras <i>S. cerevisiae</i> farinha de vargens de algaroba.	41
Figura 13- Gaiola utilizada como unidade experimental nos tratamentos de toxicidade de abelhas. Pombal, 2019.	42
Figura 14: Apiário Maracajá(a), (b)localizado no município de Condado-PB.....	43
Figura 15. (a) pasta de soja, extrato de milho e arroz, (b) pasta de vargens de algaroba enriquecidos com proteína microbiana e (c) pasta candi (associação de açúcar e mel)	44
Figura 16- Produção do suplemento nutricional proteico (a); preparação do suplemento nutricional proteico utilizando papel manteiga(b) e disposição do alimento sobre os quadros de cria(c)	44
Figura 17- Suporte utilizado para mensurar área de cria em colmeias Langstrot povoadas com abelhas <i>Apis mellifera</i> , Pombal-2018	44
Figura 18: Isoterma de adsorção de farinha de algaroba a 30°C.....	47
Figura 19. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vargens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaios realizados na umidade inicial de 80% e concentração de levedura de 1%.....	49

Figura 20. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vagens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaio realizado na umidade inicial de 60% e concentração de levedura de 1%.....	51
Figura 21. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vagens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaio realizado na umidade inicial de 60% e concentração de levedura de 5%.....	51
Figura 22. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vagens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaio realizado na umidade inicial de 80% e concentração de levedura de 5%.....	52
Figura 23. Acompanhamento da cinética de crescimento microbiano na farinha da vargem de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaio realizado na umidade inicial de 70% e concentração de levedura de 3% (a), (b) e (c).	53
Figura 24. Influência dos fatores U e CL no ganho proteico.	55
Figura 25. Influência das variáveis de entrada, concentração inicial de leveduras e umidade do substrato sobre o ganho proteico de farinha de vagens de algaroba.....	55
Figura 26. Resultado do índice de atratividade de essências na alimentação de abelhas após 30min	56
Figura 27. Comparação pelo Log-rank test para todos os tratamentos de toxicidade de abelhas alimentadas com o suplemento a base de algaroba.	58
Figura 28. Desempenho de colônias de abelhas africanizadas alimentadas com T1-suplemento de soja; T2-suplemento de algaroba e T3-xarope de açúcar.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Matriz do planejamento experimental, fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais.....	39
Tabela 2- Variáveis descritas a partir da matriz do planejamento experimental.....	39
Tabela 3- Descrição das formulações da suplementação apícola.....	43
Tabela 4 – Características físico-químicas e química da farinha de algaroba	45
Tabela 5- Dados do ajuste da isoterma de dessecção da farinha de algaroba	47
Tabela 6. Planejamento experimental: Influência dos fatores umidade(U) e concentração de leveduras (CL) no ganho proteico (GP)	48
Tabela 7- Análise de variância para aumento proteico (ANOVA)	54
Tabela 8. Dados obtidos através da comparação das médias	58
Tabela 9: Dados referentes aos percentuais de proteína nos suplementos apícola	59
Tabela 10- Análises de variância para o efeito do tipo de alimentação (suplemento)sobre a área de cria aberta e fechada em 30 colmeias de abelhas	59
Tabela 11. Comparação múltipla utilizando o teste de Tukey para o efeito do tipo de alimentação sobre a área de cria aberta e fechada em 30 colmeias de abelhas.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 APICULTURA	17
3.2 ONTOGENIA E NUTRIÇÃO DE ABELHAS AFRICANIZADAS	18
3.3 DIETAS SUPLEMENTARES DE ABELHAS AFRICANIZADAS.....	21
3.4 CULTIVO MICROBIANO E A SÍNTESE DE BIOMASSA PROTEICA	23
3.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E NUTRICIONAIS DAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.6 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E NUTRICIONAIS DA ALGAROBA	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 LOCAL DA PESQUISA	30
4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA	30
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DE ALGAROBA	31
4.3.1 Teor de Água.....	31
4.3.2 Cinzas	31
4.3.3 pH.....	32
4.3.4 Quantificação de Proteínas.....	32
4.3.5 Açúcares Redutores (AR)	33
4.3.6 Determinação de Fibra Bruta	34
4.3.7 Determinação de lipídios	34
4.3.8 Carboidratos Totais e Valor Calórico	35
4.4 ATIVIDADE DE ÁGUA E ISOTERMA DE DESSORÇÃO DA FARINHA DE ALGAROBA	35
4.5 MODELO MATEMÁTICO PARA AJUSTE DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO ...	37
4.6 PREPARO DO INÓCULO E ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	37
4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.8 ELABORAÇÃO DO SUPLEMENTO APÍCOLA.....	39

4.9	TESTE DE ATRATIVIDADE	40
4.10	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO SUPLEMENTO APÍCOLA EM CONDIÇÕES CONTROLADAS	41
4.11	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NUTRICIONAL DAS ABELHAS ALIMENTADAS COM O SUPLEMENTO PROTEICO EM CAMPO	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DE ALGAROBA	45
5.2	ATIVIDADE DE ÁGUA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO	46
5.3	CULTIVO MICROBIANO- CINÉTICA MICROBIANA	48
5.4	RESULTADOS DOS TESTES DE ATRATIVIDADE COM ESSÊNCIAS FLORAIS	56
5.6	RESPOSTA DO DESEMPENHO NUTRICIONAL DAS ABELHAS ALIMENTADAS COM O SUPLEMENTO PROTEICO.....	59
6	CONCLUSÕES.....	63
7	SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS	63
8	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A apicultura é uma atividade de grande importância social, econômica e ecológica. Além dos produtos explorados diretamente da colônia, a polinização realizada pelas abelhas é fundamental para a produção de alimentos (MORSE; CALDERONE, 2000). O desempenho dessa atividade depende entre alguns fatores de uma alimentação equilibrada. As abelhas dependem exclusivamente de recursos vegetais, nos quais utilizam o néctar floral e o pólen para metabolizar os glicídios, lipídios, vitaminas, sais minerais e proteínas.

Em algumas regiões do planeta, em virtude dos aspectos geográficos e ambientais, os recursos vegetais podem ser reduzidos, dificultando o desempenho da criação de abelhas o que induz a oferta de alimentos suplementares para garantir a permanência e a sobrevivência dos enxames.

O pólen é consumido principalmente pelas abelhas nutrizes, uma consequência direta da deficiência nutricional (escassez de pólen) é uma diminuição na população de colônias (KELLER et al., 2005) e provavelmente uma saúde deficiente dos indivíduos, o que também pode afetar o limiar de resistência das abelhas a outros estresses (patógenos ou pesticidas) (NAUG, 2009; LE CONTE et al., 2011; DI PASQUALE et al., 2013).

Segundo Morais et al., (2013), a partir do estudo de diversos pesquisadores, o fornecimento de dietas suplementares de subsistência é uma maneira segura de fornecer proteínas as abelhas. Além disso, o pólen coletado pelas abelhas tende a ser caro e de oferta limitada. Consequentemente, os apicultores geralmente fornecem dietas substitutas de pólen para as colônias, embora sejam frequentemente formuladas sem considerar os custos dos componentes da dieta versus os benefícios de fornecer tais dietas (Herbert et al., 1977; Li et al., 2012; Morais et al., 2014).

As abelhas geralmente consomem pólen após a fermentação, na forma de pão de abelha (GILLIAM, 1997; BRODSCHNEIDER E CRAILSHEIM, 2010). As proteínas são responsáveis por 66-74% da matéria seca de operárias adultas (HRASSING E CRAILSHEIM, 2005). Esse conteúdo de proteína aumenta durante os primeiros dias devido ao anabolismo das proteínas e diminui com a idade das operárias (CRAILSHEIM, 1986).

No semiárido brasileiro, a criação de abelhas é notavelmente afetada pela escassez de alimentos, devido aos aspectos climáticos da região. Nos anos em que a precipitação pluviométrica se situa em torno ou acima da média, o Nordeste responde por cerca de 40% da produção brasileira de mel. Porém, a exemplo da maioria das atividades agropecuárias, a

apicultura é susceptível a fatores climáticos adversos. Em 2012 o clima no Nordeste brasileiro foi seco, variando entre os meses de moderado a extremamente seco, a florada foi insuficiente o que provocou elevada queda de produção em todas as áreas produtoras de mel. Ocorreu também elevada perda de enxames por abandono das colmeias devido à altas temperaturas aliadas à falta de sombreamento e manejo alimentar inadequado (VIDAL, 2013).

A fome é um dos grandes problemas enfrentados na criação racional de abelhas. A falta de alimento interfere na fisiologia do inseto, diminui sua capacidade de produção e sua longevidade, além de comprometer sua imunologia expondo o inseto a ataques de patógenos e parasitas.

Diante desta problemática, este estudo propõe o desenvolvimento e aplicação de suplemento nutricional proteico, elaborado a partir do cultivo microbiano de *S.cerevisiae*. Esta tecnologia permite a produção de biomassa proteica usando produtos agrícolas como suporte nutricional para o crescimento do microrganismo.

A algaroba é uma leguminosa encontrada de forma ampla em diversas regiões do planeta e o valor nutricional de suas vagens torna sua aplicação viável na alimentação animal em sua forma *in natura*. No entanto a sua utilização como substrato para o cultivo microbiano e sua aplicação na alimentação de abelhas ainda não foi reportada na literatura. O cultivo microbiano utilizando *S. cerevisiae*, foi utilizado em dietas animais, tendo como substratos resíduos de frutas e outros produtos vegetais, Campos et al., (2005) desenvolveram cultivo de *S. cerevisiae*, utilizando como substrato a palma forrageira e sugeriram o uso para alimentação animal. Vendruscolo et al., (2009) utilizaram o resíduo de maçã com o mesmo processo visando a alimentação de alevinos, Muniz (2017) utilizou o cultivo microbiano em resíduos de caju e goiaba para produção de barras de cereais. Essa tecnologia resulta no ganho proteico a partir da reprodução microbiana, favorecendo a ampliação na produção de proteínas alternativas para animais, especificamente para abelhas.

O cultivo microbiano, geralmente descrito como proteína de única célula ou (Single Cell Protein-SCP), caracterizado por Ravindra et al. (2000) como biomassa de microrganismo ou extrato proteico derivado de algas microscópicas, leveduras, fungos ou culturas bacterianas, que podem ser usados na nutrição animal e humana, através da aplicação de condições controladas e otimizadas como nível de temperatura e disponibilidade de água. Dentre estes fatores, as condições aplicadas ao cultivo microbiano garantem o pleno desenvolvimento do microrganismo, resultando em ganho proteico considerável para sua aplicação. A proposta de produção de um suplemento nutricional proteico busca a obtenção de um alimento alternativo

aos tradicionais, que trazem na sua composição frações residuais de agrotóxicos, antibióticos e na sua maioria são compostos por organismos geneticamente modificados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um suplemento proteico a partir do cultivo microbiano de *S. cerevisiae* e farinha de vagens de algaroba como substrato biológico para aplicação na alimentação suplementar de abelhas africanizadas, em período de entressafra no semiárido brasileiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Caracterizar e analisar os parâmetros físico-químicos da farinha de vagens de algaroba (FVA);
- ✚ Avaliar a atividade de água através da isoterma de adsorção da FVA;
- ✚ Determinar a umidade para o cultivo, concentração de leveduras e tempo de produção ideal para maximizar o ganho proteico do suplemento;
- ✚ Formular uma dieta proteica a partir do cultivo microbiano de *S. cerevisiae* com substrato biológico de FVA;
- ✚ Mensurar as respostas fisiológicas de abelhas africanizadas alimentadas com o suplemento proteico de FVA em laboratório e em campo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 APICULTURA

A apicultura se caracteriza como atividade da criação de abelhas do gênero *Apis* para produção de mel e outros produtos, é vista como produção agropecuária totalmente alicerçada no tripé da sustentabilidade, pois se configura como atividade rural praticada em sua maioria por agricultores familiares que obtêm renda através da venda dos produtos oriundos da produção apícola, além disso, as abelhas fornecem serviços ambientais de polinização a flora nativa e cultivada (SILVA et al., 2019).

No cenário mundial essa atividade tem se fortalecido nos últimos anos, a China encabeça a produção de mel natural no mundo e apresentou um crescimento estável no período compreendido entre 2007 e 2016, tanto em termos de volume de produção, quanto de produtividade por colmeia. Além disso, o mel desse país é um dos mais baratos no mercado mundial, o baixo custo de produção do mel chinês faz da China um dos mais competitivos, se não o mais competitivo, do mundo. Em 2016, a China foi responsável por 28,1% de todo o mel

produzido no mundo, sendo também o maior exportador mundial de mel natural e o principal fornecedor de mel para a União Europeia. O segundo maior produtor de mel natural no mundo é a Turquia, com 5,9% da produção, porém, este país não possui uma participação expressiva no mercado mundial do produto (FAO, 2019; VIDAL, 2018), ainda de acordo com Vidal (2018), o Brasil, apesar do vasto potencial para a produção apícola e de ser reconhecidamente um dos países exportadores de mel de alta qualidade, ocupou em 2016 a décima posição na produção mundial de mel e responde por menos de 3,0% das exportações globais do produto. A autora destaca que, na área de atuação do Banco do Nordeste (Nordeste, Norte de Minas Gerais e Norte do Espírito Santo), a atividade possui elevada importância social, pois está concentrada no semiárido, mais especificamente nos estados do Piauí, Bahia e Ceará, onde são poucas as opções de atividades produtivas rentáveis no meio rural, devido às limitações inerentes à região, em especial, a escassez de água. Tem-se observado também, consolidação da produção de mel no Maranhão e no Norte de Minas Gerais.

Freitas (2003) afirma que a apicultura é uma atividade que auxilia na manutenção e na preservação do meio ambiente, pois as abelhas atuam também como polinizadores naturais de espécies nativas. E, por isso, essa atividade favorece o equilíbrio do ecossistema, ao mesmo tempo que contribui para a manutenção da biodiversidade.

3.2 ONTOGENIA E NUTRIÇÃO DE ABELHAS AFRICANIZADAS

Descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores, apresentam uma combinação de características individuais e de cooperação social não encontrada no restante do reino animal. O modo como essa espécie consegue se adaptar ao mundo que a rodeia é uma das mais ricas fontes de estudo e de conhecimento dentre todos os organismos, e que se torna mais importante ainda pelos benefícios econômicos trazidos para a humanidade (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2011).

O comportamento da abelha na fonte de alimento varia conforme a flor visitada. Ao chegar à flor, as operárias introduzem sua língua ou glossa na região onde o néctar é acumulado, sugando-o para o estômago de mel. Ao completar sua carga a abelha retorna à colméia. Durante o trajeto são adicionadas ao néctar enzimas provenientes da glândula hipofaríngea, principalmente, invertase, diastase e glicose-oxidase. Essas enzimas convertem os açúcares compostos em açúcares simples, de fácil digestão, e protegem o mel de ataques de microrganismos (CRANE, 1987; WINSTON, 1987).

A alimentação de abelhas é diferenciada em suas fases de desenvolvimento. O desenvolvimento das abelhas se constitui em fases: ovo, larva, pupa e adultos (figura 1).

Figura 1: Etapas do desenvolvimento de abelhas *Apis mellifera*.



Fonte: Adaptado de Cardozo, 2014.

Na fase larval, o alimento promove o crescimento e ganho de ao inseto. Essas duas mudanças acontecem enquanto os alvéolos estão abertos; depois que as operárias adultas operculam o alvéolo, as larvas tecem seu casulo e passam para a fase de pré-pupa e pupa. A fase de pupa é de metamorfose, quando a larva muda para adultos; quando esta transformação está completa, o adulto recém-formado roe o opérculo, abrindo seu caminho, sai do alvéolo e termina seu desenvolvimento durante os próximos dias. O processo inteiro de ovo a adulto varia de, somente, 16 dias para a princesa a 24 dias para o zangão. O tempo de desenvolvimento e a qualidade do adulto emergido dependem, particularmente, da temperatura, da nutrição e da raça da abelha (WINSTON, 2003).

O pólen é a matéria prima mais importante utilizada pelas abelhas nutrizes na produção de geléia real, alimento da rainha e das larvas, principalmente, e sua ausência reduz a postura da rainha e a sobrevivência das crias. Após a eclosão do ovo a geléia real é administrada sem restrições às crias abertas e é capaz de fazê-las aumentar 10 vezes seu peso em apenas três dias (HAYDAK, 1970; SILVEIRA, 1987; LENGELER, 2003).

A abelha emergida é, ainda frágil e a cutícula termina o endurecimento durante as próximas 12 a 24 horas. Durante os próximos dias, o desenvolvimento interno é completado, particularmente o desenvolvimento glandular e o crescimento dos corpos gordos, que, nas operárias jovens, depende do consumo de pólen ser suficiente para o suprimento de proteína. Consumo de pólen insuficiente, no início da vida resulta em desenvolvimento glandular deficiente e menor tempo de vida (MAURIZIO, 1950; HAYDAK, 1970).

As abelhas *A. mellifera* para o seu pleno desenvolvimento, manutenção, reprodução e longevidade, necessitam que suas exigências nutricionais sejam satisfeitas obedecendo aos

limites de exigências da espécie. As necessidades nutricionais das abelhas na natureza são obtidas através do fornecimento de água, carboidratos (açúcares), proteínas, vitaminas, sais minerais e lipídeos. O néctar fornece os carboidratos e sais minerais e o pólen, além de fornecer sais minerais, fornece proteínas, vitaminas e lipídeos (PAULINO, 2004; SOMBRA, 2018).

A única fonte de proteína natural para abelhas melíferas é o pólen. Colônias coletam 10–26 kg de pólen por ano (WILLE et al., 1985) e Crailsheim et al. (1992) estimaram a exigência do pólen exigência de duas colônias de 10 quadros entre 13,4 e 17,8 kg por ano, respectivamente. Segundo (SCHMICKL; CRAILSHEIM, 2001, 2002), ao contrário do mel, apenas uma pequena quantidade de pólen é armazenada na colônia em qualquer tempo, e as reservas diminuem rapidamente durante os períodos sem forrageamento.

O pólen das flores é coletado pelas abelhas campeiras, principalmente nas primeiras horas do dia e levado até a colméia para ser estocado e compactado. Porém, durante a coleta e a armazenagem o pólen sofre alterações físicas e químicas devido a processos fermentativos, e quando estocado nos favos é conhecido como “pão de abelha”, principal alimento para larvas e adultos; sua ausência constitui um fator limitante para o desenvolvimento da colméia, e a alimentação das colônias com pólen em quantidade adequada, está relacionada diretamente com a produção de cera e geleia real. Nele são encontrados produtos como: néctar, mel, geleia real e microrganismos que produzem enzimas importantes no metabolismo de lipídeos, proteínas, carboidratos e também contribuem com ácidos orgânicos, antibióticos e outros metabólitos (GILLIAM; PREST; LORENZ, 1989; VIT, 2004; SILVA, 2005; MARCHINI; REIS; MORETI, 2006; SALVADOR; ROSÁRIO; BÖHM, 2008; SALOMÉ, 2009).

Os teores de proteína no pólen são extremamente importantes para a nutrição da colmeia, pois durante os primeiros cinco ou seis dias de vida adulta, as abelhas operárias consomem grandes quantidades de pólen para obter um nível adequado de proteínas e aminoácidos necessários para completar o seu crescimento e desenvolvimento. Da mesma forma, se as abelhas operárias jovens não consomem quantidade ideal de proteínas, suas glândulas hipofaríngeas não se desenvolvem completamente e a produção de geleia real pode ficar prejudicada (STANDIFER, 2003).

A nutrição adequada é a base para o crescimento e desenvolvimento de uma colônia de abelhas. O pólen é a principal fonte de proteínas e está relacionado fortemente com o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas das abelhas (PERNAL; CURRIE, 2000; KELLER et al., 2005; SCHAFASCHEK, 2014). As necessidades mínimas de proteína para as abelhas variam de 20 a 25% (DE GROOT, 1953; SOMERVILLE, 2005), sendo que quando as

necessidades nutricionais não são satisfeitas, a capacidade reprodutiva é uma das primeiras funções a ser afetada, atingindo também sua capacidade produtiva e, conseqüentemente, promove o enfraquecimento da colônia (SOMERVILLE, 2005; SCHAFASCHEK, 2014).

Na fase adulta o hábito alimentar está relacionado com sua idade, função que exerce na colônia e maturação sexual (CRAILSHEIM et al., 1992; PANZENBOCK ;CRAILSHEIM, 1997). Dotadas de um aparelho bucal lambedor as maiores fontes de alimento das operárias e zangões são o néctar, que será transformado em mel, e o pólen. Esses alimentos possuem uma variação nutritiva muito grande, de acordo com a espécie botânica de onde são obtidos (GALLO et al. 1988; ZUCOLOTO, 1994). As rainhas são alimentadas pelas abelhas nutrizas com a geléia real, contudo, em épocas de falta de alimento elas podem consumir mel (HAYDAK, 1970; PEREIRA, 2005).

As abelhas adultas podem desenvolver a cria por pouco tempo, quando alimentadas com dieta exclusiva de carboidratos, e elas consomem os tecidos dos seus próprios corpos para produzir comida larval, e os adultos terão um teor de N, nos seus abdomens, mais baixo do que nas colônias com acesso ao pólen (WINSTON, 2003; HAYDAK, 1935). A quantidade de pólen exigida para criar uma única larva de operaria, foi calculada em 125 a 145 mg, contendo aproximadamente 30 mg de proteína (WINSTON ,2003; ALFONSUS, 1933; ROSOV, 1944). As exigências anuais de uma colônia variam de 15 a 55 kg (WINSTON 2003; ECKERT, 1942; RIBBANDS, 1953; HIRSCHFELDER, 1951; LOUVEAUX, 1958; SEELEY, 1985).

Ingestão de pólen ou outros alimentos ricos em proteínas se reflete em altos níveis de proteína na hemolinfa, muitas vezes acompanhada de alta níveis de proteínas de armazenamento, como a vitelogenina (Vg), a proteína gema e hexamerinas (Hex) (BITONDI; SIMÕES 1996; CREMONEZ et al.,1998; MARTINS et al., 2008; DI PASQUALE et al.,2013). Estas proteínas são sintetizadas na gordura corporal e secretada na hemolinfa onde eles se acumulam (VELTHUIS, 1970).

A deficiência de proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais e água podem prejudicar o desenvolvimento, manutenção e reprodução das colônias, reduzir a vida das abelhas, provocar estresse e facilitar o aparecimento de doenças além de afetar a capacidade das abelhas de cuidarem das crias novas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010), sendo importante propor dietas suplementares que possam minimizar os efeitos da carência nutricional na apicultura.

3.3 DIETAS SUPLEMENTARES DE ABELHAS AFRICANIZADAS

Alguns alimentos suplementares são elaborados pelos apicultores e se constitui a base

de muitas pesquisas, onde se observa o comportamento nutricional das abelhas, aumento populacional dos enxames, toxicidade entre outros fatores que determinam a sua funcionalidade e auxiliam na permanência dos enxames nos apiários.

Os alimentos suplementares ou artificiais são fornecidos as colmeias mediante as condições de cada região, sendo necessário a aplicação dos conhecimentos do apicultor em relação a essa necessidade. Deve-se levar em consideração períodos longos de escassez de chuvas, assim como os períodos de chuvas mais prolongados, insuficiência ou ausência de floradas, além de interferências diversas que possam interferir no manejo alimentar do apiário.

Há dois tipos de alimentação artificial, a de subsistência, rica em carboidratos, é utilizada visando suprir a falta de alimento natural, em épocas de pouca florada (ALBANEZ, 2000) e, estimulante, que é composta por substâncias proteicas e energéticas. Ela deve ser realizada cerca de dois meses antes da época de florada para estimular a postura da rainha e, conseqüentemente, aumentar a população do enxame, principalmente no número de abelhas com idade de campeira (ALBANEZ, 2000).

Em períodos de estiagem os apicultores aumentam os esforços para evitar o abandono dos enxames, utilizando alimentos suplementares enérgicos e proteicos. As migrações são conseqüências previsíveis de esgotamento de recursos ou falta destes; a queda generalizada no pólen e néctar disponíveis são geralmente associados com altas temperaturas, extrema aridez, ou, inversamente, a chuvas prolongadas ou épocas frias. Mudanças nas condições microclimáticas do ninho e o aumento de pragas / predadores, são muitas vezes coincidentes com os efeitos do esgotamento de recursos. Esgotamento de recursos como um estímulo para a fuga e migração é um tema evidente e recorrente na literatura para todas as espécies de abelhas (exceto as raças de *A. mellifera* nativas da Eurásia) (HEPBURN, 2006).

Em estudo realizado por Pereira (2005), a alimentação proteica, ofertada em forma de farinha, é mais prático de serem produzidos, facilmente encontrados em comércos locais. As medidas de preferência das abelhas foram realizadas por observações empíricas com feno das folhas de mandioca (*Manihot esculenta*); feno das folhas de leucena (*Leucaena leucocephala*); farinha de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*); farinha de vagem de bordão-de-velho (*Pithecellobium cf. saman*); farelo de babaçu (*Orbygnia martiana*) e sucedâneo do leite para bezerros da marca Purina. Segundo a autora, os resultados demonstram que o alto teor de açúcares contido na farinha de bordão-de-velho não permite que a mesma seja fornecida às abelhas na forma *in natura*, uma vez que provoca a mortalidade precoce das abelhas alimentadas com esta farinha. Os demais alimentos não se mostraram tóxicos, porém, somente

o feno da leucena contém os teores de aminoácidos essenciais requeridos pelas abelhas *Apis mellifera*.

Silveira-Neto (2017), relata que a alimentação artificial é fundamental para a manutenção das colônias, sendo a proteica a responsável pelo desenvolvimento dos óvulos, glândulas e musculatura das crias, síntese de proteínas e longevidade das abelhas adultas, ao passo que a energética é fundamental para o fornecimento de energia que é utilizada na síntese de matéria orgânica, na contração muscular e ajuda na transmissão dos impulsos nervosos e produção de cera. Em seu estudo, o autor avalia o desempenho de rações proteicas, os ingredientes testados foram o pólen, o extrato de soja, um suplemento alimentar, albumina e leite em pó. Estes foram testados quanto à sua toxicidade, e o extrato de soja e a albumina apresentaram menor potencial tóxico do que os demais.

Sombra (2018), mensurou o desenvolvimento de colmeias utilizando entre outras, dietas a base da macroalga *G. birdiae* (EA – extrato de algas com xarope; M+S – farelo de soja, farelo de milho e xarope de sacarose 50% (v/v); M+FA – farinha de algas, farelo de milho e xarope de sacarose 50% (v/v); a autora sugere a utilização da alga como alimento substituto do pólen, mediante resultados obtidos através de sua aplicação em campo.

Percebe-se que os alimentos suplementares são diversos, e são elaborados para suprir as necessidades nutricionais de abelhas, colaborando tanto no processo de estabilização das colônias fortalecendo a dinâmica econômica da atividade apícola.

3.4 CULTIVO MICROBIANO E A SÍNTESE DE BIOMASSA PROTEICA

O cultivo microbiano (CM), também considerado por muitos autores como fermentação semi-sólida (FSS), consiste em promover um sistema constituído de nutrientes e condições otimizadas para o desenvolvimento microbiano, incluindo valores de atividade de água (A_w), umidade, temperatura no biorreator, nutrientes solúveis como açúcares redutores e pH.

Este tipo de cultivo é especialmente viável para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo, resultando em processo mais favorável ao meio ambiente, além de gerar produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e agricultura em geral (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Os resíduos agroindustriais, em geral, incluem os subprodutos gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas ou animais ou obtidos de atividades agrícolas. Normalmente, por muitas vezes não haver uma aplicação direta desses resíduos, pouco ou nenhum valor econômico é atribuído a eles, como é o caso da palha, caule, folhas, casca,

semente e polpa de legumes e cereais (arroz, trigo, milho, sorgo, batata e cevada) e muitos outros. Contudo, açúcares, fibras, proteínas e minerais são compostos comumente encontrados na composição desses resíduos, o que faz deles fontes alternativas de carboidratos e nitrogênio, em substituição às fontes sintéticas desses nutrientes empregadas em bioprocessos (PANESAR et al., 2016).

Alguns parâmetros devem ser observados para execução do cultivo microbiano, como: atividade de água (a_w), pH, umidade, açúcares e a temperatura nos biorreatores.

O requerimento de água pelo microrganismo deve ser definido em termos de atividade de água (A_w) do meio em lugar da umidade do substrato sólido (DOELLE, MITCHELL, ROLZ, 1992).

A água livre se encontra nos espaços intergranulares e no interior dos poros do alimento. Ela é mantida por forças de absorção de pouca intensidade. Este tipo de água apresenta grande mobilidade e pode ser facilmente retirada durante um processo de secagem. Suas moléculas não estão ligadas a nenhum componente do alimento, assim podem ser usadas para o crescimento microbiano e também estão disponíveis para reações químicas. Por estar cercada somente por outras moléculas de água, a água livre apresenta propriedades físico-químicas muito semelhantes às da água pura, como o ponto de ebulição, ponto de fusão e densidade. Quando um produto é congelado, somente essa água se congela, ficando assim indisponível para reações (ATHIÉ et al., 1998; MAKAWY; EL-SAYD, 2010; BRAGA, 2015).

A água é um elemento básico importante nos alimentos. A medição desse parâmetro fornece informações importantes sobre o qualidade de um produto, como a possibilidade de crescimento microbiológico na superfície. Somente com essas conclusões pode ser previsto a estabilidade e durabilidade de uma amostra.

A umidade revela a concentração de água existente em determinado material, sendo expresso normalmente em termos percentuais. Por sua vez, a atividade de água determina a quantidade de água livre do meio, prontamente utilizável pelo microrganismo, influenciando o crescimento microbiano, processos bioquímicos e enzimáticos. A atividade de água exerce papel de maior importância para a atividade fisiológica microbiana do que aquele exercido pelo teor de umidade do meio (CORREIA, 2004).

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os

fungos preferem pH baixo (4,5 – 5,0) e as bactérias pH próximos à neutralidade (6,5 – 7,0). O pH do meio afeta o metabolismo dos microrganismos por alterar seu conjunto enzimático (PERAZZO NETO, 1999). Quanto a disponibilidade de nutrientes, os microrganismos necessitam de carbono, nitrogênio, minerais, água, eventualmente fatores de crescimento e, caso seja aeróbio, oxigênio, para formar biomassa e impulsionar reações de biossíntese e manutenção celular. Os substratos ricos em carboidratos são os melhores e as mais baratas fontes de carbono, uma vez que podem ser adquiridos a baixo custo como resíduo da indústria alimentícia ou atividades agrícolas (SANTOS, 2007).

No contexto da aplicação de tecnologias, o cultivo microbiano tem apresentado resultados satisfatórios para a produção de alimentos no setor de animais. Os animais necessitam de proteínas em suas dietas para desenvolver seus processos fisiológicos no decorrer dos estágios de desenvolvimento. Os custos para produção de dietas proteicas para alimentação animal são onerosos, no setor apícola a soja é um dos principais produtos utilizados para alimentar os enxames nas entressafras. Na busca por alternativas às dietas tradicionais, a proteína microbiana se mostra atrativa, sendo aprimorada através de processos biotecnológicos que permitem seu desenvolvimento e conseqüentemente, otimiza os dados referentes aos valores proteicos e de vitaminas do complexo B.

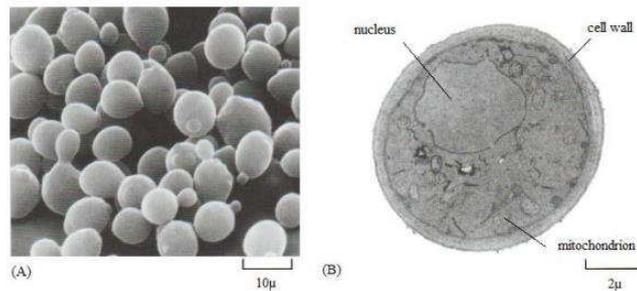
A produção de proteína unicelular em larga escala tem características atrativas com amplos métodos, matérias-primas e fontes microbianas podem ser utilizadas para esse processo, o substrato é convertido com alta eficiência, a rápida taxa de crescimento de células microbianas resulta em alta produtividade e fatores sazonais não interferem nesse processo (ALI, 2017). Segundo Ritala et al. (2017), as etapas de produção geralmente incluem (a) preparação de meio nutriente, possivelmente a partir de resíduos, (b) cultivo, incluindo fermentação em estado sólido, (c) separação e concentração de proteína de célula única (PCU), em alguns casos secagem, e (d) processamento final de proteína de célula única (PCU) em ingredientes e produtos.

Os fungos cultivados como PCU geralmente contêm 30 a 50% de proteína (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000 ; NASSERI et al., 2011). Além da proteína, espera-se que a PCU derivada de fungos forneça vitaminas principalmente do grupo do complexo B (tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, colina, estreptogenina, glutatona, ácido fólico e ácido p-amino benzoico). As paredes celulares dos fungos são ricas em glucanos, que contribuem com fibras para a dieta (TURNBULL et al., 1992; RITALA et al., 2017).

3.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E NUTRICIONAIS DAS LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*

Taxonomicamente, as *S. cerevisiae*, são pertencentes ao domínio Eukaryoto, do reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae* do gênero *Saccharomyces* (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011). Morfologicamente apresentam formas esféricas, esferas elípticas, ovais, não possuem flagelo, formadoras de colônias cremosas, brilhantes com bordas regulares, com crescimento apical, como mostra a figura 2, (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011; MARTIN; ARKOWITZ, 2014).

Figura 2: *Morfologia da levedura Saccharomyces cerevisiae.*



Fonte: Kovačević (2015).

Kovačević (2015), a partir da concepção de alguns autores, as leveduras são quimiorganotróficas, então usam compostos orgânicos como fonte de energia e não requer luz solar para crescer. Leveduras do gênero *Saccharomyces* são capazes de utilizar uma ampla variedade de açúcares como fontes de carbono e energia. A utilização do açúcar é utilizada pela capacidade genética e mecanismos regulatórios. Leveduras utilizam preferencialmente hexoses como glicose e frutose (CARLSON, 1987). A glicose é a principal fonte de carbono e energia convertidos pela via glicolítica e o ciclo de Krebs em energia na forma de ATP (BEKATOROU et al., 2006). A sacarose é metabolizada após hidrólise em glicose e frutose pela enzima extracelular invertase. A maltose é transferida na célula por permease de maltose, convertidos em duas moléculas de glicose pela enzima mannase e metabolizados (BEKATOROU et al., 2006). Curiosamente, açúcares como sacarose, maltose ou galactose não são metabolizados em presença de glicose (CARLSON, 1987). Algumas leveduras também podem utilizar uma série de fontes de carbono não convencionais, como biopolímeros, pentoses, álcoois, polióis, hidrocarbonetos, ácidos graxos e ácidos orgânicos, que são de particular interesse para alimentos e biotecnologistas ambientais (BEKATOROU et al., 2006).

A levedura se apresenta como fonte abundante de proteína. A proteína bruta contida em leveduras (N total x 6,25) situa-se entre 45-55%, dependendo da linhagem e das condições de crescimento (REED, 1981). Cerca de 80% do nitrogênio encontra-se na forma de aminoácidos, 12% na forma de ácidos nucléicos, 8% como amônia e quantidades menores na forma de lecitina, glutatona, ácido adélnico, vitaminas e coenzimas (PEPPLER, 1970). O teor de proteína de *Saccharomyces cerevisiae* é elevado quando comparado a outras fontes proteicas convencionais, sendo superior ao do trigo e do leite e um pouco inferior ao do ovo e da carne (MA TELES; TANNENBAUM, 1968).

Dentre as substâncias que compõem a levedura destacam-se os componentes da parede celular, tais como glicana, manana e quitina (BLUMER, 2002). Entretanto, existem variações entre a qualidade das diferentes leveduras, devido aos diferentes processamentos que elas podem sofrer, tornando sua composição bastante variável (MOREIRA et al., 1998). Pode-se utilizar a biomassa de leveduras tanto integralmente quanto apenas alguns de seus componentes como o extrato e parede celular, sendo que para isso são empregadas diferentes técnicas com a finalidade de se obter o produto final desejado (VILELA et al., 2000).

Diante do exposto, observando as recomendações, percebe-se que há possibilidade em ampliar e otimizar condições para o desenvolvimento de alimentos a partir de matéria-prima vegetal, produzidos a partir de concentrados de proteínas e designar para alimentação animal.

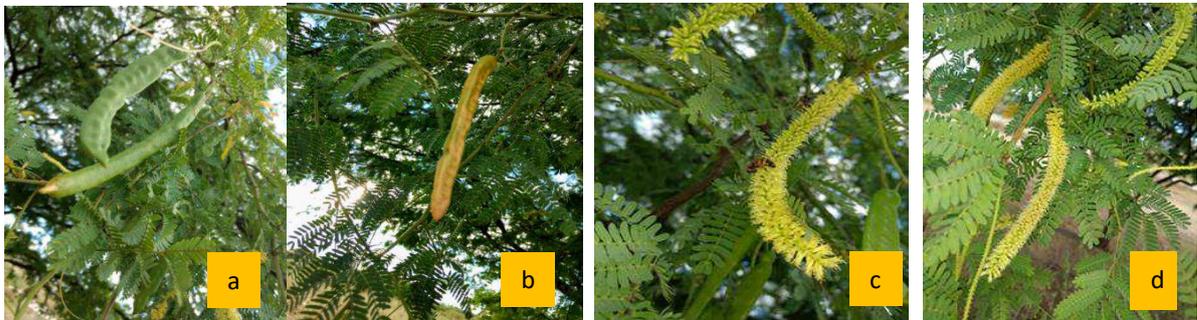
3.6 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E NUTRICIONAIS DA ALGAROBA

Prosopis juliflora (Sw). D.C. é uma espécie arbórea, xerófita, pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Mimosodae*. A árvore é conhecida no Brasil como algaroba ou algarobeira (RABÊLO, 2011). A dispersão do gênero *Prosopis* iniciou-se na porção Tropical da África e migrou para a América, ainda quando estes continentes estavam unificados (BURKART, 1976). Após a separação dos continentes, a partir da região do Chaco, na América do Sul, a espécie seguiu para o sul, até a Patagônia e para o oeste. Chegando ao deserto do Atacama, ela continuou avançando sobre regiões cada vez mais áridas, demonstrando um sistema adaptativo eficiente para ambientes secos e com solos pobres (ROIG, 1993; SANTOS, 2015).

O gênero *Prosopis*, apresenta um total de 45 espécies conhecidas que estão distribuídas em regiões áridas e semiáridas do planeta. Existem três espécies no Sudoeste da Ásia, uma na África e 41 nas Américas, que se espalham pelo continente desde o Sudoeste dos Estados Unidos até a Patagônia (BURKART, 1940).

Botanicamente, a algaroba é uma espécie que pode apresentar espinhos ou não, em raras situações, com altura que varia de 6 a 15 m, ramificações no tronco, copa com diâmetro variando de 8 a 12 m e diâmetro a altura do peito (DAP), com variações de 40 a 80 cm. Os frutos são falcados, lineares, lomentos drupáceos, indeiscentes; apresenta mesocarpo carnudo e endocarpo com compartimentos responsáveis pelo armazenamento individual das sementes, que são ovóides, achatadas, contendo fissuras em linhas nas faces, duras e de coloração amarronzada. Com relação às flores, o tamanho é pequeno, actinomorfas, hermafroditas, de cor braço-esverdeada até atingir a cor amarela com a idade. Uma inflorescência possui em média 340 flores. A Figura 3 apresenta aspectos da inflorescência e frutificação. A eficiência da polinização é baixa, sendo de 29 % em relação ao número de inflorescências, e de 1,5 % em relação ao número de flores. A polinização é entomófila, sendo a abelha (*Apis mellifera*) o principal agente polinizador (RIBASKI et al., 2009).

Figura 3: Aspectos da frutificação da algaroba (a)/ (b) e inflorescência (c)/(d); Pombal, PB, 2018.



Fonte: autora (2018).

Na descrição botânica de Campelo (1987); Santos (2015).As inflorescências são dispostas em espigas axilares cilíndricas de 7 cm de comprimento; o cálice possui forma tubular e cor verde-amarelo-claro, 1,5 mm de largura, com sépalas em forma de campânula; a corola se compõe de 5 pétalas de cor verde-claro, amarelada, com 3 mm de tamanho e piloso nos lados; possui 10 estames estendidos, de cor amarelo-laranja contendo, nas extremidades, as anteras, de cor marrom e com 4 mm de comprimento; o pistilo único, com forma delgada, curvado, branco, com cerca de 4 mm de comprimento e ovário de cor verde-claro e pouco piloso; suas flores são muito melíferas . As vagens da algarobeira medem de 15 a 30 cm de comprimento e de 1 a 2 cm de largura, com peso variando entre 4 e 8 g compostas de epicarpo, mesocarpo e endocarpo (VALDÍVIA, 1972).

A algaroba é considerada uma árvore com múltiplos usos, além de servir como fonte de um recurso determinado, também apresenta outros benefícios adicionais associados como a

exploração da lenha, a produção de frutos usados para a alimentação do homem e de animais, o uso medicinal, a estabilização do solo e o aumento da fertilidade do mesmo (LIMA, 1994; SANTOS, 2015).

A utilização dos frutos do gênero *Prosopis*, na alimentação de animais, é realizada há séculos em países andinos, da América Central, da África e da Ásia. Criadores de gado, agrônomos e veterinários do Peru citam que a alimentação dos animais com a vagem da planta aumenta a produção de leite e que na época de safra da algaroba o gado engorda. Essa condição pode ser explicada pelo fato da vagem ser rica em açúcares e amidos, apresentando mais de 40% desses compostos em sua composição (GOMES, 1987). As vagens são constituídas de 58% de pericarpo, 23,1% de casca de semente e 13,9% de sementes (DEL VALLE et al., 1983); é comumente utilizada na forma de farelo ou farinha.

Muitos trabalhos contemplam a utilização de vagens de algaroba na alimentação de animais. Rebouças (2007), inseriu diferentes níveis de inclusão (0, 15, 31, 47 e 58%) do farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) no concentrado foram avaliados segundo o consumo voluntário e a digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido em ovinos Santa Inês. A inclusão de farelo de vagem de algaroba em substituição ao farelo de milho em dietas para ovinos Santa Inês não influenciou a digestibilidade e o consumo dos nutrientes, com exceção do consumo da fibra em detergente ácido, carboidratos não fibrosos e extrato etéreo.

Riet-Correa (2012), estudou a toxicidade sobre o sistema nervoso e o efeito teratogênico de vagens de *P. juliflora* (algaroba) em ovinos e sua toxicidade em caprinos, e de acordo com os resultados nenhum animal experimental apresentou sinais nervosos, de acordo com as proporções designadas no estudo.

Stein (2005), conduziu um experimento para se avaliar o uso do farelo de vagem de algaroba (FVA) em substituição ao milho desintegrado com palha e sabugo (MDPS) sobre o consumo de nutrientes em dietas para equinos e concluiu que não houve interferência na fisiologia nutricional dos animais. Silva et al., (2002), realizou um experimento para testar a inclusão da farinha integral de vagem de algaroba (FVA) nos níveis de 0; 5; 10; 15; 20 e 25% na alimentação de codornas japonesas e recomendaram ao final do estudo a inclusão de FVA em até 15% ou 150 g/kg em rações isoenergéticas e isoprotéicas sem afetar, adversamente, o desempenho de codornas.

Muniz (2009) descreve resultados sobre as condições nutricionais de vagens de algaroba obtidos por Gomes (1987) onde apresentou 12,93% de proteína bruta (PB), 4,06% de extrato etéreo (EE), 19,08% de fibra bruta (FB), 43,16% de extratos não nitrogenados (ENN), 3,75% de matéria mineral (MM) e 17,02% de umidade. Já Stein (2002), avaliando o próprio FVA, encontrou os seguintes resultados: 8,34% de PB, 25,26% de fibra em detergente neutro (FDN), 18,89% de fibra em detergente ácido (FDA), 3,464 Mcal de energia bruta (EB), 0,33% de cálcio e 0,34% de fósforo. Silva et al. (2001), além de mencionarem a excelente palatabilidade da algaroba, apresentam dados interessantes sobre sua composição, onde a vagem de algaroba apresentou de 25 a 28% de glicose, 11 a 17% de amido, 7 a 11% de proteínas, 14 a 20% de ácidos orgânicos, pectinas e demais substâncias.

As características nutricionais das vagens de algaroba permitem que ela seja explorada na alimentação de animais, desde que sejam verificadas as orientações de estudos relacionados aos percentuais da dieta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Engenharia Bioquímica (LEB/UFPG-Campina Grande), Laboratório de Nutrição Animal e Abelhas (LNA/LABE) do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar-CCTA-UFPG, campus de Pombal-PB e Centro Vocacional Tecnológico, Pombal, PB.

4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

As vagens de algaroba foram obtidas no sítio Malhadinha, zona rural de Pombal-PB, e transportadas para o Laboratório de Engenharia Bioquímica-LEB, onde foram dispostas em bandejas de polipropileno para a separação e eliminação de sujidades e de vagens danificadas. A figura 4 apresenta, apresenta o processo de seleção do material para a produção do substrato no processo de cultivo microbiano.

Figura 4- Seleção das vagens de algaroba para a produção da farinha.



Fonte: autora (2018).

Em seguida, realizou-se a sanitização, utilizando solução clorada a 50 ppm por 15 minutos. Logo após as vagens foram dispostas em estufa de circulação de ar e submetidas a secagem por 24h a temperatura de 50°C para facilitar a moagem. As vagens foram trituradas integralmente em máquina forrageira com auxílio de peneiras intermediárias para melhor fragmentação e produção da farinha. O material obtido deste processo, foi peneirado e armazenado para a sua caracterização. A figura 5 apresenta o processo de produção da farinha, na etapa de obtenção da farinha após a moagem e que passaram pela peneira.

Figura 5 -Etapa de peneiramento da farinha de algaroba para o cultivo microbiano.



Fonte: autora (2018).

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DE ALGAROBA

A farinha de algaroba foi caracterizada através dos parâmetros físico-químicos: teor de água, cinzas, pH, proteína, açúcares redutores (AR), fibra bruta, carboidratos, valor calórico e atividade de água.

4.3.1 Teor de Água

A determinação do teor de água presente na farinha se deu através da pesagem em balança analítica de 5g da farinha de algaroba em cápsulas de metal previamente taradas. Em seguida as cápsulas contendo o resíduo foram levadas a estufa a 105°C até peso constante, resfriadas em dessecador e pesadas novamente. O teor de água presente nos resíduos foi determinado utilizando-se a equação 1 (BRASIL, 2008).

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final da amostra}) \times 100}{\text{peso inicial da amostra}} \quad \text{Eq. (1)}$$

4.3.2 Cinzas

Os cadinhos de porcelana vazios foram colocados na mufla a 550°C durante duas horas, após esse tempo, foram transferidos para um dessecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida eles foram pesados em balança analítica. Posteriormente adicionou-se em cada

cadinho 5g da farinha de algaroba, e levou-se novamente para a mufla durante cinco horas para serem incinerados. Passada às cinco horas transferiu-se novamente os cadinhos para o dessecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida fez-se novamente a pesagem (BRASIL, 2008). A percentagem de cinzas presente nos resíduos foi determinada a partir da equação 2.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{peso final da amostra} \times 100}{\text{peso inicial da amostra}} \quad \text{Eq.(2)}$$

4.3.3 pH

Adicionou-se em um erlemayer 2 g de farinha de algaroba, acrescentou-se 40mL de água destilada, em seguida fez-se a homogeneização da amostra por 30 minutos. Em seguida foi feita a filtração do material e realizou-se a leitura do pH em um pHmetro digital, o qual foi previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 (BRASIL, 2008).

4.3.4 Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteína proposta por Kjeldahl (1883), baseia-se na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra à 400° C com ácido sulfúrico P.A., em presença de sulfato de cobre como catalisador.

Para a etapa da digestão pesou-se de 0,3 g da amostra e 0,5 g do catalisador (90% sulfato de potássio e 10% de sulfato de cobre) em papel livre de nitrogênio (papel manteiga), em seguida adiciona-se às amostras 5 mL de ácido sulfúrico P.A. Os tubos foram colocados em bloco digestor e aquecidos até 400°C, com aumento gradativo da temperatura em intervalos de 50°C a cada 30 minutos até que o conteúdo do tubo apresentasse coloração azul ou verde translúcido.

Para a etapa de destilação inicialmente adicionou-se 3 gotas do indicador fenolftaleína na mistura do tubo digestor e o acoplou ao destilador de nitrogênio. Em seguida, a amostra foi neutralizada com a adição de hidróxido de sódio- NaOH à 40%, sendo evidenciado pela mudança de coloração para marrom. Após a neutralização iniciou-se a destilação, na qual a amônia presente no tubo se desprende na forma de vapor que se condensou e foi coletada 25 mL do destilado em erlenmeyer contendo 25 mL de ácido bórico (4%), 6 gotas de verde de bromocresol e 4 gotas de alaranjado de metila.

Na titulação o borato de amônio foi neutralizado com uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 1N até que a amostra passasse da coloração de verde para laranja. O teor de proteína é determinado pela equação 4.

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{V \times f \times N \times 0,014 \times 6,25 \times 100}{MA} \quad \text{Eq(3)}$$

Em que:

V = volume gasto de HCl em mL

f = fator de correção do HCl

N = concentração do HCl

0,014 = fator de conversão do nitrogênio

6,25 = fator de conversão para proteína.

MA = massa da amostra

4.3.5 Açúcares Redutores (AR)

A concentração de açúcares redutores foi determinada seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), que consiste na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS) e na oxidação simultânea do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Pesou-se separadamente aproximadamente 0,5 g da farinha de algaroba, adicionou-se 100 mL de água destilada que se manteve sob agitação durante 30 minutos, em seguida o material foi filtrado com auxílio de papel filtro. Transferiu-se 1 mL do filtrado para tubos de ensaios, adicionou-se 1 mL da solução DNS e foram dispostos em banho-maria por 5 minutos a uma temperatura de 100°C.

Após a etapa de aquecimento, os tubos foram resfriados em banho de gelo imediatamente adicionou-se em cada tubo mais 8 mL de água destilada (figura 6), agitou-se para uniformização da amostra e em seguida foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro com comprimento de 540 nm.

Figura 6: Preparo das amostras para determinação de açúcares redutores-AR em farinha de algaroba.



Fonte: autora (2019).

Após as leituras o teor de açúcares redutores foi determinado pela equação 3.

$$AR = \frac{ABS \times \text{Fator do DNS} \times \text{Diluição}}{\text{Massa da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq (4)}$$

4.3.6 Determinação de Fibra Bruta

Para determinação de fibra bruta, utilizou-se a metodologia adotada pelo IAL (2008), que consiste em tratar a amostra contida em saquinho de TNT com ácido sulfúrico 1,25% e hidróxido de sódio 1,25% diluídos a quente e o determinador de Fibra TE-149 da marca TECNAL®. Pesou-se um grama de amostra, em seguida os saquinhos foram selados e hidratados com água deionizada por 30 minutos. Os saquinhos então foram colocados no determinador de fibra com a solução ácida (H₂SO₄ 1,25%) previamente aquecidas. Ao ferver, o equipamento foi programado por 30 minutos. A temperatura se estabilizou entre 97 e 98°C. Terminado o processo a solução foi escoada, realizando-se cinco lavagens sucessivas de três minutos cada a solução. Realizando-se cinco lavagens sucessivas de três minutos cada, com água deionizada, alternando em água fria e quente. Depois foi colocada a solução básica (NaOH 1,25%) previamente aquecida, repetindo o procedimento da etapa anterior. Após as etapas de tratamento com H₂SO₄ e NaOH os saquinhos foram lavados com acetona por três minutos, colocados sob papel absorvente, e levados a estufa a 105°C por 4 horas. Passado o tempo, os saquinhos foram colocados no dessecador por 30 minutos e pesados. O valor da fibra bruta foi obtido pelo cálculo da equação 5:

Equação 5:

$$\%FB = \frac{(C - A) - D}{B} \times 100 \quad \text{Eq(5)}$$

Em que:

A = Massa do saquinho vazio (g)

B = Massa da amostra (g)

C = Massa do conjunto cadinho-saquinho-extrato (g)

D = Massa do conjunto cadinho-cinzas (g)

4.3.7 Determinação de lipídios

Os balões de fundo chato foram colocados na estufa a 105°C, por 1 hora, após o período os balões foram acondicionados em dessecador por 15 minutos, anotando-se o peso. Pesou-se 2 g da amostra em cartucho de Soxhlet e transferiu-se para o extrator, acoplando ao balão de fundo chato. Adicionou-se hexano em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio e seguiu-se o aquecimento em chapa elétrica, a 70°C por 6 horas. Após o aquecimento, o balão com o

resíduo extraído foi transferido para uma estufa a 105°C, por cerca de uma hora. Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente. Foi realizada a pesagem e esta operação se repetiu até a obtenção do peso constante.

$$\% \text{ Lipídios} = \left(\frac{100 \times N}{P} \right) \quad \text{Eq. (6)}$$

Em que:

N: Número de gramas de lipídios [(Peso do balão + gordura) – Peso inicial do balão];

P: Número de gramas de amostra.

4.3.8 Carboidratos Totais e Valor Calórico

A determinação de carboidratos totais foi realizada por diferença (IAL,2008), através da equação 7:

$$\text{Carboidratos Totais (\%)} = 100 - (\text{Umidade} + \text{Cinzas} + \text{Lipídeos} + \text{Proteínas}) \quad \text{Eq. (7)}$$

O valor calórico seguiu ao método descrito por (BRASIL, 2008), através da equação 8:

$$\text{Valor calórico} \left(\frac{\text{kcal}}{100\text{g}} \right) = (\text{Lipídeos} \times 9) + (\text{Proteínas} \times 4) + (\text{Carboidratos} \times 4) \quad \text{Eq.(8)}$$

4.4 ATIVIDADE DE ÁGUA E ISOTERMA DE DESSORÇÃO DA FARINHA DE ALGAROBA

As medidas de atividade de água foram realizadas no equipamento AquaLab modelo 3TE da Decagon Devices em uma temperatura de 30°C. Antes de fazer as medidas de atividades de água as amostras de farinha de algaroba foram acondicionadas em dessecador por 48 horas, para que o teor de água presente fosse removido. Para obtenção dos dados de atividade de água até o equilíbrio utilizou-se o método gravimétrico estático, com o auxílio de água destilada. Neste método a temperatura e a atividade de água presente no ar são mantidas constantes até que o conteúdo de umidade da amostra atinja o valor de equilíbrio. As amostras da farinha de algaroba foram colocadas em cápsulas de alumínio (figura 7), adaptadas para o equipamento AquaLab.

Figura 7: Cápsulas de alumínio utilizadas para acondicionamento da farinha de algaroba e para realização das leituras de A_w .



Fonte: autora (2020).

As cápsulas foram armazenadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados com água destilada, com um suporte de tela, para não haver contato da amostra com a água destilada (figura 8), em estufa a 40° C, isso possibilitou que o vapor saturado da solução entrasse em contato com as amostras. Após períodos específicos, as amostras foram retiradas e analisadas pelo equipamento AquaLab para obtenção dos pontos de Atividade de Água e posteriormente a isso, os dados foram tabulados para os ajustes da isoterma.

Figura 8: Sistema utilizado para execução da análise de adsorção da farinha de algaroba.



Fonte: autora (2020).

A umidade de equilíbrio foi determinada, aplicando os dados obtidos através da equação 9:

Ao atingir equilíbrio termodinâmico, a massa seca das amostras foram determinadas através do método da estufa, conforme Brasil (2008), e desse modo, pôde-se determinar a umidade de equilíbrio em base seca, X_e (b.s), pela Equação 9.

$$X_e = \frac{m_e - m_s}{m_s} \times 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

Em que:

X_e - conteúdo de umidade (%)

m_e - massa da amostra no equilíbrio, g

m_s - massa seca da amostra, g

4.5 MODELO MATEMÁTICO PARA AJUSTE DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Para o ajuste das isotermas de adsorção, foi realizada a correlação entre umidade de equilíbrio (X_e) e atividade de água (A_w), por meio do modelo matemático de GAB, Equação 10 e os resultados obtidos através software matemático Statística, 10.0.

$$X_e = \frac{X_m \cdot C \cdot K \cdot a_w \times 100}{[(1 - K \cdot a_w)(1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)]} \quad \text{Eq (10)}$$

Em que:

X_e - umidade de equilíbrio do material (% base seca)

a_w - atividade de água

X_m - umidade na monocamada do material adsorvente (% base seca)

C - constante de Guggenheim

K - constante de correção das propriedades das moléculas na multicamada com relação ao volume do líquido

4.6 PREPARO DO INÓCULO E ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Para o cultivo foi utilizada a levedura seca instantânea *Saccharomyces cerevisiae* comercial Saf-instant-Lesaffre, figura 9.

Figura 9: Levedura seca instantânea Saf-instant- Lesaffre.



Fonte: autora (2018).

As vidrarias, biorreatores e demais instrumentos utilizados na execução do processo foram esterilizados a temperatura de 120°C por 15 minutos em autoclave.

A farinha de algaroba foi reumidificada para as umidades de 60, 70 e 80%, antes da incubação do microrganismo para garantir A_w necessária para o desenvolvimento dos microrganismos, assim adicionou-se uma quantidade de água em biorreatores (bandejas de alumínio medindo 22 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura) contendo 60 gramas de farinha de algaroba (figura 10 a), levando em conta o valor da umidade inicial da farinha, em seguida foi feita a homogeneização do material. Os reatores foram mantidos por doze horas na geladeira protegidas com plástico filme. No dia seguinte, a inoculação foi realizada, adicionando-se as leveduras à farinha em quantidade de massa que correspondesse em percentual de 1, 3, 5% (m/m); esses valores foram estabelecidos para a execução do planejamento experimental fatorial.

Os biorreatores (bandejas) foram colocados em estufa (figura 10 b) a temperatura de 30 °C e 70% de umidade, o acompanhamento da temperatura foi realizado com auxílio de um termohigrômetro digital da marca Icoterm. Os tempos estabelecidos para coletas de amostras para avaliação da cinética do processo de cultivo foram: 0, 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11 e 13 horas. As amostras foram avaliadas quanto a: umidade, pH, açúcares redutores e percentual de proteínas.

Figura 10: Bandeja utilizada para o cultivo microbiano (a) e disposição das unidades experimentais em estufa (b).



Fonte: autora (2018).

4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental foi um fatorial, 2^2 mais três pontos centrais com finalidade de avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada: concentração inicial de levedura e umidade da farinha sobre o aumento proteico no processo.

Tabela 1- Matriz do planejamento experimental, fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais.

Ensaio	Concentração de levedura CL %	Umidade da FA - %
1	- 1 (1%)	- 1 (60%)
2	-1 (1%)	+1 (80%)
3	+1 (5%)	-1 (60%)
4	+1(5%)	+1 (80%)
5	0 (3%)	0 (70%)
6	0 (3%)	0 (70%)
7	0 (3%)	0 (70%)

Tabela 2- Variáveis descritas a partir da matriz do planejamento experimental.

Ensaio	Variáveis	
	Concentração de levedura CL %	Umidade da FA - %
1	(1%)	(60%)
2	(1%)	(80%)
3	(5%)	(60%)
4	(5%)	(80%)
5	(3%)	(70%)
6	(3%)	(70%)
7	(3%)	(70%)

O ganho proteico foi calculado com base na razão entre o valor proteico da farinha de algaroba enriquecida (%) e o valor inicial de proteína bruta da farinha (Equação 10):

$$\%GP = \frac{\%P B \text{ (farinha enriquecida)} - \%PB \text{ (farinha processada)}}{(\%)PB \text{ (farinha in natura)}} \times 100 \quad \text{Eq. (10)}$$

4.8 ELABORAÇÃO DO SUPLEMENTO APÍCOLA

Após a identificação da condição que proporcionou o maior ganho proteico, foram produzidas outras unidades experimentais nas mesmas condições para utilização do que se considerou “suplemento proteico apícola”.

Após o cultivo microbiano o suplemento apícola foi triturado em liquidificador industrial e peneirado em uma peneira de aço inoxidável de malha 16 MESH TY e disposto em bandejas de alumínio a 105°C por 30 minutos, até se obter uma pasta úmida. Após a secagem,

o produto foi armazenado sob refrigeração, determinou-se novamente o valor proteico final garantindo assim os dados referentes a esse nutriente, para o preparo final e aplicação no campo.

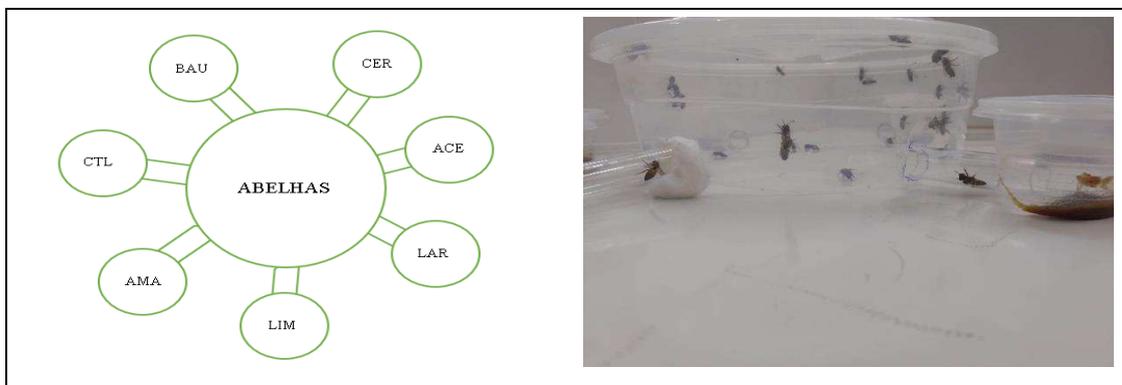
4.9 TESTE DE ATRATIVIDADE

O fator atratividade deve ser considerado na alimentação de abelhas para promover uma melhor aceitação do alimento. Assim, foram realizados testes com essências ou aromas florais, analisando-se o fator atratividade.

Os testes foram realizados em um delineamento ao acaso, com 5 repetições, utilizando uma arena (figura 11). A parte central da arena com dimensões de 22 x10 cm de diâmetro, com conexões de tubos de 20 cm de comprimento para recipientes de plástico (6 x 5 cm; Figura 7) contendo cinco gramas do suplemento produzido utilizando-se oitenta gramas do suplemento apícola, adicionado de vinte gramas de açúcar mais cinco gotas de essência floral para cada extremidade da arena. As essências utilizadas são registradas comercialmente como ARCOLOR com as variações: baunilha, cereja, acerola, laranja, limão, amarula mais o controle (suplemento sem essências). Foram liberadas 100 abelhas no centro da arena e avaliou-se a atratividade através do número de insetos que se direcionaram para o alimento com as respectivas essências após 30 minutos.

Os testes foram realizados através da metodologia aplicada por (PROCÓPIO et al.;2003) com adaptações referentes a apresentação dos índices, considerando a aplicação destes para atratividade.

Figura 11-Modelo de arena utilizada para realização dos testes de atratividade com essências na alimentação de abelhas operárias.



Fonte: a autora (2018).

Essências adicionadas ao suplemento apícola: (BAU)Baunilha,(CER)Cereja,(ACE)Acerola,(LAR) Laranja, (LIM) Limão; (AMA) Amarula e o (CTL) Controle.

Para comparação dos tratamentos, foi estabelecido um Índice de atratividade (IA), metodologia utilizada por Procópio et al.; (2003) com adaptações, em que:

$$IA = \frac{(\% \text{ de insetos no tratamento} - \% \text{ de insetos na testemunha})}{(\% \text{ de insetos no tratamento} + \% \text{ de insetos na testemunha})} \quad \text{Eq.: 11}$$

Em que:

BA.: -1,00 a -0,10, baixa atratividade;

MA: -0,10 a +0,10, tratamento com média atratividade;

AA: + 0,10 a +1,00, tratamento com alta atratividade.

Após a realização dos ensaios o suplemento foi elaborado utilizando a essência de maior atratividade, mais a associação de 20% de açúcar refinado, apresentando um aspecto de pasta, como mostra a figura 12, semelhante a pasta candi, comumente utilizada na alimentação de abelhas africanizadas.

Figura 12: Suplemento proteico apícola produzido a partir do cultivo microbiano de leveduras *S. cerevisiae* farinha de vagens de algaroba.



Fonte: autora (2019).

4.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO SUPLEMENTO APÍCOLA EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

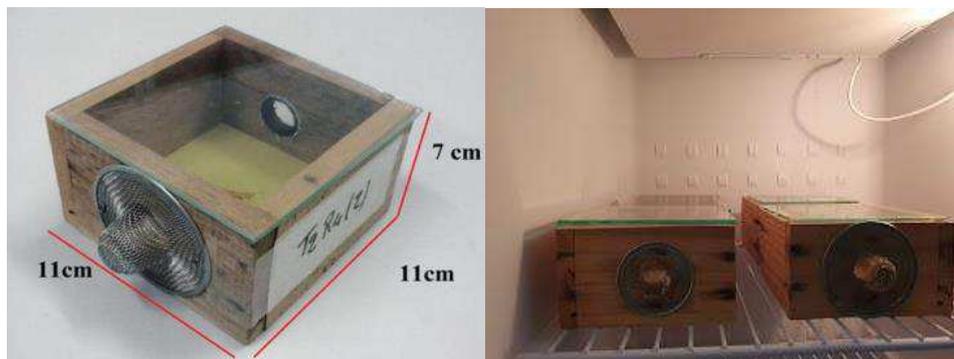
As avaliações de toxicidade foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, campus Pombal, Paraíba. As abelhas operárias recém emergidas de *Apis mellifera* foram retiradas de favos de cria, selecionados de colmeias provenientes do Apiário Maracajá no município de Condado-PB.

As avaliações da toxicidade do suplemento proteico apícola de farinha de vagens de algaroba, foram realizadas associando a pasta candi (pasta de açúcar e mel), com proporções de

25 %, 50%, 75% do suplemento mais um grupo controle de abelhas alimentadas apenas com pasta candi.

As abelhas capturadas foram mantidas em gaiolas de madeira, com 11 cm de comprimento, 11 cm de largura e 7 cm de altura. A parte superior fechada por uma lâmina de vidro para facilitar a observação das abelhas. As laterais das gaiolas apresentavam duas aberturas, uma vedada por uma tela de nylon para propiciar a entrada de ar e a outra por uma estrutura metálica em forma de cone utilizada para proporcionar conforto na circulação de ar no confinamento das abelhas (Figura 13).

Figura 13-Gaiola utilizada como unidade experimental nos tratamentos de toxicidade de abelhas. Pombal, 2019.



Fonte: Andrade (2017).

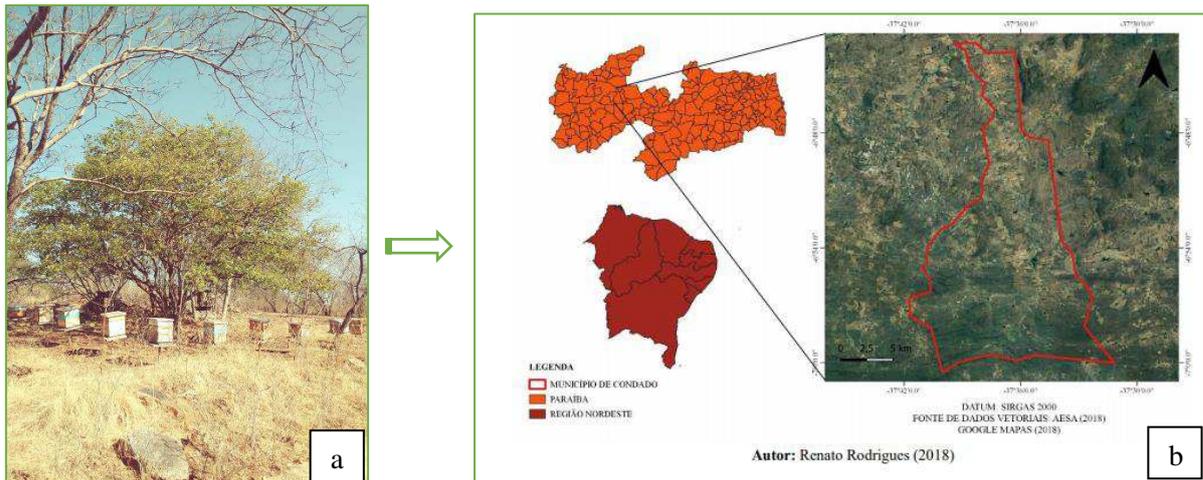
O experimento foi realizado a uma temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$. Este método é uma forma primária de observar o nível de toxicidade a partir da interação entre o inseto e a planta. O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados com cinco repetições.

A quantidade de abelhas mortas foi registrada diariamente. A análise de sobrevivência das abelhas foi realizada através de uma metodologia descrita por Motulsky (1995), onde se utiliza o método de Kaplan-Meier com a obtenção de curvas de sobrevivência através do software GraphPad Prism® 7 com aplicação do teste não paramétrico Log-Rank Test na comparação das curvas.

4.11 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NUTRICIONAL DAS ABELHAS ALIMENTADAS COM O SUPLEMENTO PROTEICO EM CAMPO

O experimento foi realizado entre os meses de outubro e dezembro de 2018, no Apiário Maracajá (figura 14 a), pertencente ao apicultor Almair de Albuquerque, localizado no município de Condado-PB (figura 14 b).

Figura 14: Apiário Maracajá(a), (b) localizado no município de Condado-PB.



Fonte: (a) autora (2018) e (b) Rodrigues (2019).

Foram utilizadas 30 colmeias modelo Langstroth com dez quadros de cria, povoadas com abelhas *Apis mellifera* que foram padronizadas antes da execução dos ensaios com rainhas de idades aproximadas. Em cada colmeia foram avaliados quatro quadros de cria, levando em consideração cria aberta e/ou fechada. Cada tratamento foi constituído de 10 colmeias sendo descritos a seguir na tabela 3:

Tabela 3- Descrição das formulações da suplementação apícola utilizado no experimento.

Suplementos utilizados na alimentação de abelhas africanizadas (fase experimental)

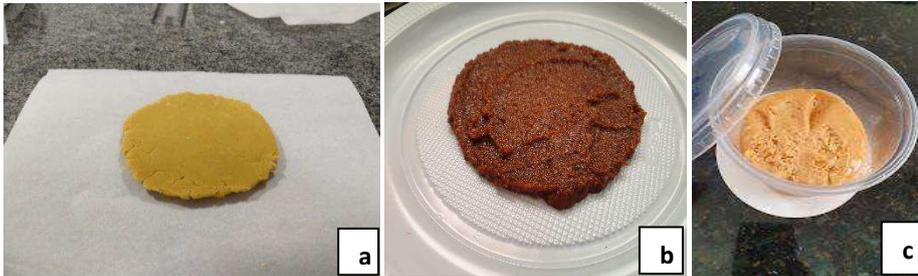
T1-200 g de suplemento: 120g de extrato de soja + 40 g de extrato de milho + 40 g de extrato de arroz (umedecido com 150 ml de xarope de açúcar, na proporção 1:1), figura **11a**.

T2-200 g de suplemento: 160g suplemento proteico a base de vagem de algaroba + 40 gramas de açúcar refinado. Figura **11b**.

T3-Pasta candi (associação de açúcar e mel) Figura **11c**.

As figuras 15 a, b e c respectivamente, apresentam os suplementos utilizados na experimentação de alimentação de abelhas.

Figura 15. (a) pasta de soja, extrato de milho e arroz, (b) pasta de vargens de algaroba enriquecidos com proteína microbiana e (c) pasta candi (associação de açúcar e mel).



As figuras 16a, 16b e 16c mostram o suplemento apícola e a maneira como foi aplicado.

Figura 16- Produção do suplemento nutricional proteico (a); preparação do suplemento nutricional proteico utilizando papel manteiga(b) e disposição do alimento sobre os quadros de cria(c).



A metodologia aplicada para esta avaliação do desenvolvimento das colmeias seguiu o método de Al-Tikrity et al. (1971), que consiste na mensuração da área de cria utilizando um suporte de madeira subdividido com fio de náilon ou arame em quadrados com área de 4 cm² (Figura 17). Nesta etapa do trabalho foi avaliado a área de cria total, nos meses de outubro e novembro de 2018.

Figura 17- Suporte utilizado para mensurar área de cria em colmeias Langstrot povoadas com abelhas *Apis mellifera*, Pombal-2018.



Fonte: autora (2018).

Os resultados foram transformados em área, multiplicando-se por 4 cm² a quantidade de quadrados preenchidos com cria aberta e fechada.

O experimento foi realizado em blocos casualizados (DBC), sendo dez blocos, cada um com os três tipos de alimentação. O efeito do tipo de alimentação sobre a área de cria aberta e fechada foi testado aplicando-se uma análise de variância seguida da comparação múltipla utilizando-se o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas a nível de 5% de probabilidade de erro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DE ALGAROBA

A farinha de algaroba apresentou os parâmetros físico-químicos apresentados na tabela 4.

Tabela 4– Características físico-químicas e química da farinha de algaroba.

Parametro físico-químico	Valor médio/ Desvio padrão
Umidade(%)(b.s)	5,78 ± 0,62
pH	5,30 ± 0,01
Cinzas (%)	2,75 ± 0,3
Açúcares redutores (mgAR/100g de farinha)	8,08 ±1,12
Proteínas (% b.s.)	9,70 ±0,66
Fibra Bruta(%)	19,18 ± 1,04
Lipídios(%)	2,62 ± 0,11
Carboidratos Totais	79,15 %
Valor Calórico Kcal/100g	379,88

Quanto a umidade, após o processamento das vagens de algaroba para elaboração da farinha obteve-se um percentual de 5,78%, o que contribuiu para estocagem do material, uma vez que esse parâmetro pode interferir na qualidade do produto em consequência de reações enzimáticas e desenvolvimento de micorganismo, caso os valores se apresentem acima do permitido pela legislação. Os resultados foram aproximados quando comparados com Silva et al. (2007), em que obteve uma umidade de 5,8% ao elaborar e caracterizar farinha de vagens de algaroba, como também Gusmão (2015) que mensurou o valor de 7,7% de umidade, em estudo onde desenvolveu biscoitos enriquecidos com farinha de vagens de algaroba.

O pH apresentou valores de 5,30 ± 0,01, Santos et al. (2010) destaca a necessidade de

conhecer os valores desse parametro em produtos alimentares, uma vez que esse dado pode contribuir nas formas de armazenamento. Os autores informam que as medidas de pH ótimo para desenvolvimento de microrganismos está ente 4,5 a 6,5, mais especificamente para levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, os dados encontrados na composição da farinha de algaroba estão de acordo com a proposta do trabalho.

Os açúcares redutores apresentados na composição da FA foi e $8,08 \pm 1,12$ (g/100g de farinha), esses valores podem variar de acordo com as condições de maturação do fruto. Silva et al. (2007) mensurou valores inferiores de açúcares redutores $4,6 \pm 0,3$ g/100g. Outras variações de AR foram apresentadas por Silva (2009), avaliando a composição de vagens de algarobeira coletadas aleatoriamente nos municípios paraibanos de Picuí (2,83 g/100g) e Patos (2,99 g/100g), ambos os municípios localizados na Paraíba.

O percentual de proteínas foi de $9,70 \pm 0,66$. Por se tratar de uma leguminosa, os dados referentes a esse parâmetro podem representar um ponto positivo no cultivo microbiano, uma vez que os valores iniciais de proteína bruta são considerados altos em relação a outros resíduos usados nesse processo biotecnológico, necessitando de um percentual inicial de levedura e substrato menor do que se o substrato tivesse um menos proteínas. Segundo De Groot, (1953) o nível ótimo de desenvolvimento das colônias de abelhas africanizadas ocorre quando se fornecem 20 a 23% de proteína bruta. Assim, o processo desenvolvido na presente pesquisa objetiva por meio do cultivo microbiano atender essa demanda proteica.

Quanto aos dados referentes a fibra bruta a caracterização demonstrou valores de $19,18 \pm 1,04$ %, condizendo com valores aproximados de fibra bruta (FB) encontrado em outros estudos. Muniz (2009) encontrou 15,9% ao desenvolver bioprodutos com a FA como matéria prima principal. Quanto ao percentual de lipídios, os valores encontrados foram de 2,62%. Percebe-se que esses valores apresentam variações quando reportados a literatura, observando os resultados de 4,06 % encontrados por Gomes (1987), 1,28% Gusmão(2015), 2,10%, Muniz (2009) e 5,49 Silva et al.(2007).

Os indices de carboidratos foram de 79,15%. Se comparados com Gusmão (2015) que indicou em sua pesquisa um valor de 74,5% desses nutrientes, demonstra-se um produto com potencial para alimentação animal, reforçado pelo valor clórico que foi de 379,88 Kcal/100g.

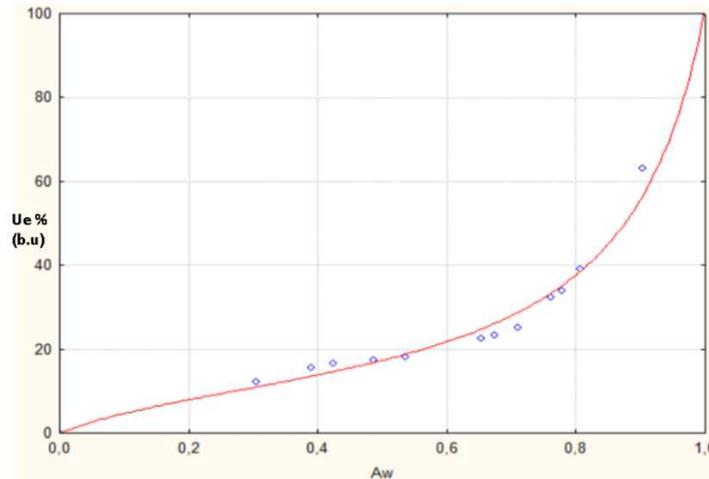
5.2 ATIVIDADE DE ÁGUA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO

Os dados experimentais da isoterma de adsorção de umidade de equilíbrio(Ue) da farinha de algaroba reumificada, expresso em base úmida, e atividade de água(Aw), obtidas na

temperatura de 30°C é apresentada na Figura 18.

O modelo matemático de GAB (Guggenheim, Anderson e Boer) foi usado para o ajuste dos dados experimentais.

Figura 18: Isoterma de adsorção de farinha de algaroba a 30°C.



Fonte: autora (2019).

A Tabela 4 apresenta os valores dos parâmetros do modelo de GAB, por meio desses valores pode-se obter os valores de atividades de água para a farinha o pó da vagem de algaroba nas umidades em que os cultivos microbianos foram realizados.

Tabela 5- Dados do ajuste da isoterma de dessorção da farinha de algaroba.

Parâmetros	X_m	C	K	R^2
Valores para Farinha de Algaroba	11,72	5,83	0,887	0,995

Pode-se observar que o perfil da isoterma descreve um comportamento classificado como Tipo III, características de alimentos ricos em componentes solúveis, a exemplo de açúcares (AL-MUHTASEB et al., 2002). A vagem da algaroba atende a essas características como pode-se observar pelo teor de açúcares redutores expresso em glicose de aproximadamente 8%, valor esse suficiente para que o crescimento do microrganismo fosse realizado utilizando-o como fonte de carbono e substrato limitante.

O valor de X_m de 11,72% expressa que abaixo desse valor de umidade de equilíbrio os microrganismos não se desenvolvem o que equivale a uma atividade de água igual a 0,33. No presente trabalho as fermentações foram realizadas em umidades de 60, 70 e 80%, o que corresponde a valores de atividades de água de 0,916; 0,945 e 0,967 respectivamente.

Para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo utilizado na presente pesquisa para enriquecer proteicamente e nutricionalmente a farinha da vagem da algaroba, a atividade de água do meio de cultivo necessário para crescimento microbiano é de aproximadamente 0,89, abaixo desse valor, o crescimento pode ser inibido. Assim, nas umidades usadas no cultivo da levedura na farinha de algaroba as atividades de água estavam acima da faixa mínima exigida para o microrganismo realizar seu crescimento celular, aumentando a sua massa celular e conseqüentemente o seu teor proteico.

5.3 CULTIVO MICROBIANO- CINÉTICA MICROBIANA

A tabela 6 apresenta os resultados do planejamento experimental, informando as variáveis de entrada umidade e concentração de leveduras e a variável resposta ganho proteico, além de demonstrar o tempo de cultivo do microrganismo com melhor desempenho em cada condição estabelecida no experimento.

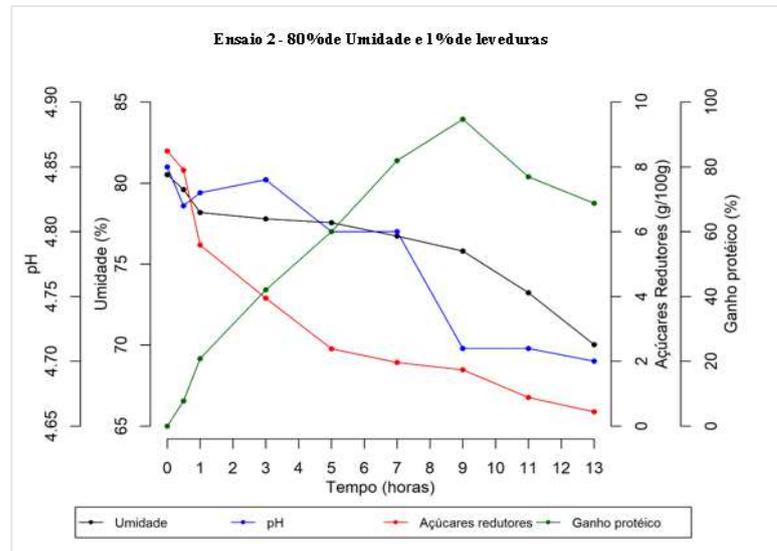
Tabela 6. Influência dos fatores umidade(U) e concentração de leveduras (CL) no ganho proteico (GP).

Ensaio	Conc. de lev. (CL)*	Umidade(U)*	Ganho proteico (GP)*%	Tempo de cultivo
1	- 1(1%)	- 1 (60%)	2,21	5 horas
2	-1(1%)	+1 (80%)	94,72	11 horas
3	+1(5%)	-1 (60%)	38,88	9 horas
4	+1(5%)	+1 (80%)	32,13	9 horas
5	0 (3%)	0 (70%)	55,01	11 horas
6	0 (3%)	0 (70%)	57,13	11 horas
7	0 (3%)	0 (70%)	57,16	11 horas

*U- Umidade, CL-Concentração de leveduras, GP-Ganho Proteico.

O ensaio 2 com umidade de 80% e C_L 1%, resultou em um ganho proteico de 94,72% (tabela 6) em 11 horas de cultivo microbiano. Esse resultado foi obtido devido ao percentual de umidade e atividade de água no sistema, favorecendo a dissolução dos nutrientes e o desenvolvimento fisiológico dos microrganismos.

Figura 19. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vagens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaios realizados na umidade inicial de 80% e concentração de levedura de 1%.



Nas condições do ensaio dois (figura 19) houve um consumo elevado de AR nas primeiras cinco horas do processo. Isso se reflete no metabolismo do microrganismo indicando que um aumento da umidade, consequentemente maior A_w , induz o crescimento mais rápido e a um maior índice proteico.

O crescimento celular e o ciclo celular são as funções biológicas básicas das células em proliferação. O termo crescimento é geralmente usado para indicar tanto o aumento da massa celular de uma célula individual quanto como o aumento no número de uma população celular. Durante o crescimento, as culturas de leveduras passam através de quatro fases: lag, log, desaceleração e estacionária (HELD, 2010; KOVAČEVIĆ, 2015). O crescimento celular é principalmente uma consequência da síntese de proteínas (ALBERGHINA et al., 2012).

Quando a umidade inicial foi maior, 80% a queda de umidade durante o processo foi menor, saiu de 80% para 70%, queda de 12,5%; quando a umidade inicial foi menor, saiu de 60% para 40%, queda de 33%, isso foi decisivo para a sobrevivência e crescimento microbiano, tanto é que para 80% de umidade não ocorreu valores negativos da variável resposta ganho proteico negativo. O pH independente das condições, não ocorreu grandes variações, o que se pode afirmar que o meio é tamponante.

Sabe-se que em ausência de meio tamponado, o valor do pH cai rapidamente durante as primeiras fases de cultivo e este fenômeno pode ser um reflexo da atividade da levedura, que está absorvendo aminoácidos, acumulando íons, excretando gás carbônico no meio ou mesmo excretando íons H^+ durante a geração de ATP pela respiração (extrusão de prótons

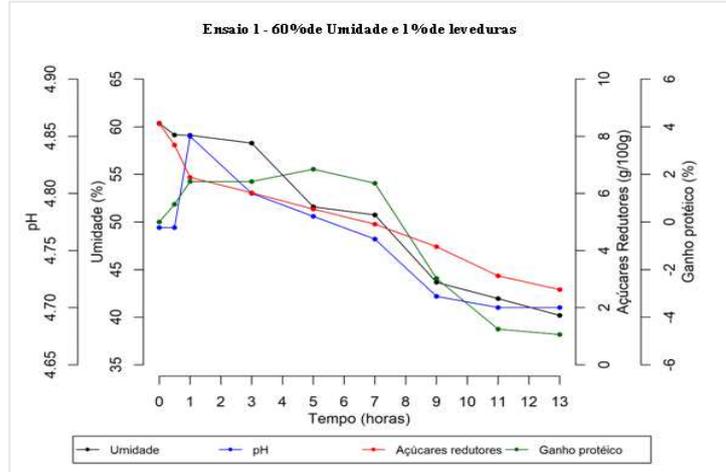
durante o transporte de elétrons pela Cadeia de Transporte de Elétrons – CTE), (DE MORAIS, 1984; NEVES, 2003).

As células geralmente ativam as vias metabólicas para obter os nutrientes essenciais suficientes para iniciar a atividade de crescimento. A duração e extensão da fase depende do tamanho inicial da população e condições ambientais (ou seja, temperatura, pH, álcool, oxigênio, concentração de sal, nutrientes etc.) Desde que a célula começa a metabolizar ativamente, ocorre a replicação do DNA, resultando em divisão (HELD, 2010). As células entram no rápido crescimento logarítmico, no qual o metabolismo é principalmente glicolítico (TISSENBAUM e GUARENTE, 2002).

Após algum tempo de duplicação, as células começam a esgotar os nutrientes da cultura, sua taxa de crescimento diminui e as células entram na fase estacionária. As leveduras que entram na fase estacionária ajustam seu metabolismo alterando a transcrição de centenas de genes, levando a muitas mudanças fisiológicas, incluindo o acúmulo de reservas de carboidratos e a montagem de uma parede celular resistente (WERNER-WASBURNE et al., 1993; SHERMAN, 2002). As células podem sobreviver na fase estacionária por longos períodos de tempo, retomando o crescimento quando condições são favoráveis. Eventualmente, as células entram na fase de morte se as condições não melhorarem (SHERMAN, 2002).

No ensaio 1 (figura 20), na $C_L 1\%$ e U. 60%, o resultado foi inverso, o crescimento microbiano foi limitado em relação as demais condições. Isso se deve as condições de A_w , encontradas no sistema. De acordo com (LEITÃO, 1987; KAREL; LUND, 2003) o crescimento microbiano é limitado pela atividade de água, e esta pode ser reduzida pela adição de um soluto. A membrana celular do microrganismo é muito permeável à água, mas seletivamente permeável aos solutos. Assim, abaixando a A_w de um alimento através de processos da adição de sal ou açúcar, o microrganismo libera água do seu interior (por osmose) para atingir o equilíbrio com o ambiente externo, fazendo com que perca sua atividade metabólica, seu crescimento seja inibido e permaneça em estado de dormência celular, podendo chegar à morte.

Figura 20. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vagens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaios realizados na umidade inicial de 60% e concentração de levedura de 1%.



No ensaio 3 (figura 21), houve uma diminuição na umidade de aproximadamente 17%, um valor considerável no cultivo, podendo limitar a fisiologia do microrganismo. Observa-se que a concentração de leveduras ao nível de 5%, apresentou um consumo lento e gradual dos açúcares redutores até 9 horas de cultivo, condição contrária ao ensaio 4 (figura 22), em que uma queda de umidade de 12,5%, menor do que o do ensaio 3, onde se percebe o consumo de praticamente todo o conteúdo de AR nas 3 primeiras horas de cultivo microbiano, o que demonstra também aumento rápido no percentual proteico nesse mesmo intervalo de tempo.

Figura 21. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vagens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaio realizado na umidade inicial de 60% e concentração de levedura de 5%.

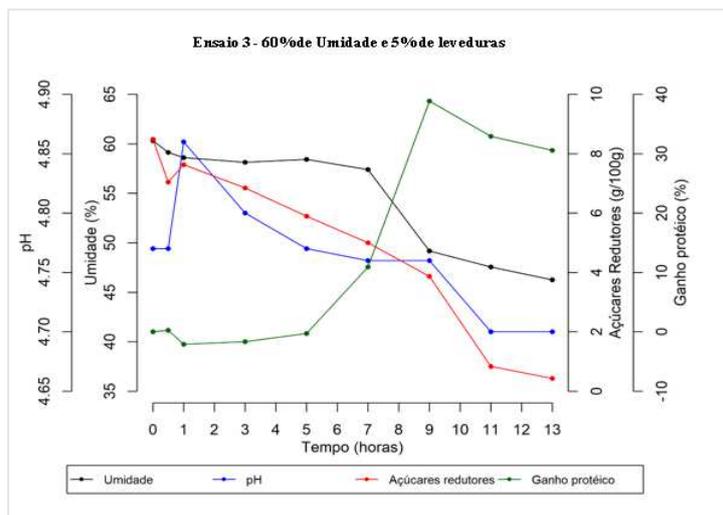
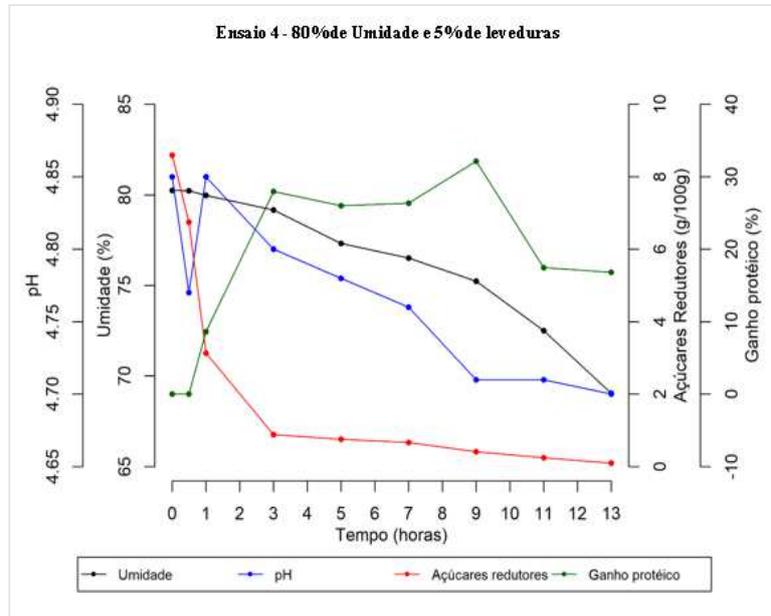


Figura 22. Cinética de crescimento microbiano em farinha de vagens de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaio realizado na umidade inicial de 80% e concentração de levedura de 5%.

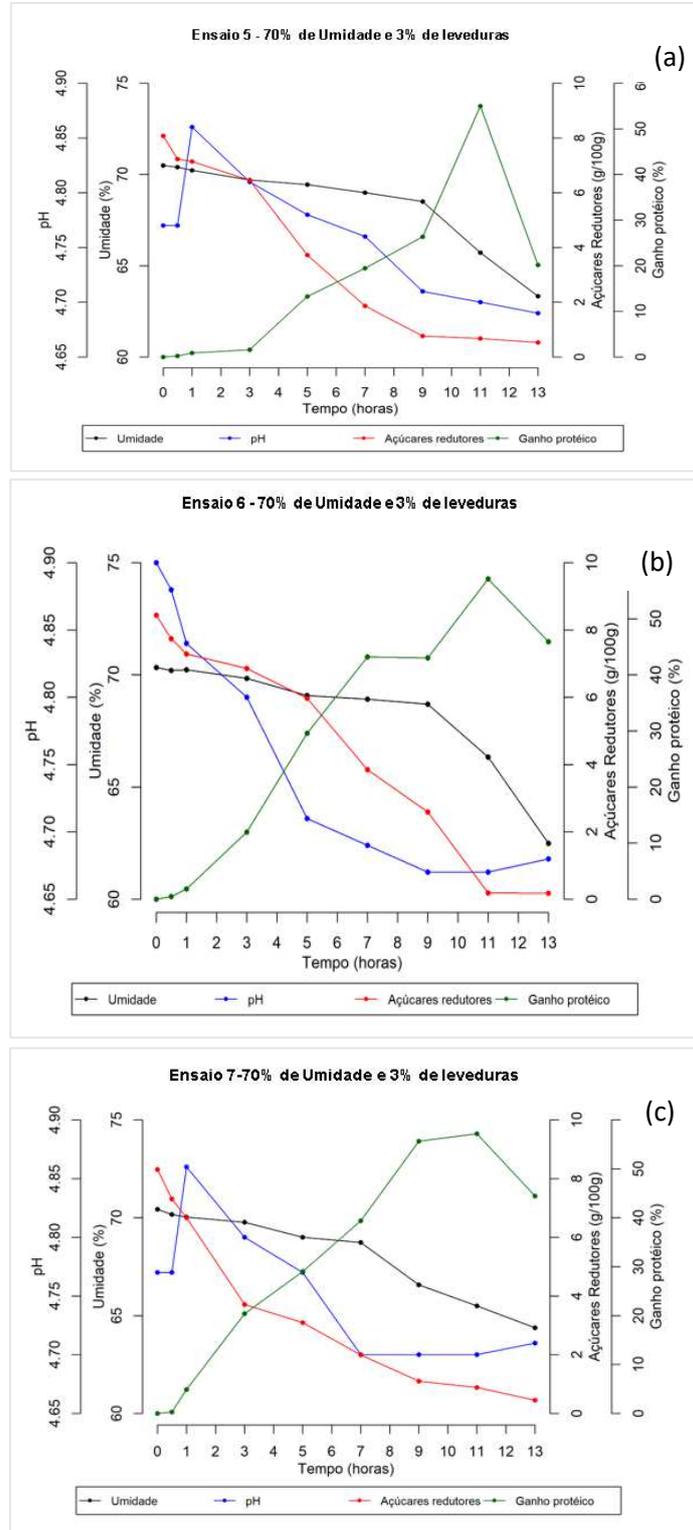


Assim, comprova-se que nas condições de cultivo microbiano estudado no presente trabalho para a farinha da vagem de algaroba como substrato, independente da concentração inicial de levedura, uma umidade maior favorece ao crescimento da levedura *S.cerevisiae*.

O ganho proteico expresso na condição do ensaio 3 (figura 21), foi de 1,4 vezes de ganho proteico, já na condição do ensaio 4 (figura 22) o ganho proteico foi de 1,32. Analisando as condições do comportamento do microrganismo, o tempo em que se obteve a melhor condição foi de 9 horas de cultivo para os dois ensaios e a concentração final de leveduras foi superior na umidade de 60%. O gráfico demonstra que houve um declínio mais rápido da umidade nas primeiras horas do ensaio, essa condição no ensaio 3 ocorreu de forma mais lenta do que no ensaio 4, podendo ter contribuído para o resultado devido a disponibilidade de água para o microrganismo.

Por meio do comportamento cinético nas condições de umidade inicial de 70% e concentração inicial de leveduras de 3%, ensaios do ponto central do planejamento experimental (ocorreu uma reprodução satisfatória, com o valor médio de ganho proteico de 56,43%).

Figura 23. Acompanhamento da cinética de crescimento microbiano na farinha da vargem de algaroba na temperatura de 30°C. Ensaios realizados na umidade inicial de 70% e concentração de levedura de 3% (a), (b) e (c).



Nos ensaios do ponto central, a umidade cai de 70% para 65%, queda de 7,1%, a menor entre os todos os experimentos, o consumo dos açúcares redutores se deu até as 11 horas de cultivo, chegando a níveis abaixo de 0,53 g/100g. O ganho proteico nos ensaios 5, 6 e 7 foi de 55,01%, 57,13% e 57,16% respectivamente.

Os índices de pH não sofreram variações significativas nos ensaios, verificou-se valores entre mínimo e máximo entre 4,6 e 4,90.

A análise de variância do ganho proteico confirma a significância da regressão e também permite afirmar que a mesma tem valor preditivo ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}} = 1,33$; Tabela 7 – ANOVA) o valor do ajuste encontrado foi satisfatório com ($R^2 = 0,92528$).

Tabela 7- Análise de variância para aumento proteico (ANOVA).

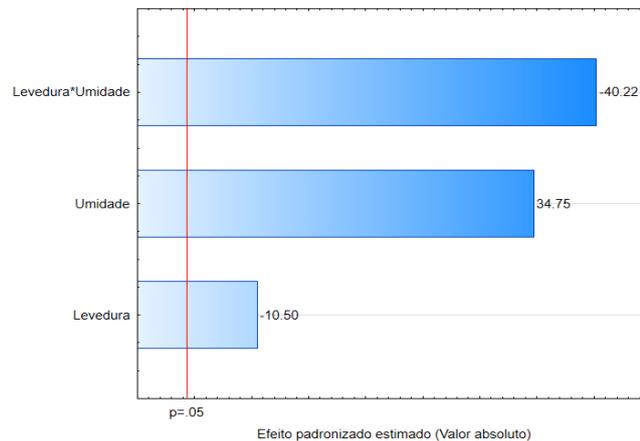
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	4469,33851	3	1489,77	9,54
Resíduo	360,94	3	120,3139	
Total	4830,28	6		
R^2	0,9253			
	$F_{\text{tabelado}}=1,33$		$F_{\text{calculado}}=12,70$	

SQ-soma dos quadrados; GL-grau de liberdade; MQ-média quadrática; Teste F-($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$).

Com relação aos resultados obtidos pelo teste F, Barros Neto e Scarmínio (1996) afirmam que sempre que a razão entre $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ for maior que 1 a regressão será estatisticamente significativa havendo relação entre as variáveis independentes e as dependentes. Para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4,0.

Tanto a porcentagem de umidade quanto a concentração de leveduras e a interação entre elas influenciaram significativamente o ganho proteico do suplemento apícola ($p < 0,05$; figura 24). A influência da umidade no aumento proteico tem sinal positivo, ou seja, ao passar do nível -1 para o nível +1 da umidade ocorre um aumento proteico, no entanto, a influência da concentração de levedura no aumento proteico tem sinal negativo, ou seja, ao passar do nível -1 para o nível +1 ocorre uma diminuição do aumento proteico. Além disso, o efeito da interação destes fatores foi significativo e superior ao efeito dos fatores isoladamente ($t = -40,23$; $p = 0,0006$).

Figura 24. Influência dos fatores U e CL no ganho proteico.

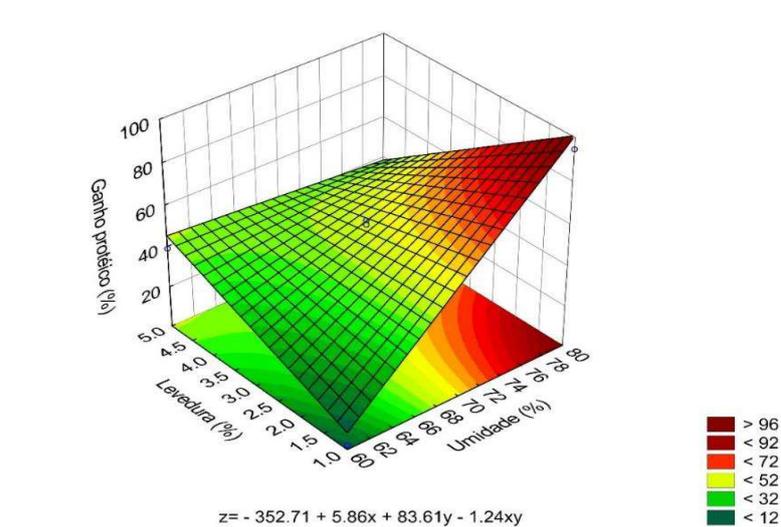


A partir dos resultados do ganho proteico obtidos de cada ensaio foi possível obter uma equação mediante regressão linear dos dados que relacionam o aumento do ganho proteico mediante as condições propostas no estudo, representados pela equação 11.

$$GP (\%) = \text{Equação: } -352,71 + 5,86U + 83,61CL - 1,24U \cdot CL \quad \text{Eq. (11)}$$

A figura 25 apresenta a superfície de resposta que mostra a influência da umidade inicial e concentração de leveduras no cultivo microbiano sobre o ganho proteico. A umidade contribuiu positivamente para o aumento proteico, ou seja, quanto maiores os seus valores maiores o ganho. No entanto, a interação entre estes fatores demonstra que à medida em que se aumenta a umidade o efeito das leveduras sobre as proteínas inverte-se. Assim, os maiores valores de ganho proteico foram encontrados no tratamento com maior umidade (80%) e menor concentração de leveduras (1%).

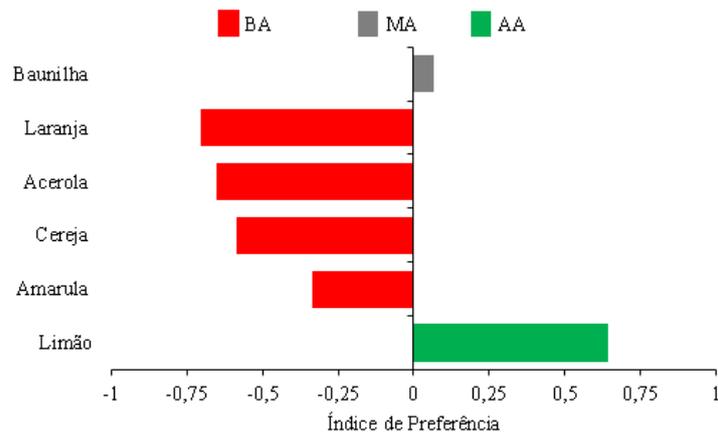
Figura 25. Influência das variáveis de entrada, concentração inicial de leveduras e umidade do substrato sobre o ganho proteico de farinha de vargens de algaroba.



5.4 RESULTADOS DOS TESTES DE ATRATIVIDADE COM ESSÊNCIAS FLORAIS

Na alimentação artificial de abelhas é importante considerar o fator de atratividade através do uso de essências ou aromas. Os resultados demonstraram que a essência de limão se destacou sendo considerada de alta atratividade, associada ao suplemento, com um índice de preferência entre 0,0 e 1,00 (figura 26).

Figura 26. Resultado do índice de atratividade de essências na alimentação de abelhas após 30 mim.



BA=Baixa atratividade; MA=Média atratividade; AA=Alta atratividade

A essência de baunilha, de acordo com a metodologia aplicada, se mostrou como média atratividade, com o índice de preferência entre -0,10 a + 0,10 e as demais se classificaram como baixa atratividade, com faixa de preferência entre 0 a -1. Almeida Neto et al. (2015), realizaram testes com aromas na alimentação energética de abelhas em condições de campo e os aromas com maior desempenho no recrutamento de abelhas foi amarula e baunilha. As essências florais são atrativos decisivos na elaboração de alimentos artificiais, na natureza essas substâncias contribuem para identificação das fontes alimentares naturais das abelhas, o nectar e o pólen.

As estratégias de alimentação artificial de abelhas com essências, são importantes uma vez que os apicultores necessitam manter seus enxames em períodos de escassez de flora apícola, o que justifica o uso de essências florais. As essências facilitam a aceitação do alimento, isso se deve ao fato de que na natureza essas substâncias funcionam como agentes atrativos na polinização. As abelhas possuem estruturas sensoriais responsáveis pelo direcionamento de odores de alimentos (PELOSI 2001; NAGNAN-LE MEILLOUR e JACQUIN-JOLY, 2003) são detectados por neurônios sensoriais olfativos. As moléculas odorantes alcançam os

dendritos desses neurônios olfatórios através de um meio aquoso através de proteínas de ligação a odores.

Em um contexto de forrageamento, as abelhas liberam o feromônio de Nasonov após aterrissar em uma fonte abundante de comida ou água, a fim de ajudar as demais a identificarem a localização. O feromônio de Nasonov, portanto, tem a mesma função que um perfume floral ao fornecer informações direcionais para procurar recrutas. Curiosamente, as abelhas raramente liberam o feromônio quando pousam em flores naturais, mas o fazem quando pousam em comedouros artificiais e anunciam fontes de água (FREE 1987; REINHARD E SRINIVASAN,2009). Presumivelmente, o aroma floral que emana de flores naturais é suficiente para guiar a busca por recrutas, enquanto fontes de alimento sem cheiro, como alimentadores de solução de açúcar ou água, requerem liberação de feromônio, já que é improvável que os recrutas encontrem esses locais.

5.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ABELHAS ALIMENTADAS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Com relação a avaliação de toxicidade do suplemento proteico, todos os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p=0,1973^{ns}$). Analisando a figura 23, é possível verificar que tanto o grupo controle, constituído de abelhas alimentadas com apenas pasta candi, quanto os ensaios com abelhas alimentadas com o suplemento apresentaram o tempo de 25 dias de sobrevivência (figura 27). De acordo com (Winston, 1979; Winston, Dropkin, e Taylor, 1981), operárias africanizadas, durante a estação seca na América do Sul, sobrevivem, em média, só 12 a 18 dias. As atividades das operárias influenciam, também, o seu tempo de vida. A longevidade das primeiras operárias africanizadas a emergirem na colmeia, depois que o enxame se estabelece, é a menor de todas as abelhas (Winston, 1979). Suas atividades em busca de alimento, associado as condições do ambiente interferem na sua longevidade, justificando ainda tais informações, a necessidade de se intensificar pesquisas sobre nutrição desses insetos.

Figura 27. Comparação pelo Log-rank test para todos os tratamentos de toxicidade de abelhas alimentadas com o suplemento a base de algaroba.

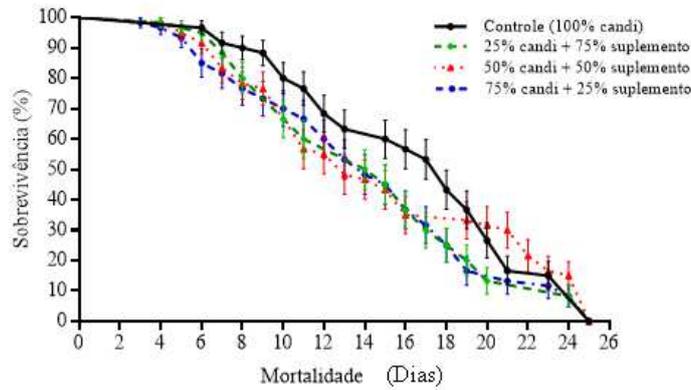


Tabela 8. Dados obtidos através da comparação das médias.

	GL	Qui-quadrada	P-Valor
Log-rank test	3	4,674	0,1973 ^{ns}

As abelhas buscam nas flores suas fontes alimentares, o néctar e o pólen, que possuem substâncias com níveis diferentes de toxicidade, sendo necessário avaliar as concentrações de produtos de origem vegetal ofertados na alimentação desses insetos. Na concepção de Rother et al., (2009) para que ocorra essa toxicidade é necessário que o animal se alimente quase que exclusivamente com determinada espécie, ou seja, em caso de fome e quando as opções são poucas, o que ocorre geralmente no período seco.

A avaliação de toxicidade do suplemento proteico elaborado a partir das vagens de algaroba atende um dos parâmetros de avaliação desenvolvido por outros pesquisadores, que mensuram sua aplicação através do tempo de vida de abelhas operárias recém emergidas alimentadas em condições controladas. O fracionamento do suplemento associado a outros ingredientes complementa os nutrientes essenciais as abelhas, porém torna-se imprescindível o conhecimento prévio do nível de toxicidade do alimento antes da sua aplicação escala no campo, evitando prejuízos na dinâmica de produção apícola.

Pereira et al. (2007) avaliou a existência de efeito tóxico de abelhas alimentadas com feno das folhas de mandioca (*Manihot esculenta*); feno das folhas de leucena (*Leucaena leucocephala*); farinha de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*); farinha de vagem de bordão-de-velho (*Pithecellobium cf. saman*); farelo de babaçu (*Orbygnia martiana*) e sucedâneo do leite para bezerros da marca Purina®. Dentre eles, a farinha de vagens de algaroba não apresentou interferência no tempo de vida das abelhas, sendo um produto que

apresenta um potencial nutritivo em relação a proteína bruta com valores médios de 9%, sendo possível um incremento de suas propriedades nutricionais alcançando níveis ótimos de proteínas exigidos por abelhas africanizadas, que segundo Segundo Azevedo-Benitez ; Nogueira-Couto (1998) o nível ótimo de desenvolvimento das colônias ocorre quando se fornece 20% de proteína bruta.

Sereia et al.,(2009), obtiveram um aumento de 41,5% na sobrevivência de abelhas africanizadas confinadas e alimentadas com suplemento a base de levedura de cerveja, óleo de linhaça e óleo de palma e resultou em um rico suplemento de vitamina B e ácidos graxos poliinsaturados e saturados. Os autores afirmaram que os ingredientes se tornaram recursos nutricionais que garantiram ótimo consumo e aceitação, baixa mortalidade e maiores taxas de longevidade, porém, se avaliar o custo de produção desses alimentos

5.6 RESPOSTA DO DESEMPENHO NUTRICIONAL DAS ABELHAS ALIMENTADAS COM O SUPLEMENTO PROTEICO

Ao obter resultados não significativos para toxicidade em percentuais crescentes do suplemento apícola associado a açúcar, os suplementos utilizados nesta etapa de campo, foram elaborados seguindo as recomendações dos níveis de proteínas (20 a 23%), os valores estão descritos na tabela 9.

Tabela 9: Dados referentes aos percentuais de proteína nos suplementos apícola.

Suplementos	Percentual proteico
T1-Suplemento de soja	Alimentação proteica (22,07±0,17) % de proteína bruta.
T2-Suplemento de algarora	Alimentação proteica (21,87±0,32) % de proteína bruta.
T3- Alimentação energética	Alimentação energética

O efeito do tipo de alimentação sobre a área de cria aberta e fechada foi testado aplicando-se uma análise de variância seguida da comparação múltipla utilizando-se o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas a nível de 5% de probabilidade de erro, como observado na tabela 10 e 11.

Tabela 10- Análises de variância para o efeito do tipo de alimentação (suplemento) sobre a área de cria aberta e fechada em 30 colmeias de abelhas.

Fonte de variação	g.l.	SQ	QM	F	P-valor
Suplemento	2	77034	38517	99,29	P < 0,001
Resíduos	27	10474	388		

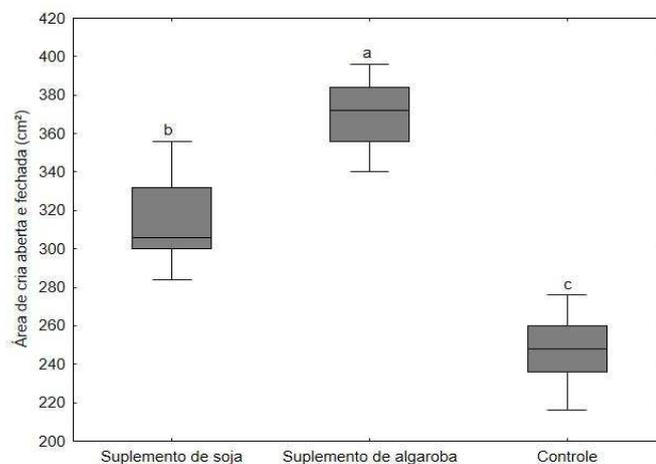
g1- Graus de liberdade;SQ-Soma dos quadrados;QM-Quadrado médio;F-valor de F.

Tabela 11. Comparação múltipla utilizando o teste de Tukey para o efeito do tipo de alimentação sobre a área de cria aberta e fechada em 30 colmeias de abelhas.

	Suplemento de soja	Suplemento de algaroba	Controle
Suplemento de soja		P < 0,001	P < 0,001
Suplemento de algaroba	Q = 9,184		P < 0,001
Controle	Q = 10,73	Q = 19,91	

De acordo com a figura 28, verifica-se que houve um melhor desempenho nas colônias alimentadas com o suplemento proteico a base de farinha de vagens de algaroba, com valor médio de desenvolvimento de área de cria de 370,8 cm²(CV%=4,71), seguido das colônias alimentadas com suplemento a base de soja, 307,6 cm²(CV%=7,06). O grupo controle apresentou valores inferiores, o valor médio da variável foi de 246,8 cm²(CV%=7,75)(figura 28).

Figura 28. Desempenho de colônias de abelhas africanizadas alimentadas com T1-suplemento de soja; T2-suplemento de algaroba e T3-xarope de açúcar.



Os suplementos 1 e 2 apresentaram valores proteicos aproximados-Suplemento 1 (22,07%) e o Suplemento 2 (21,07%), sendo que houve um melhor desempenho de colônias alimentadas com o suplemento 2. Possivelmente isso se deve a uma melhor absorção dos nutrientes advindos da biomassa microbiana em associação a farinha de algaroba. A alimentação suplementar proteica pode promover respostas fisiológicas iguais ou superiores ao pólen e a condição de absorção se reflete na produção de geleia real em abelhas operárias jovens. Crailsheim (1990), descreve que a digestão e absorção de proteína ocorre principalmente no intestino médio das abelhas, onde a proteína é hidrolisada por enzimas proteolíticas.

Para (BARKER, 1977) e (BRODSCHNEIDER,CRAILSHEIM, 2010) cerca de 40%

dos açúcares encontrados na soja, que são usados como substitutos do pólen, são tóxicos para as abelhas. A toxicidade é reduzida quando as abelhas tem bastante néctar ou quando esses carboidratos são diluídos experimentalmente para menos de 4% com solução de sacarose a 50%.

O grupo controle apresentou um baixo desempenho na área de cria, para Oliveira (2019) o resultado da baixa disponibilidade de fonte proteica (natural e artificial), na entressafra, reduz a produção da geleia real rica em proteínas, e a quantidade de alimento armazenado nos favos, o que inibe a postura pela rainha.

Abi sabi (2016), promoveu um estudo utilizando uma alimentação proteica para abelhas constituída de extrato de soja e albumina em pó adicionado de xarope de açúcar em colônias de abelhas africanizadas, o autor destaca que não houve estímulo para o desenvolvimento da área de cria em relação ao grupo controle (abelhas alimentadas com xarope).

Silveira Neto (2017) aplicou uma ração experimental formulada utilizando-se uma mistura de extrato de soja e albumina como ingredientes (79,44% e 20,56% da composição respectivamente) adicionando um xarope de água e açúcar, na proporção de 81,7% da mistura proteica e 18,3% do xarope de açúcar, perfazendo a ração pastosa com 25% de proteína bruta, a ração experimental não se mostrou eficiente em aumentar a área de crias para promover o crescimento populacional da colônia, apresentando resultados semelhantes aos da testemunha. A ração comercial (composta dos seguintes ingredientes: soja, milho, trigo, aveia, arroz, açúcar, baunilha, fosfato de cálcio e cloreto de sódio), por outro lado, além de não conseguir aumentar a área de cria, não se mostrou eficiente na manutenção. Os resultados mostraram que houve uma redução considerável da área de crias ao final do experimento. O autor não recomenda a utilização das rações experimentais para manutenção de enxames.

O simples fornecimento de alimentação artificial no período de escassez estimula a postura da rainha, o desenvolvimento das crias e consequentemente da colônia, e reflete positivamente na produção no período de safra seguinte, pois, sem a alimentação, as abelhas africanizadas utilizarão as primeiras floradas para o seu desenvolvimento, podendo atrasar o início do ciclo produtivo em até 50 dias (PEREIRA, 2005; SILVEIRA NETO, 2017). A oferta de alimentação proteica contendo 20% de proteína bruta proporciona um ganho de peso às colônias, provocado principalmente pelo aumento da área de reserva de mel e áreas de crias abertas e fechadas, podendo levar ao aparecimento e desenvolvimento de zangões nas

colônias (PEREIRA, et al., 2006; SILVEIRA NETO, 2017).

Alguns autores sinalizam para os efeitos tóxicos da utilização da soja, na literatura isso foi reportado por Haydak, (1949), onde o suprimento de farelo de soja causou uma redução abrupta na emergência de pupas, atribuindo-o à falta de aminoácido de niacina no farelo de soja. Notadamente, levando em consideração as peculiaridades alimentares desses organismos, há uma preocupação em elaborar suplementos que possam utilizar produtos livres de agrotóxicos e, que não sejam de origem animal e com aplicação de antibióticos ou não tenham origem de culturas de organismos geneticamente modificados, garantindo a dinâmica de sobrevivência de abelhas contribuindo para o equilíbrio desses insetos nos ambientes.

O desenvolvimento da área de cria foi satisfatório, contribuindo para o aumento populacional das colônias. Muitos estudos tem sido desenvolvidos com proposta de desenvolver alimentos proteicos que possam nutrir as abelhas em épocas de ausência de pasto apícola. Castagnino et al. (2004) ao utilizarem um composto de farelo de soja, farelo de milho e farinha de trigo como substituto de pólen, constataram um aumento na área de cria de colônias de abelhas africanizadas na ordem de 57%. Durante o desenvolvimento da rainha, desde larva até a sua emergência, ela é alimentada com geleia real, mas para que as operárias produzam a geleia real elas necessitam ingerir alimento, degradar e sintetizar esse alimento, para que a partir deste, as operárias, através de suas glândulas hipofaríngeas possam produzir a geleia real, e a qualidade desse alimento ingerido pelas operárias deve ser de boa qualidade (PEREIRA et al., 2015).

Ao considerar as fontes alternativas de alimentos proteicos para abelhas, é necessário considerar a origem do alimento, levando em consideração que naturalmente esses insetos dependem de fontes vegetais para manter sua nutrição (pólen e nectar floral). A biomassa microbiana resultante de processos do cultivo tendo como substrato produtos vegetais com valores médios de proteínas podem ser uma via promissora na obtenção de suplementos que venham garantir a manutenção de colônias de abelhas africanizadas na escassez alimentar. A viabilidade de produção de produtos a partir de cultivo microbiano é sustentável, uma vez que possibilita o uso de produtos vegetais regionais livres ou com baixa aplicação de insumos químicos. Constitui-se de um processo biotecnológico rápido e eficiente no melhoramento nutricional atuando como uma fonte valiosa no que se propôs na pesquisa.

6 CONCLUSÕES

A caracterização físico-química permitiu idetenticar valores médios de percentuais proteicos das vagens de algaroba de 9,70%, o que permitiu alcançar valores finais acima de 27% de proteína bruta, ao final do crescimento microbiano, com aumento proteico de 94,72 % em 11 horas de cultivo microbiano.

Na avaliação de preferência, onde houve a associação do supleno à essências florais, a essência de limão se destacou em relação as demais, sendo considerada a partir dos índices como alta atratividade.

O supleno nutricional proteico não apresentou toxicidade ao ser avaliado como alimento em abelhas africanizadas em todas as dosagens do planejamento experimental, promovendo um tempo médio de vida as abelhas de 25 dias.

O efeito do tipo de alimentação sobre a área de cria aberta e fechada foram significativas, onde o suplemento nutricional proteico promovel o desenvolvimento médio de área de cria de 370,8 cm² seguido das colônias alimentadas com supleno a base de soja, 307,6 cm²e o grupo controle apresentou valores inferiores, 246,8 cm².

7 SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

- Viabilidade econômica para produção do suplemento proteico apícola;
- Produção em escala do suplemento e estudo da vida de prateleira;
- Verificação da composição de aminoácidos do suplemento;
- Avaliação do desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas de abelhas alimentadas com o suplemento;

8 REFERÊNCIAS

ALAUX, C.; DANTEC, C.; PARRINELLO, H.; LE CONTE, Y. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. **BMC Genomics**, v.12, 2011. DOI: 10.1186/1471-2164-12-496.

ALBANEZ, J. R. (2000). Apicultura: manejo do apiário. EMATER-MG. Informe técnico. <https://www.emater.mg.gov.br/doc/site/serevicoseprodutos/livraria/Agroind%3%BAstria/Manejo%20do%20Api%C3%A1rio.pdf>

ALBANEZ, J. R. (2000). Apicultura: manejo do apiário. EMATER-MG. **Informe técnico**. <https://www.emater.mg.gov.br/doc/site/serevicoseprodutos/livraria/Agroind%3%BAstria/Manejo%20do%20Api%C3%A1rio.pdf>

ALBERGHINA, L.; MAVELLI, G.; DROVANDI, G.; PALUMBO, P.; PESSINA, S.; TRIPODI, F.; COCCETTI, P.; VANONI, M. Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces*

cerevisiae: Basic regulatory design and protein–protein interaction network. **BIOTECHNOL ADV**, 2012, 30, 52-72.

ALFONSUS, E. C. 1932. Swarming and supercedure. *Wis. Beekeeping* 8:34-36.

ALI, S, MUSHTAQ, J.; NAZIR, F.; SARFRAZ, H. Production and processing of single cell protein (SCP) - a review - **Ejpmr**,4(7), 86-94.2017.

ALMEIDA, F.A.C.; SILVA, J.E.; ARAÚJO, M.E.R.; GOUVEIA J.P.G.; ALMEIDA, S. A. Componentes químicos e estudo da umidade de equilíbrio em vagens de algaroba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.1, p.43-50, 2003.

AL-MUHTASEB, A. H., MCMINN, W. A. M., & MAGEE, T. R. A. (2002). Moisture sorption isotherm characteristics of food products: A review. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, 80(2), 118-128. <https://doi.org/10.1205/09603080252938753>.

AL-TIKRITY, W.S.; R.C. HILLMANN; A.W. BENTON; W.W. CLARKE, JR. A new instrument for brood measurement in a honeybee colony. **American Bee Journal** v.111, n.26, 1971.

AMDAM, G.V., HARTFELDER, K., NORBERG, K., HAGEN, A., OMHOLT, S.W., 2004. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? **Journal of Economic Entomology** 97, 741–747.

ANDRADE, A. B. A. **Potencial toxicológico in vitro do pólen de plantas apícolas da caatinga**. 2018. 42f. Dissertação (Mestrado Acadêmico) Universidade Federal de Campina Grande – Pombal – Paraíba – Brasil, 2018.

ANUPAMA; RAVINDRA, P. (2000). Value-added food: *Biotechnology Advances*, 18(6), 459–479. doi:10.1016/s0734-9750(00)00045-8.

AOAC 1995. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 16^a. edição. Arlington.

ASKARI, F. (2018). **Study of nutritive value and anti-nutritive compounds of Prosopis juliflora pods and leaves and effects of their use on Performance of HormozganTali goats**. Doctoral thesis, University of Zabol. 2018.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M.; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S. R. T. Conservação de grãos. Campinas: Fundação Cargill, 1998.

AZEVEDO-BENITEZ, A.L.G; NOGUEIRA-COUTO R. H. Estudo de algumas dietas artificiais visando a produção de geléia real em colméias de *Apis mellifera*. **IN: ENCONTRO SOBRE ABELHAS**, 3, 1998, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, 1998, p.227-230.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 1996. 299p.

BEKATOROU, A., PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A. Production of food grade yeasts. **Food Technol Biotech**, 2006, 44, 407-415.

BERTOLO, A. P.; BIZ, A. P.; KEMPKA, A. P., RIGO, E.; CAVALHEIRO, D. (2019). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. **Journal of Food Science and Technology** (August 2019) 56(8):3697–3706. doi:10.1007/s13197-019-03833-3.

- BITONDI, M.M.G., SIMÕES, Z.L.P. (1996) The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin, and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. **J. Apic. Res.** 35, 27-36.
- BLUMER, S.A.G. **Enriquecimento com ferro leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BOLAND, M. J., RAE, A. N., VEREIJKEN, J. M., MEUWISSEN, M. P. M., FISCHER, A. R. H., VAN BOEKEL, M. A. J. S., HENDRIKS, W. H. (2013). The future supply of animal-derived protein for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, 29(1), 62–73. doi:10.1016/j.tifs.2012.07.002 .
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HANSEN, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, 154(3), 87–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030.
- BRAGA, A. V.U. **Caracterização de atividade de água e cinética de desorção de água em alimentos**. 2016. 159f. Dissertação de Mestrado (Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 2016.
- BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v.41, p.278-294, 2010. DOI: 10.1051/ apido/2010012.
- BURKART, A. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). **Journal Of The Arnold Arboretum. Cambridge'**, p. 219-249. mai. 1976. Disponível em: Acesso em: 28 abr. 2019.
- BURKART, A. Materiales para una monografía del género *Prosopis* (leguminosae). **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 4, n. 1, p.57-128, abr. 1940. Disponível em: Acesso em: 28 abr. 2019.
- CAMPELO, R. Algarobeira: alternativa para o semi-árido brasileiro. Maceió, AL: UFAL, 1987. 25f. (UFAL. **Informe Técnico**).
- CAMPOS, J. B. de A. Apicultura: Perguntas e Respostas. Disponível em <http://www.apicultura.com.br/apifaq/>. Acesso em jan. 2018.
- CARDOZO, M. M. **Manejo do apiário localizado no complexo da cidade das abelhas – Florianópolis – SC**. 2014, 82 p. Trabalho de conclusão de curso (Agronomia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CARLSON, M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. **J. Bacteriol**, 1987, 169, 4873-4877.
- CASTAGNINO, G.L.B.; MESSAGE, D.; MARCO JÚNIOR, P. de. Fornecimento de substituto de pólen na redução da mortalidade de *Apis mellifera* L. causada pela cria ensacada brasileira. **Ciência Rural**, v.41, p.1838-1843, 2011. DOI: 10.1590/ S0103-84782011001000027.
- CASTAGNINO, G.L.B.; MESSAGE, D.; MARCO JÚNIOR, P.; FERNANDES FILHO, E.I. Avaliação da eficiência nutricional do substituto de pólen por meio de medidas de áreas de cria e de pólen em *Apis mellifera*. **Revista Ceres**, v.51, n.295, p.307- 315, 2004.
- CORREIA, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

- CRAILSHEIM, K. Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollm.). **Journal of Insect Physiology**. 1986; 32:629-634. 23.
- CRAILSHEIM, K., SCHNEIDER, L.H.W., HRASSNIGG, N., BÜHLMANN, G., BROSCHE, U., GMEINBAUER, R., SCHÖFFMANN, B. (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function, **J. Insect Physiol.** 38, 409–419.
- CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel. 1987. 226 p.
- CREMONEZ, T. M.; JONG, D.; BITONDI, M. M. G. Efeito da nutrição na saúde das abelhas. In: V ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2002, Ribeirão Preto. Anais... 5º Encontro sobre Abelhas, 2002.
- CREMONEZ, T.M., DE JONG, D., BITONDI, M.M.G. (1998) Quantification of hemolymph protein as a method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **J. Econ. Entomol.** 91, 1284–1289.
- CREMONEZ, T.M.; DE JONG D.; BITONDI M.M.G. 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology** 91: 1284-1289.
- DE GRANDI-HOFFMAN, G., CHEN, Y., HUANG, E.; HUANG, M. H. (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, 56(9), 1184–1191. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.03.017.
- DE GRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v.10, p.170-176, 2015. DOI: 10.1016/j.cois.2015.05.007.
- DE GROOT, A.P. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). 1953. Available at: Accessed on: 09 2019.
- DE MORAIS, S.M.F.; **Tolerância alcoólica, atividade fermentativa e permeabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae***. São Paulo, 1984.109f. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo.1984.
- DEL VALLE, F.R.; ESCOBEDO, M.; MUÑOZ, M.J. Chemical and nutritional studies on mesquite beans (*Prosopis juliflora*). **Journal of Food Science**, v.48, p.914-919, 1983.
- DI PASQUALE, G.; SALIGNON, M.; LE CONTE, Y.; BELZUNCES, L.P.; DECOURTYE, A. (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? 8(8): e72016.doi:10.1371/journal.pone.0072016.
- DIETZ, A. 1969. Initiation of pollen consumption and pollen movement through the alimentary canal of newly emerged honey bees. **Ann. Entomol.Soc. Amer.** 62:43-46.
- DOBZANŃSKI Z., JAMROZ D., GÓRECKA H., OPALIŃSKI S.: Bioavailability of selenium and zinc supplied to the feed for laying hens in organic and inorganic form. **EJPAU, ser. Animal Husbandry**, vol. 6, issue 2, 2003.
- DOBZANŃSKIZ., DOLIŃSKAB., CHOJNACKAK., OPALIŃSKIS., RYSZKA F.: The use of yeasts in livestock feeding. **Acta Sci. Pol., ser. Med. Vet.**, 5, 2, 49–66, 2006.
- DOELLE, H. W; MITCHELL, D. A; ROLZ, C. E. *Solid substrate cultivation*. Elsevier Science Publishers LTD,1992.

- DOLASEVIC, S., STEVANOVIC, J., ALEKSIC, N., GLAVINIC, U., DELETIC, N., MLADENOVIC, M.; STANIMIROVIC, Z. (2019). The effect of diet types on some quality characteristics of artificially reared *Apis mellifera* queens. **Journal of Apicultural Research**, 1–9. doi:10.1080/00218839.2019.1673965.
- DUSTMANN, J.H., VON DER OHE, W. (1988) Einfluß von Kälteeinbrüchen auf die Frühjahrsentwinklung von Bienenvölkern (*Apis mellifera* L). **Apidologie** 19, 245–254.
- ECKERT, J. E. The Pollen Required by a Colony of Honeybees. I. Econ. Entomol. 35: 309-311.1942. In: WINSTON, Mark L. **A biologia da Abelha**. Tradução de Carlos A. Osowski – Porto Alegre: Magister, 2003. 276p.
- ELLIS, A. M., HAYES, G. W. An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*), **Journal Apicultural Research**. v. 48, p. 215–216, 2009.
- ESKIN, M.; ROBINSON, D. S. Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes. Nova York: **CRC Press**, 2000.
- EVANGELISTA RODRIGUES, A.; PEIXOTO, J. P. N.; MARCELO LUIS RODRIGUES, M. L.; ALVES, A. J.; GOIS, G. C. Efeito da própolis em microorganismos do líquido ruminal. **Biofarm**, v.5, n.1, p. 64-69, 2011.
- FAO - **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**. Faostat. 2019. Disponível em:. Acesso em: 02 de outubro de 2019.
- FELDMANN H. Yeast: Biologia Molecular e Celular. Wiley-Blackwell; 2010.
- FIORENTIN, L. D., MENON, B. T., BARROS, S. T. D., PEREIRA, N. C., LIMA, O. C. M., MODENES, A. N. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial bagaço de laranja. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.6, p.653–659, 2010.
- FORD, J.T., WONG, C.W., COLDITZ, I.G., 2001. Effects of dietary protein types on immune responses and levels of infection with *Eimeria vermiformis* in mice. **Immunology and Cell Biology** 79, 23–28.
- FREE, J.B. *Pheromones of social bees*. Chapman and Hall Ltda: **London**, 218p.1987.
- FREITAS, Débora Gaspar Feitosa. **Nível tecnológico e competitividade da produção de mel de abelhas (*Apis mellifera*) no Ceará**. 101 f. (Dissertação de Mestrado em Economia Rural) - UFC/CCA/DEA, Fortaleza, 2003.
- FRIEDMAN, N. As Crônicas do Laboratório Friedman. Leveduras em crescimento (Roboticamente) **Nir Friedman Lab**. 2011.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L; BATISTA; G.C; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; GERVASI, T.; PELLIZZERI, V.; CALABRESE, G.; DI BELLA, G.; CICERO, N.; DUGO, G. (2017). Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. **Natural Product Research**, 32(6), 648–653. doi:10.1080/14786419.2017.1332617.
- GILLIAM, M.; PREST, D. B.; LORENZ, B. J. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. **Apidology**, Tucson, n. 20, p. 53-68, 1989.
- GILLIAN, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letters** 155: 1-10.
- GOMES, P. A algarobeira. 2ed .Mossoró: **Ministério da Agricultura**, 1987. 49p.

- GRELA E.R., SEMENIUK W.: Probiotics in animal production. **Med. Wet.**, 55, 222–228, 1999.
- GUZMAN-NOVOA, E., PAGE, R.E., GARY, N.E., 1994. Behavioral and life history components of division of labor in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Behavioral Ecology and Sociobiology** 34, 409–417.
- HAGERDORN, H. H., AND F. E. MOELLER. 1967. The rate of pollen consumption by newly emerged honeybees. **J. Apic. Res.** 6:159-162.
- HAYDAK, M.H. 1935. Brood rearing by honey bees confined to a pure carbohydrate diet. **J. Econ. Entomol.** 28: 657-660.
- HAYDAK, M.H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology** n.15, p. 143-156, 1970.
- HELD, P. Monitoring growth of beer brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Application Note, Monitoring of Cell Suspensions by Kinetic Absorbance Measurements, 2010.
- HEPBURN, H.R.. Absconding, migration and swarming in honeybees: An ecological and evolutionary perspective. *Life Cycles in Social Insects: Behaviour, Ecology and Evolution*. V. E. Kipyatkov (Ed.), St. Petersburg University Press, St. Petersburg, pp. 121–135, 2006.
- HERBERT, E.W., SHIMANUKI, H. CARON, D. (1977) Optimum protein levels required by honoç bey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing, **Apidologie** 8, 141–146.
- HIRSCHFELDER, H (1951) Quantitative Untersuchungen zum Polleneintragen der Bienenvölker *Zeitschrift für Bienenforschung* 1: 67-77.
- HRASSNIGG, N.; K. CRAILSHEIM. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*), **Apidologie** 36: 255 – 277, 2005.
- IAL. 2008. **Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4.ed. São Paulo: IAL. 1020p
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; NGO, H.T.; BIESMEIJER, J.C.; BREEZE, T.D.; DICKS, L.V.; GARIBALDI, L.A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A.J.; AIZEN, M.A.; CUNNINGHAM, S.A.; EARDLEY, C.; FREITAS, B.M.; GALLAI, N.; KEVAN, P.G.; KOVACS-HOSTYANSZKI, A.; KWAPONG, P.K.; LI, J.; LI, X.; MARTINS, D.J.; NATES-PARRA, G.; PETTIS, J.S.; RADER, R.; VIANA. B.F. (eds.). Bonn, Germany: 2016.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4° Ed. São Paulo: IAL, 2008. P. 117 a 118.
- JONGBLOED A.W., KEMME P.A., DE GROOTE G., LIPPENS M., MESCHY F.: Bioavailability of major and trace minerals. International Association of the European (EU) Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials, **EMFEMA** Brussels, 2002.
- KAEBERLEIN, M. Lições sobre longevidade de levedura em flor. **Natureza**. 2010; 464 (7288): 513-9. doi: 10.1038 / nature08981.
- KAMINOGAWA, S., NANNO, M., 2004. Modulation of immune functions by foods. **Advance Access Publication** 1, 241–250.
- KAREL, M.; LUND, D. B. *Physical Principles of Food Preservation*. CRC Press, 2003.
- KELLER, I, FLURI, P, IMDORF, A (2005) Pollen nutrition and colony development in honey bees, Part II. **Bee World**. 86: 27-34.

- KHAN, A. S.; MATOS, V. D.; LIMA, P. V. P. L. Desempenho da apicultura no estado do Ceará: competitividade, nível tecnológico e fatores condicionantes. **RESR**, Piracicaba, SP, v. 47, n. 3, p. 651-675, jul./set. 2009.
- KORNIEWICZ A., DOBRZAŃSKI Z., KOŁACZ R., KORNIEWICZ D.: Bioavailability of zinc, selenium and chromium from yeasts *Saccharomyces cerevisiae* for swine. **Chem. Agric.**, vol. 4, 171–181, 2003.
- KOVAČEVIĆ, M. Morphological and physiological characteristics of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells differing in the life span. 2015.87f.(MASTER THESIS) University of Zagreb, **Faculty of Pharmacy and Biochemistry**.2015.
- KUROZAWA, L.E., EL-AOUAR, A.A.; MURR, F.E.X. Obtenção de isoterma de dessorção de cogumelo *in natura* e desidratado osmoticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, 25(4): 828-834, out.-dez. 2005.
- LE CONTE, Y.; BRUNET, J-L, MCDONNELL, C.; DUSSAUBAT, C.; ALAUX, C. (2011) Interactions between risk factors in honeybees. In: D Sammataro J Yoder. Recent Investigations into the Problems with our Honey Bee Pollinators. Taylor & Francis Inc.. pp. 215-222.
- LEITÃO, M. F. F. Atividade de água e transformações microbiológicas de deterioração. I Seminário sobre Atividade de Água em alimentos. Anais, 1987.
- LEGLER, S. Princípios básicos na nutrição alimentar de abelhas. In: SEMINÁRIO ESTADUAL DE APICULTURA, 8, EXPOAPIS, 7, ENCONTRO ESTADUAL DE MELIPONICULTORES, 2., 2003, Horizontina, RS. **Anais** 2003. CD-ROM.
- Li C, Xu B, Wang Y, Feng Q, et al. (2012). Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). **Apidologie** 43: 576-586
- LI, C. et al. Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). **Apidologie**, 43: 576. 2012.
- LINS, S.A.S. PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES A PARTIR DO SORGO SACARINO, 125p,2017. **Tese de doutorado** (Engenharia Química) Universidade Federal de Campina Grande, 2017.
- LOUVEAUX, J..Recherches Sur la Recolte du Pollen par les Abeilles (*Apis mellifica* L.). Ann. Abeille 1: 113-188, 197-221.1958. In: WINSTON, Mark L. A biologia da Abelha. Tradução de Carlos A. Osowski – Porto Alegre: Magister, 2003. 276p.
- MADIGAN, M. T.; STAHL, D. A.; BUCKLEY, D. H.; BENDER, K. S.; MARTINKO, J. M. MICROBIOLOGIA DE BROCK. 14 ed. São Paulo: **Artmed**, 2016.
- MAKAWY, M. M.; EL-SAYD, N. I. Comparison of Methods for Determination of Moisture in Food 1. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 6, n. 6, p. 906–911, 2010.
- MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. C. C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.949-953, maio/jun.2006.
- MARTIN, S. G.; ARKOWITZ, R. A. Cell polarization in budding and fission yeasts. **FEMS Microbiol Rev**, v. 38, p. 228–253, 2014.

- MARTINS, J.R., NUNES, F.M.F., SIMÕES, Z.L.P., BITONDI, M.M.G. (2008) A honeybee storage protein gene, hex 70a, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. **J. Insect Physiol.** 54, 867-877.
- MATELES, RI.; TANNENBAUM, S.R Single-ce/1 protein. Massachussets: MIT Press, 1968. 480p.
- MATTILA, H.R., OTIS, G.W., 2007. Dwindling pollen resources trigger the transition to broodless populations of long-lived honeybees each autumn. **Ecological Entomology** 32, 496–505.
- MAURIZIO, A. (1954) Pollenernährung und Lebensvorgänge bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). **Landwirtsch. Jahrb.** Schweiz. 245, 115-182.
- MAURIZIO, A. 1950. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honeybee. **Bee World.** 31,9-12.
- MEDEIROS, M. A.; RIET-CORREA, F.; PESSOA, A.F.A.; PESSOA, C.R.M.; BATISTA, J.A.; DANTAS, A. F.M.; MIRANDA NETO, E.G.; MEDEIROS, R.M.T. Utilização de vagens de *Prosopis juliflora* na alimentação de bovinos e equinos. **Pesq. Vet. Bras.** 32(10):1014-1016, outubro 2012.
- MEKONNEN, M.M, HOWKSTRA, A.Y. Water footprint benchmarks for crop production: A first global assessment. **Ecological Indicators.** 2014; 46: 214–23.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORAIS, M.; TURCATTO, A.; A. PEREIRA, R.; FRANCOY, T.; GUIDUGLI-LAZZARINI, K.; GONÇALVES, L.; ALMEIDA, J.; ELLIS, J.; DE JONG, D. (2013). Protein levels and colony development of Africanized and European honey bees fed natural and artificial diets. **Genetics and molecular research: GMR.** 12. 6915-22. 10.4238/2013.December.19.10.
- MOREIRA, I.; MURAKAMI, A.E.; SCAPINELLO, C Utilização da levedura desidratada como fonte de proteína para suínos em crescimento e terminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 316-1160, 1998.
- MORSE R. A.; CALDERONE, N.W. The value of honey bee pollination in the United States, **Bee Culture**, v. 128, p. 1–15, 2000.
- MORSE R.A.; CALDERONE, N.W. The value of honey bee pollination in the United States, **Bee Culture**, v. 128, p. 1–15, 2000.
- MORTON, K. The food of worker bees of different ages. **Bee World.** 32:78-79. 1950.
- MOTULSKY, M. D. H. Intuitive Biostatistics, New York: **Oxford University Press**, 1995. 386 p.
- MUNIZ, C. E. de S. **Elaboração de barras de cereais utilizando resíduos agroindustriais de goiaba e caju enriquecidos proteicamente por via microbiana.** 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2017.
- MUNIZ, M. B. **Processamento das vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) para produção de bioprodutos.** 2009. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2009.

- NAGNAN-LE MEILLOUR, P, JACQUIN-JOLY, E. (2003). Biochemistry and diversity of insect odorant-binding proteins. In Blomquist GJ, Vogt RG (eds.), **Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology**. London: Elsevier.
- NASSERI, A. T., RASOUL-AMINI, S., MOROWVAT, M. H., GHASEMI, Y. (2011). Single cell protein: production and process. *Am. J. Food Technol.* 6, 103–116. doi: 10.3923/ajft.2011.103.116
- NAUG, D (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. **BiolConserv** .142: 2369-2372. doi:10.1016/j.biocon.2009.04.007.
- NEUMAIER, R. et al. Ação de dois modelos de alimentadores sobre o desenvolvimento intrínseco de colméias de abelhas africanizadas. In: CONGRESSO CATARINENSE DE APICULTORES, 1., Urussanga, SC. Anais...1994. p. 60.
- NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. A. *Apicultura: Manejo e produtos*. Jaboticabal: FUNEP, 154 p. il, 1996.
- NOGUEIRA-COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A.. *Apicultura: manejo e produtos*. 3ed. Jaboticabal: FUNEP, 192p.2006.
- OLIVEIRA, R. P.; OLIVEIRA, W. F.; SOUZA, P.E.R. Avaliação da utilização e do consumo do açúcar cristal como alimento energético para colônias de *Apis mellífera* africanizadas. 7° JORNADA CIENTIFICA E TECNOLÓGICA DO IFSULDEMINAS. 4° SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO. Poço de Caldas- MG. 2015.
- PANESAR, P.S., KAUR, R., SINGLA, G., SANGWAN, R.S. Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Appl. Food Biotechnol**, v. 3, n. 4, p. 208-227, 2016.
- PANZENBOCK, U.; CRAILSHEIM, K. Glycogen in honeybee queenas, workers and drones (*Apis mellifarcarnica*Pollm.). **Journal of Insect Physiologi**, v. 43, n. 2, p. 155- 165, 1997.
- PARMAR, I., RUPASINGHE, H.V., 2012. Optimization of dilute acid-based pretreatment and application of laccase on apple pomace. **Bioresour. Technol.** 124, 433–439.
- PAULINO, F. D. G. *Apicultura – Manual do Agente de Desenvolvimento Rural*. Brasília, DF: SEBRAE: Alimentação Artificial, cap. 13, p. 107-114, 2004.
- PELOSI, P. (2001). The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. **CMLS** 58:503—9.
- PEPPLER, H.J. Food Yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. EDS. *The yeasts*. London: Academic Press, 1970, cap.8: p.421-457.
- PERAZZO NETO, A. *Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus - indica* Mill) e vagens de algaroba (*Prosopisjuliflora*) com *Aspergillusniger**. 1999. Tese (Doutorado). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- PEREIRA, D. S.; PAIVA, C. S.; COELHO, W. A.C.; HOLANDA-NETO, J.P.; SILVA, A. F. MARACAJÁ, P. B. Peso de rainhas virgens africanizadas produzidas em colônias submetidas a diferentes suplementações alimentares em Mossoró-RN, Brasil. **ACTA Apicola Brasílica** - (Pombal - PB) v. 03, n.1, p.18 - 24, jan-dez, 2015.
- PEREIRA, F. de M.; VILELA, S. L.O. Estudos da cadeia produtiva do mel no estado de Alagoas. Teresina: SEBRAE, 2003. 65 p.

- PEREIRA, F. de M. Desenvolvimento de rações protéicas para abelhas *Apis mellifera*. 2005. 171f. Tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- PEREIRA, F.M.; FREITAS, B.M.; LOPES, M.T. R. Nutrição e alimentação das abelhas. Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, 2011. 113p.
- PEREIRA, F.M.; FREITAS, B.M.; VIEIRA NETO, J.M.; RÊGO, M.T.; LOPES, M.T.R.; BARBOSA, A.L.; CAMARGO, R.C.R.; RIBEIRO, V.Q.; ROCHA, R.S. Efeito tóxico de alimentos alternativos para abelhas *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v:37, p.533-538, mar-abr, 2007.
- PERNAL, S.F.; CURRIE R.W.. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**. 31: 387-409.
- PÉTER, G.; ROSA, C. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. New York: Springer **Berlin Heidelberg**, 2005.
- PINTO, M. R. R. **Alimentação de *Apis mellifera* africanizadas: relação com a fisiologia, produção, sanidade e segurança alimentar**. 2010. 100f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de Concentração: Sanidade Animal. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.
- POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v.25, p.345-353, 2010. DOI: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- PROCÓPIO, S. O.; J. D. Vendramim; J. I. Ribeiro Júnior & J. B. Santos. 2003. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação à *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 27: 1231–1236.
- PROCOPIO, S.O.; VENDRAMIM, J. D; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; SANTOS, J.B. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação A *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Ciênc. agrotec.** [online]. 2003, vol.27, n.6, pp.1231-1236. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542003000600004>.
- RABÊLO, T. C. B. **Enriquecimento proteico da algaroba utilizando *Saccharomyces cerevisiae***. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2011.
- RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances** 2000;18: 459–79.
- REBOUÇAS, G. M. N. **Farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) na alimentação de ovinos Santa Inês**. Itapetinga: UESB, 2007. 44p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Produção de Ruminantes). 2007.
- REED, G. Use of microbial cultures: yeast products. **Food Technology**, 1981' p.89-94.
- REID, D. S.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. Química de Alimentos de Fennema. 4ª. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010. p. 25-74.
- REINHARD, J.; V.; SRINIVASAN, M. (2009). The Role of Scents in Honey Bee Foraging and Recruitment. DOI:10.1201/9781420075618.ch9.
- RIBASKI, J.; DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R.; NASCIMENTO, C. E. de S. Algaroba (*Prosopis juliflora*): Árvore de uso múltiplo para a região Semiárida Brasileira. Comunicado Técnico 240, **Colombo**, 2009.

- RIBBANDS, C. R.. The Behaviour and Social Life of Honeybees. London, Bee Reserch Association. 1953. In: WINSTON, Mark L. A biologia da Abelha. Porto Alegre: Magister, 2003. 276p.
- RIET-CORREA, F.; ANDRADE, F.R.M.; Fabrício K.L. CARVALHO, F.K.L.; TABOSA, I.M.; GALIZA, G.J.; BERNARDINO, J.N.; SIMÕES, S.V.D.; MEDEIROS, R.M.T. Utilização de vagens de *Prosopis juliflora* na alimentação de ovinos e caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. 2012, vol.32, n.10, pp.987-989. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001000006>.xc.
- RITALA, A; HÄKKINEN, S.T, TOIVARI, M, WIEBE, M.G. Single Cell Protein-State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001-2016. *Front Microbiol.* 2017; 8:2009. Published 2017 Oct 13. doi:10.3389/fmicb.2017.02009.
- RITZ, B.W., GARDNER, E.M., 2006. Malnutrition and energy restriction differentially affect viral immunity. *The Journal of Nutrition* 136, 1141–1144.
- ROIG, F. A. Informe nacional para seleccion de germoplasma en especies de *Prosopis* de la Republica Argentina. In: REUNION REGIONAL PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE DE LA RED DE REFORESTACIÓN DEL CIID, CONSERVACIÓN Y MEJORAMIENTO DE ESPECIES DEL GÉNERO PROSOPIS, 5., Mendoza, Anais. **Contribuciones mendoncinas.** 1993. p. 1-36.
- ROSOV, S. A.. Food Consumption by Bees. *Bee World.* 25: 94-95.1944. In: WINSTON, Mark L. A biologia da Abelha. Tradução de Carlos A. Osowski – Porto Alegre: Magister, 2003. 276p.
- ROTHER, D. C.; SOUZA, T. F.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Suscetibilidade de operárias e larvas de abelhas sociais em relação à ricinina. *Iheringia*, v.99, n.1, p.61-65, 2009.
- ROUBIK, D.W. *Ecology and natural history of tropical bee.* Cambridge **Tropical Biology Series.** 1989. 514 p.
- ROWLEY, A.F., POWELL, A., 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology* 179, 7209–7214.
- ROY, R.; SCHMITT, A.J.; THOMAS, J.B.; CARTER, C.J. Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science*, v. 262, p. 148-164, 2017.
- RUEPPELL, O., BACHELIER, C., FONDRK, M.K., PAGE Jr., R.E., 2007. Regulation of life history determines lifespan of worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Experimental Gerontology*, 42, 1020–1032.
- SABBAG, O. J.; NICODEMO, D. Viabilidade econômica para produção de mel em propriedade familiar. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 94-101, 2011.
- SALOMÉ, J. A. **Manutenção de colméias frente às pressões ambientais.** Sistema de inteligência setorial. jun. 2009. 20p.
- SALVADOR, B. M.; ROSÁRIO, F. M.; BÖHM, F. M. L. Z. Conhecendo as Abelhas sem Ferrão. *Diálogos e Saberes*, Mandaguari, v.4, n.1, p. 9-16, 2008.
- SALVADOR, B. M.; ROSÁRIO, F. M.; BÖHM, F. M. L. Z. Conhecendo as Abelhas sem Ferrão. *Diálogos e Saberes*, Mandaguari, v.4, n.1, p. 9-16, 2008.
- SANDULACHI, E. Water Activity Concept and Its Role In: Food Preservation. *Meridian Engineering*, v. 4, p. 40–48, 2012.

SANTOS, C. S.; RIBEIRO, A. S. Apicultura: uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista Verde, Mossoró, RN**, v. 4, n. 3, p. 1-6, jul./set. 2009.

SANTOS, J.P.S. **Utilização e potencialidades socioeconômicas da algaroba (*Prosopis juliflora* (sw) d.c.) nas áreas rurais do semiárido do Rio Grande do Norte**. 2015.120f.Dissertação(Mestrado em Ciências Naturais)Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,2015.

SANTOS, S. F.M. **Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**.2007.151f. Tese (Doutorado)– Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, RN,2007.

SANTOS; R. C.; RIBEIRO FILHO, N. M; ALSINA; O. L. S.; CONRADO, L.S. ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DE BAGAÇO DO PSEUDOFRUTO DO CAJU POR VIA FERMENTATIVA 1º congresso químico do brasil de 29 a 01 de abril de 2010 no ifpbjoao pessoa <http://aquimbrasil.org/congressos/2010/arquivos/T28.pdf>.

SCHAFASCHEK, T. P. **Desenvolvimento e comportamento higiênico de *Apis mellifera* em colônias com rainhas selecionadas**. 75p. 2014. Tese de doutorado (Produção Animal) Universidade Estadual de Maringá, 2014.

SCHAFASCHEK, T.P. **Desenvolvimento e comportamento higiênico de *Apis mellifera* em colônias com rainhas selecionadas**. 2014. 56f. Tese de doutorado (Produção Animal), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Pará, Brasil.2014.

SCHMICKL, T., CRAILSHEIM, K. (2001). Cannibalism and early capping: strategies of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages, **J. Comp. Physiol. A** 187, 541–547.

SCHMICKL, T.; CRAILSHEIM, K. 2002. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor conditions. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. 51: 415- 425.

SCHMICKL, T.; CRAILSHEIM, K. Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. **Journal of Comparative Physiology A**, n. 187, p. 541–547, 2001.

SCHMICKL, T.; K. CRAILSHEIM. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their brood care behavior in response to non-foraging conditions and poor conditions. **Behav. Ecol. Sociobiol**, n. 51, p. 415-425, 2002.

SEELEY, T. Ecology. Princeton, Princeton Univ. Press.1985. **In:** WINSTON, Mark L. A biologia da Abelha. Tradução de Carlos A. Osowski – Porto Alegre: Magister, 2003. 276p.

SEELEY, T.D. 1989. The Honey bee colony as a superior-ganism, **Am. Sci.** 77: 546-553.

SENAR - Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Abelhas *Apis mellifera*: instalação do apiário / Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. -- 3. ed. Brasília: SENAR, 2011.

SEREIA, M.J.; TOLEDO, V. A. A.; FAQUINELLO, P.; COSTA-MAIA, F. M.; CASTRO, S.E.S.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; FURLAN, A.C. Lifespan of africanized honeybees fed with various proteic supplements. **Journal of Apicultural Science**. v.54, n.2, 2010.

- SHERMAN, F (2002). Getting started with yeast. *Meth Enzymol* 350: 3-41. Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC & Singer RA (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Ver.** 57: 383-401.
- SILVA, C. G. **Otimização do processo de produção da aguardente de algaroba e aproveitamento dos resíduos sólidos em produtos alimentares.** 2009. 209 f. Tese (Engenharia de Processos), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2009.
- SILVA, J.H.V.; OLIVEIRA, J. N. C.; SILVA, E.L.; JORDÃO FILHO, J.; RIBEIRO, M.L.G. Uso da Farinha Integral da Vagem de Algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.) na Alimentação de Codornas Japonesas. **R. Bras. Zootec.**, v.31, n.4, p.1789-1794, 2002.
- SILVA, M. G.; DANTAS, M. C. A. M.; MOREIRA, J. N.; ANDRADE, W. C.; GOMES, M. S. Perfil dos criadores de *Apis mellifera* no município de Aparecida, Paraíba. **ACTA Apícola Brasilica**, v.06, n.1, p.1-5, 2019.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; et al. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos e água. 4th ed. São Paulo: **Livraria Varela**, 2010.
- SILVA, S. J. R. **Fontes de pólen, pólen tóxico e mel amargo utilizados por abelhas (*Apis mellifera* L.) africanas e seus híbridos com italianas e cárnicas, na Amazônia setentrional, Roraima, Brasil.** Manaus, 2005.159p.Tese(Doutorado)– Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.2005.
- SILVA, S.A; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M. Estudo termogravimétrico da algaroba. **Química Nova**, v.24, n.4, p.460-464, 2001.
- SILVEIRA NETO, A. A. **Toxicidade, digestibilidade e ganho de peso da abelha *Apis mellifera* alimentada com ração proteica alternativa.** 2017. 101 f. Tese (Tese em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- SILVEIRA, F. A. Flora apícola e planejamento de atividades no apiário. **Informe Agropecuário**, Belo horizonte, v.13, n.149, p. 27-32. 1987.
- SMITH, M. T. V. Queen differentiation and the biological testing of royal jelly. *Memoir*
- Socol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S. (2003), Overview of solid-state fermentation in Brazil. **Biochem. Eng. J.**, **13**, 205-219.
- SOMBRA, D. S.. **Suplementação alimentar de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) na região do semiárido.** 2018.98f.Tese de Doutorado (Ciência Animal) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.2018.
- SOMERVILLE, D. 2005. Fat bees skinny bees – a manual on honey bee nutrition for beekeepers. **NSW Department of Primary Industries**. RIRDC Publication N° 05/054. www.rirdc.gov.au.
- SOMERVILLE, D. 2005. Fat bees, skinny bees - a manual on honey bee nutrition for beekeepers. **NSW Department of Primary Industries**. RIRDC Publication N° 05/054. 150 pp. <https://rirdc.infoservices.com.au/items/05-054>.
- SPALVINS, K., ZIHARE, L.; BLUMBERGA, D. (2018). Single cell protein production from waste biomass: comparison of various industrial by-products. **Energy Procedia**, 147, 409–418. doi:10.1016/j.egypro.2018.07.111.
- STANDIFER, L.N. Honeybee nutrition and supplemental feeding. **Agriculture Handbook**, 2003. Disponível em: <http://www.beesource.com/resources/usda/honeybee-nutrition-and-supplemental-feeding/> Acesso em: 03/07/2018.

- STEIN, R.B.S. **Avaliação de métodos para determinação da digestibilidade aparente utilizando farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Swartz) D.C.) em equinos.** 78 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.2002.
- STEIN, R.B.S.; TOLEDO, L.R.A.; ALMEIDA, F.Q. ARNAUT, A.C.; PATITUCCI, L.T.; SOARES NETO; J.; COSTA, V.T.M. Uso do Farelo de Vagem de Algaroba (*Prosopis juliflora* (Swartz) D.C.) em Dietas para Equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1240-1247, 2005.
- TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1999;96(11):5995–6000.
- TISSENAUM, HA.; GUARENTE, L. Model organisms as a guide to mammalian aging. **Dev Cell**.v.1, p. 9-19.2002.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Tortora funke. 10 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2012.
- TURNBULL, W. H., LEEDS A. R., EDWARDS G. D. (1992). Mycoprotein reduces blood lipids in free-living subjects. **Am. J. Clin. Nutr.** 55, 415–419.
- VALDÍVIA, S. V. El algaroba, uma espécie florestal prometedora para los trópicos áridos. **Ministério da Agricultura**. Peru.19f (Boletim de Divulgação, 32). 1972.
- VAN DER REST, M.E; KAMMINGA, A.H; NAKANO, A.; ANRAKU, Y.; POOLMAN, B, KONINGS, W.N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. **Microbiol Rev**,1995, 59, 304-322.
- VAN ENGELSDORP, D.; EVANS, J.D., SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B.K. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. **PLoS ONE** 4(8): e6481. 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.
- VANENGELSDORP, D., HAYES JR., J., UNDERWOOD, R., PETTIS, J., 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008.
- VASUDEVAN, P., PADMAVATHY P.V., DHINGRA S.C.: Biosorption of monovalent and divalent ions on baker's yeast. **Biores. Technol.** 82, 285–289, 2002.
- VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces Meyen ex Reess* (1870). **Elsevier B.V.**, 2011.
- VELTHUIS, H.H. Ovarian development in *Apis mellifera* worker bees. **Entomol. Exp. Appl** 13:377-394. 1970.
- VENDRAMIN, J.D. *Manual de entomologia agrícola*. São Paulo: Ed. **Agronômica Ceres**, 1988, 649p.: il. 24p. cor. 2ª edição.
- VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C.S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L.. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.13, n.4, p.487–493, 2009.
- VERMEULEN, S.J.; CAMPBELL, B.M.; INGRAM, J.S.I. Climate Change and Food Systems. **Annual Review of Environment and Resources**. 2012; 37:195– 222.
- VIDAL, M.F. Efeitos da seca de 2012 sobre a apicultura nordestina. Informe Rural, **ETENE-Banco do Nordeste do Brasil S/A**. Ano VII, n.2, 2013.
- VIDAL, M.F. Produção de mel na área de atuação do BNB entre 2011 e 2016. – **ETENE**. Ano 3, n. 30, abril, 2018.

- VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Revista de Nutrição**, v.13, n.2, p.127-134, 2000.
- VIT, P. Productos de lacolmenarecolectados y procesados por lasabejas: miel, polen y propóleos. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, Caracas, v.35, n.2, p. 32-39. jul. 2004. Disponível em: www.scielo.org.ve/scielo.php/htm. Acesso em: 08 abr. 2011.
- WALKER, L.J.; ALDHOUS, M.C.; DRUMMOND, H.E.; SMITH, B.R.; NIMMO, E.R. ARNOTT, I.D.; SATSANGI, J. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. **Clin Exp Immunol**. 2004; 135 (3): 490-6. doi: 10.1111 / j.1365-2249.2003.02392.x.
- WHITE, J.W. Honey. In: GRAHAM, J.M. The hive and the honeybee. Hamilton: **Dadant& Sons**, 9 th ed, 2010. p. 869-925.
- WILLE, H.; WILLE, M.; KILCHENMANN, V.; IMDORF, A., BÜHLMANN, G. (1985) Pollenernte und Massenwechsel von drei Apis mellifera-Völkern auf demselben Bienenstand in zweiaufeinanderfolgenden Jahren, **Rev. Suisse Zool**. 92, 897–914.
- WINKEL, T. F.; WOLFF, L. F.; SILVA, F. N.; BEZERRA, A. J. A.; NASCIMENTO, S. G. S. Buscando a construção social dos mercados: a experiência da Cooperativa Coomelca no Sul do RS. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 18., 2016, Pelotas. **Anais**. Pelotas: UFPel, 2016.
- WINSTON, M. L. A biologia da Abelha. Tradução de Carlos A. **Osowski** – Porto Alegre: Magister, 2003. 276p.
- WINSTON, M. L. *The biology of the honey bee*. 1987. 281p.
- WINSTON, M.L. 1987. The biology of the honey bee. **Harvard University Press**, Cambridge, MA.
- WINSTON, M.L.; O.R. TAYLOR & G.W. OTIS. 1983. Some differences between temperate European and tropical African and South American honeybees. **Bee World** 64: 12 - 21.
- WITHERS, P.C. The effect of ambient air pressure on oxygen consumption of resting and hovering honeybees. **Journal of Comparative Physiology**. 1981; 141:433-437.
- ZUCOLOTO, F. S. Aspectos gerais da nutrição de insetos, com especial referência em abelhas. **In: Encontro Sobre Abelhas**, 1, 1994, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, 1994, p.27-37.